



Rôles normal et pathologique des phosphorylations de la huntingtine par Cdk5

Karim Ben M'Barek

► To cite this version:

Karim Ben M'Barek. Rôles normal et pathologique des phosphorylations de la huntingtine par Cdk5. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Paris Sud - Paris XI, 2012. Français. NNT : 2012PA11T077 . tel-01648977

HAL Id: tel-01648977

<https://theses.hal.science/tel-01648977>

Submitted on 27 Nov 2017

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.

ÉCOLE DOCTORALE :

Signalisation et réseaux intégratifs en biologie

Institut Curie / INSERM U1005 / CNRS UMR 3306

THÈSE DE DOCTORAT

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS-SUD

DISCIPLINE :

Neurosciences

soutenue le 26/11/2012

par

Karim BEN M'BAREK

Rôles normal et pathologique des phosphorylations de la Huntingtine par Cdk5

Directeur de thèse : Frédéric SAUDOU DR1 INSERM (Institut Curie)

Composition du jury :

Rapporteurs :	Jocelyne CABOCHE	DR2 CNRS (INSERM UMRS 952 / CNRS UMR 7224)
	Marie-Claude POTIER	DR2 CNRS (Institut du Cerveau et de la Moelle épinière)
Examineurs :	Sandrine HUMBERT	DR2 INSERM (Institut Curie)
	Laurent NGUYEN	Chercheur qualifié F.R.S.-FNRS (GIGA- BELGIQUE)
	François BOUSSIN	Directeur de laboratoire (iRCM/CEA)
	Emmanuel BROUILLET	DR2 CNRS (MIRCEn/CEA)

« On fait la science avec des faits, comme on fait une maison avec des pierres : mais une accumulation de faits n'est pas plus une science qu'un tas de pierres n'est une maison. »

Jules Henri Poincaré

(29 Avril 1854 – 17 Juillet 1912)

Mathématicien, physicien, philosophe français

Extrait de « La science et l'hypothèse » chapitre 9 (1901).

Remerciements

Je remercie mes rapporteurs, **Jocelyne Caboche** et **Marie-Claude Potier**, pour avoir accepté de faire la lecture critique de mon manuscrit. Je tiens également à remercier **Emmanuel Brouillet** et **Laurent Nguyen** pour avoir accepté d'être membres de mon jury de thèse.

Fred & Sandrine, merci à vous de m'avoir accueilli au sein de votre équipe puis de vos équipes. Vous m'avez donné la chance d'intégrer un groupe dynamique et productif côté science, et chaleureux et amical côté ambiance. Merci à toi **Fred** pour tes conseils éclairés. Merci à toi, **Sandrine**, de m'avoir soutenu, encouragé, canalisé et fait confiance tout au long de cette thèse. On ne s'est pas toujours compris mais on a pu faire du très bon boulot ensemble.

Je remercie la **Fondation pour la Recherche Médicale** qui a financé ma 4^{ème} année de thèse.

Je remercie **Francois Boussin**, qui, le premier, a eu confiance en moi et m'a permis de réaliser mes premières expériences dans son laboratoire de recherche au CEA. **Francois** a, par la suite, accepté d'être le tuteur de ma thèse, puis d'établir une collaboration scientifique et enfin d'être membre du jury de ma thèse. Merci.

Je remercie **Laurent Gauthier**, qui m'a enseigné le B.A. BA du travail à la paillasse. Avec toi, j'ai appris beaucoup. Merci pour tout.

Je remercie **Alain Gardier** et **Denis David**, toujours très aimables et qui m'ont accueilli chaleureusement au cours de cette collaboration étroite entre nos deux laboratoires. Merci à toi **Denis**, tu m'as beaucoup éclairé pour les études de neurogenèse hippocampique et de comportement.

Je remercie **Sophie Orvoen** avec qui j'ai passé beaucoup de temps à étudier le comportement des souris en animalerie. Tu m'as appris tout ce qu'il y avait à savoir sur le comportement. Je te souhaite bonne chance pour la soutenance de ta thèse qui aura lieu avant moi.

Je remercie également tous les membres des labos Saudou/Humbert. Je remercie tout particulièrement les personnes avec qui j'ai beaucoup interagi sur ce projet : **Caroline Benstaali** et **Patrick Pla**. Bien sûr, je n'oublie pas **tous les autres** avec qui j'ai discuté, rigolé, travaillé et plus encore. Merci à tous.

Je remercie tous les membres de l'**unité U1005** et de l'**Institut Curie** que j'ai côtoyés au cours de ces années.

Je remercie **ma famille** pour avoir cru en moi sans vraiment comprendre ce qui me motive dans ce travail tellement prenant et peu rémunérateur. Merci.

Je remercie également mes amis pour m'avoir soutenu et encouragé.

Je remercie tout particulièrement **Mimi** pour son soutien indéfectible et sur qui je peux compter à chaque instant.

Bonne Lecture.

Avant-propos

La maladie de Huntington est une maladie neurodégénérative. Comme d'autres maladies neurodégénératives, des troubles dépressifs peuvent se manifester au cours de cette pathologie. La dépression représente une maladie à part entière, dont la caractérisation clinique ne se base pas simplement sur des mesures physiologiques. La physiopathologie de la dépression est très discutée avec de nombreuses hypothèses. Existe-t-il un lien entre la protéine huntingtine, les troubles dépressifs de la maladie de Huntington et la dépression ?

L'objectif de ma thèse est d'identifier les fonctions physiologiques des phosphorylations de la huntingtine sur les sérines 1181 et 1201. Pour ce faire, de nouveaux modèles murins ont été générés. La huntingtine endogène de ces souris est mutée sur les sérines 1181 et 1201 soit en acide aspartique (modèle phosphomimétique), soit en alanine (modèle non phosphorylable). La caractérisation de ces modèles murins a été réalisée en analysant des marqueurs phénotypiques modulés dans les souris modélisant la maladie de Huntington (tels que la coordination motrice, les troubles dépressifs ou encore le poids corporel) et en ciblant des fonctions connues de la huntingtine au cours du développement (tels que l'orientation du plan de clivage des progéniteurs corticaux et la migration des cellules corticales post-mitotiques). Ainsi, à l'appui de cette approche originale, j'ai caractérisé le rôle de ces phosphorylations au niveau du comportement de type anxio-dépressif et de la neurogenèse embryonnaire et adulte.

L'introduction est divisée en trois parties traitant des aspects abordés au cours de ma thèse. La première partie rassemble les données de la bibliographie sur la maladie de Huntington. Je décris également les fonctions connues de la huntingtine et les dysfonctions induites par la mutation pathologique de cette protéine. La deuxième partie expose les notions essentielles concernant le développement du cortex embryonnaire. Je décris, en autres, les mécanismes conduisant à la production de neurones et les phénomènes de migration des nouveaux neurones. Enfin, la troisième partie présente les données relatives à la neurogenèse hippocampique adulte et aux troubles d'anxiété-dépression. En particulier, j'expose les hypothèses des causes

physiologiques de la dépression. Bien que de nombreuses structures soient impliquées, l'accent est mis sur le rôle de l'hippocampe dans les troubles dépressifs pour introduire au mieux les résultats expérimentaux. Les deux dernières parties se terminent par un état des connaissances sur l'influence de la huntingtine sauvage ou mutante sur la neurogenèse hippocampique et l'anxiété-dépression.

Ce travail a permis d'étayer l'hypothèse du rôle de la neurogenèse hippocampique sur le niveau d'anxiété/dépression. J'ai également mis en évidence le lien entre la huntingtine et la dépression en montrant que la huntingtine non phosphorylée réduit le niveau d'anxiété/dépression chez la souris, en stimulant la neurogenèse hippocampique au niveau de la maturation et de la survie des nouveaux neurones. Ceci m'a permis de proposer des pistes de travail pour rechercher de nouvelles voies thérapeutiques dans le traitement de la dépression et des troubles dépressifs dans la maladie de Huntington. Par ailleurs, j'ai élargi les connaissances sur le rôle de la huntingtine au cours du développement du cortex embryonnaire en pointant les fonctions des phosphorylations sur les sérines 1181 et 1201 au niveau de l'orientation de plan de clivage des progéniteurs nerveux en division et des processus migratoires impliquant les futurs neurones.

TABLE DES FIGURES	13
CHAPITRE 1. INTRODUCTION	15
PREMIERE PARTIE. LA MALADIE DE HUNTINGTON	17
1. LA MALADIE DE HUNTINGTON	19
1.1. DES PREMIERES DESCRIPTIONS DE CHOREES A LA MALADIE DE HUNTINGTON	19
1.1.1. <i>Les danses de Saint Guy</i>	19
1.1.2. <i>La première caractérisation précise de la MH</i>	20
1.2. LA DESCRIPTION ACTUELLE DE LA MALADIE DE HUNTINGTON	21
1.2.1. <i>Les symptômes moteurs</i>	21
1.2.2. <i>Les symptômes cognitifs</i>	21
1.2.3. <i>Les symptômes psychiatriques</i>	22
1.2.4. <i>Prévalence</i>	23
1.3. LA NEURODEGENERESCENCE	25
1.3.1. <i>Le striatum</i>	25
1.3.2. <i>Le cortex</i>	28
1.4. LE GENE ET LA MUTATION PATHOLOGIQUE	29
1.4.1. <i>Identification du gène</i>	29
1.4.2. <i>Caractérisation de la mutation</i>	30
2. LA PROTEINE HUNTINGTINE	32
2.1. LES MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES	33
2.1.1. <i>Acétylation</i>	34
2.1.2. <i>SUMOylation et ubiquitination</i>	34
2.1.3. <i>Phosphorylations</i>	35
2.1.4. <i>Palmitoylation</i>	36
2.2. LES FONCTIONS DE LA HUNTINGTINE	37
2.2.1. <i>Propriétés anti-apoptotiques</i>	37
2.2.2. <i>Transcription</i>	38
2.2.3. <i>Le Transport axonal</i>	40
2.2.4. <i>L'endocytose</i>	43
2.2.5. <i>Huntingtine et ciliogenèse</i>	44
3. CONSEQUENCES DE LA MUTATION PATHOLOGIQUE DE LA HUNTINGTINE	44
3.1. LES CONSEQUENCES DE LA MUTATION PATHOLOGIQUE	44
3.1.1. <i>Le clivage de la huntingtine et les agrégats</i>	47
3.1.2. <i>L'excitotoxicité</i>	49
3.1.3. <i>L'altération de la transcription</i>	52
3.1.4. <i>Les dysfonctions énergétiques</i>	53
3.1.5. <i>Les dynamiques intracellulaires</i>	55
3.2. LES MODELES ANIMAUX DE LA MALADIE DE HUNTINGTON	58
3.2.1. <i>Les modèles chimiques</i>	58
3.2.2. <i>Les modèles transgéniques</i>	59
3.2.3. <i>Les souris Knock In</i>	60
3.2.4. <i>Les autres modèles</i>	60

DEUXIEME PARTIE. LE DEVELOPPEMENT DU CORTEX EMBRYONNAIRE	61
1. LE CORTEX CEREBRAL	63
1.1. STRUCTURE DU NEOCORTEX	63
1.2. ORIGINE DU CORTEX	64
2. LA NEUROGENESE : A L'ORIGINE DES DIFFERENTS TYPES CELLULAIRES	64
2.1. DEFINITION	64
2.2. SEQUENCE DE FORMATION DES DIFFERENTS TYPES CELLULAIRES	65
3. LES DIFFERENTES ETAPES DE LA GENESE DU NEURONE	66
4. LES DIFFERENTS TYPES CELLULAIRES PRODUISANT LES NEURONES	66
4.1. LES CELLULES NEUROEPITHELIALES	67
4.2. LES CELLULES DE LA GLIE RADIAIRE	67
4.2.1. <i>Morphologie</i>	68
4.2.2. <i>Migration intercinétique</i>	69
4.2.3. <i>Marqueurs</i>	70
4.3. LES PROGENITEURS INTERMEDIAIRES	71
5. MECANISMES DE PRODUCTION DES NOUVEAUX NEURONES	72
5.1. PRODUCTION DIRECTE	72
5.2. PRODUCTION INDIRECTE	73
5.3. MECANISMES IMPLIQUES DANS LE CHOIX DU TYPE DE DIVISION	73
5.3.1. <i>Par-3 et Par-6</i>	74
5.3.2. <i>Numb</i>	74
5.3.3. <i>Inscuteable</i>	74
5.3.4. <i>Protéines impliquées dans les microcéphalies</i>	76
5.4. SYNTHÈSE SUR LE LIEN ENTRE ORIENTATION DU PLAN DE CLIVAGE ET LA NATURE DE LA DIVISION	77
6. FENETRE DE REGULATION DES DIFFERENTES POPULATIONS NEURONALES	79
6.1. FORMATION DU CORTEX : LE MODELE « INSIDE OUT »	79
6.2. REGULATION DU VOLUME DU CERVEAU ET DU NOMBRE DE NEURONES	81
7. DE LA NECESSITE DE MIGRER POUR ATTEINDRE SA POSITION FINALE	82
7.1. LA MIGRATION RADIAIRE	82
7.1.1. <i>Les modes de migration</i>	82
7.1.2. <i>Les voies de signalisation impliquées</i>	83
7.2. LA MIGRATION TANGENTIELLE	86
8. HUNTINGTINE ET DEVELOPPEMENT DU CERVEAU	87
8.1. EXPRESSION DE LA HUNTINGTINE	87
8.2. FONCTIONS DE LA HUNTINGTINE DANS LE DEVELOPPEMENT DU CERVEAU EMBRYONNAIRE	88
8.3. ET CHEZ LES PATIENTS ATTEINTS DE LA MALADIE DE HUNTINGTON ?	91
TROISIEME PARTIE. LA NEUROGENESE ADULTE ET LES TROUBLES DE L'HUMEUR	93
1. LA NEUROGENESE ADULTE	95
1.1. HISTORIQUE DE LA DECOUVERTE DE LA NEUROGENESE ADULTE	95
1.2. LA NEUROGENESE HIPPOCAMPIQUE	95
1.2.1. <i>La structure de l'hippocampe</i>	95
1.2.2. <i>La neurogenèse dans le gyrus denté</i>	97
1.2.3. <i>Fonctionnalité des nouveaux neurones</i>	98
1.2.4. <i>Rôle de Cdk5 dans la neurogenèse hippocampique adulte</i>	99

1.2.5. Modulateurs de la neurogenèse hippocampique	100
1.3. LA NEUROGENESE HIPPOCAMPIQUE ADULTE ET LA MALADIE DE HUNTINGTON	101
1.3.1. La neurogenèse hippocampique dans la maladie de Huntington	101
1.3.2. Mécanismes induisant l'altération de la neurogenèse	103
1.3.3. Les patients MH	104
2. LES TROUBLES DE L'HUMEUR	104
2.1. GENERALITES	104
2.1.1. Signes cliniques	105
2.1.2. Les traitements disponibles	106
2.1.3. Efficacité des traitements actuels	106
2.2. LES CAUSES PHYSIOLOGIQUES DE LA DEPRESSION	108
2.2.1. La théorie de monoamines	108
2.2.2. L'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien	109
2.2.3. L'hippocampe et le BDNF	110
2.2.4. Le cortex	113
2.3. MODELISATION CHEZ LA SOURIS	114
2.4. LE CAS DE LA MALADIE DE HUNTINGTON	116
7. PROBLEMATIQUE	119
CHAPITRE 2 - RESULTATS	121
1. MODELE D'ETUDE	123
2. LA HUNTINGTINE REGULE LES COMPORTEMENTS DE TYPE ANXIO-DEPRESSIF EN MODULANT LE TRANSPORT DU BDNF ET LA NEUROGENESE	124
2.1. INTRODUCTION	124
2.2. ARTICLE	125
2.3. DISCUSSION ET RESULTATS COMPLEMENTAIRES	174
3. L'ABLATION DES PHOSPHORYLATIONS DE LA HUNTINGTINE AMELIORE LES SYMPTOMES DE TYPE DEPRESSIF D'UN MODELE MURIN DE LA MALADIE DE HUNTINGTON	180
3.1. INTRODUCTION	180
3.2. RESULTATS	182
3.3. DISCUSSION	194
4. LES PHOSPHORYLATIONS DE LA HUNTINGTINE SUR LES SERINES 1181 ET 1201 SONT IMPLIQUEES DANS LA NEUROGENESE CORTICALE EMBRYONNAIRE	197
4.1. INTRODUCTION	197
4.2. RESULTATS	199
4.3. DISCUSSION	211
CHAPITRE 3 – DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES	215
1. LA HUNTINGTINE AU COURS DU DEVELOPPEMENT DU CERVEAU	217
2. LA HUNTINGTINE ET LE TRANSPORT DU BDNF	219
3. LA FONCTION DE LA HUNTINGTINE DANS L'HIPPOCAMPE	220
4. LA HUNTINGTINE ET LE TRAITEMENT DE LA DEPRESSION	221

5. LE ROLE DE CDK5 DANS LES MALADIES NEURODEGENERATIVES	223
CHAPITRE 4 - BIBLIOGRAPHIE	227

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Gravure illustrant le supplice de Anne Hendricks, accusée de sorcellerie et brûlée à Amsterdam en 1571 (Grandmougin et al. 1997).	19
Figure 2 : Première page de l'article de Georges Huntington (Bates 2005).	20
Figure 3 : Prévalence des symptômes dépressifs selon les différentes études (van Duijn et al. 2007).	23
Figure 4 : Prévalence de la maladie de Huntington dans le monde (Warby et al. 2011).	24
Figure 5 : Coupes coronales de cerveaux post-mortem d'un patient MH (droite) et d'un individu sain (gauche) (Alexi et al. 2000).	25
Figure 6 : Voies directe et indirecte du striatum (Purves et al. 2001).	27
Figure 7 : Altération de la voie indirecte dans la MH.	28
Figure 8 : Comparaison de la longueur de l'expansion polyQ de la mère ou du père et de leurs enfants (Ranen et al. 1995).	31
Figure 9 : Schéma de la protéine HTT illustrant les positions des domaines HEAT et de la région polyQ (Ross and Tabrizi 2011).	33
Figure 10 : Schéma illustrant les différents sites de modifications post-traductionnelles sur la protéine huntingtine (Ehrnhoefer et al. 2011). Les ronds plein vert et bleu indiquent les sites de SUMOylation et d'ubiquitinylation.	34
Figure 11 : Les sites de phosphorylations connus de la HTT et leurs kinases respectives (Ehrnhoefer et al. 2011).	35
Figure 12 : La huntingtine module le transport axonal des vésicules de BDNF en modulant l'association des moteurs moléculaires aux microtubules et cette fonction est altérée en condition polyQ (Gauthier et al. 2004).	41
Figure 13 : Modèle illustrant le rôle de la phosphorylation en S421 sur la directionnalité du transport axonal (Colin et al. 2008).	42
Figure 14 : Interactions de la huntingtine avec les protéines impliquées dans l'endocytose régulée par la clathrine (Harjes and Wanker 2003).	44
Figure 15 : Mécanisme proposé de la toxicité induite par la forme polyQ de la huntingtine (Borrell-Pages et al. 2006).	46
Figure 16 : Illustration des sites de clivages de la huntingtine induisant la mort neuronale avec les enzymes effectrices (Ehrnhoefer et al. 2011).	48
Figure 17 : Mécanismes de l'excitotoxicité neuronale induite par la forme polyQ de la huntingtine (Estrada Sanchez et al. 2008).	51
Figure 18 : Modèle proposé pour le rôle des altérations mitochondriales dans la pathogenèse de la MH (Damiano et al. 2010).	55
Figure 19 : Schéma représentant la structure en 6 couches du néocortex adulte. (Hatten 1999). WM= white matter.	63
Figure 20 : Schéma illustrant la formation du tube neural à partir du neuroectoderme. La plaque neurale s'invagine en gouttière neurale puis se referme complètement en tube neural (Gammill and Bronner-Fraser 2003).	64
Figure 21 : Production des différentes populations cellulaires au cours de la formation du cortex chez le rat (Sauvageot and Stiles 2002).	65
Figure 22 : les divisions des cellules de la glie radiaire. Les CGR se divisent symétriquement et produisent deux autres CGR. Elles se divisent également asymétriquement pour produire une autre CGR et un neurone (en bleu) ou un progéniteur basal (en rose) (Guillemot 2005).	68
Figure 23 : Caractéristiques des différentes populations de progéniteurs du cortex en développement (Malatesta et al. 2008). NE= cellules neuro-épithéliales ; RG= cellules de la glie radiaire ; BP= progéniteurs basaux.	71
Figure 24 : les modes de production de neurones : directement par divisions asymétriques ou indirectement par les progéniteurs intermédiaires (nIPC) après une ou deux divisions (Kriegstein and Alvarez-Buylla 2009).	72
Figure 25 : Divisions asymétriques et ségrégation de marqueur chez la drosophile (Knoblich 2008).	74
Figure 26 : Modèle du lien entre l'orientation du fuseau de division et le devenir cellulaire, dans le cas de l'inactivation ou la surexpression de mINSC (Postiglione et al. 2011).	75
Figure 27 : Modèle représentant le rôle de LIS1 dans les divisions symétriques et asymétriques des cellules neuroépithéliales et de la glie radiaire (Yingling et al. 2008).	76

Figure 28 : Hétérogénéité des cellules de la glie radiaire. (a) Les cellules neuroépithéliales au début de la neurogenèse se divisent symétriquement et asymétriquement. (b) Au stade E14, différents sous-types de cellules de la glie radiaire sont présents : certains se divisent exclusivement symétriquement ils expriment BLBP et des niveaux élevés de Hes, d'autres se divisent exclusivement asymétriquement et expriment PAX6. Un autre sous-type est bi-potent et capable de produire des neurones et des astrocytes (BLBP et expression réduite de Hes). Enfin, il existe également un sous-type produisant uniquement des astrocytes qui se divise en majorité de façon symétrique (c). Ces cellules par la suite se différencient en progéniteurs gliaux à la fin de la période neurogénique (Pinto and Gotz 2007).	79
Figure 29 : Représentation schématique de l'ordre d'apparition des différentes couches neuronales et du stade de production des différentes populations de neurones (Molyneaux et al. 2007). Ncx= néocortex ; CH= ourlet cortical ; LGE= éminence ganglionnaire latérale ; MGE= éminence ganglionnaire médiane ; PP= pré-plaque ; VZ= zone ventriculaire ; SVZ= zone sous-ventriculaire ; IZ= zone intermédiaire ; CP= plaque corticale ; SP= sous-plaque ; MZ= zone marginale ; I, II/III, IV, V, VI= identification des couches corticales.	80
Figure 30 : Mécanismes de migration radiaire (Noctor et al. 2004).	83
Figure 31 : Les voies de régulation du cytosquelette d'actine et de microtubule (Heng et al. 2010).	86
Figure 32 : Voies migratoires des interneurons issus des éminences ganglionnaires (Kriegstein and Noctor 2004).	87
Figure 33 : Schéma des principales connexions au sein de l'hippocampe (Deng et al. 2010). EC=cortex entorhinal ; PP=voie perforante ; LPP= voie perforante latérale ; MPP : voie perforante médiane ; TA : voie temporo-ammonique ; CA : corne d'Ammon.	96
Figure 34 : Fonctions de l'hippocampe ventral et dorsal et connectivité des neurones du gyrus denté (Sahay and Hen 2007).	97
Figure 35 : Etapes de production des neurones à partir des cellules souches de la zone sous-granulaire, illustration adaptée de (Ming and Song 2011).	98
Figure 36 : Modulateurs extrinsèques de la neurogenèse hippocampique (Ma et al. 2009).	101
Figure 37 : L'hypothèse des monoamines : les différents acteurs et les données expérimentales (Chopra et al. 2011). AC : Adénylate cyclase ; DAG : Diacylglycérol ; IP3 : Inositol triphosphate ; MAO : Monoamine oxydase ; NE : Norépinéphrine ; PKA: Protein kinase A; PLC: Phospholipase C.	109
Figure 38 : L'axe HPA dans la dépression (Belmaker and Agam 2008).	110
Figure 39 : Voies intracellulaires modulées par les antidépresseurs (Coyle and Duman 2003).	112
Figure 40 : Représentation schématique d'une alanine, d'une sérine phosphorylée et d'un acide aspartique.	123
Figure 41 : Modèle proposé décrivant les mécanismes moléculaires induisant les symptômes dépressifs dans la maladie de Huntington. En conditions normales, la huntingtine module l'anxiété/dépression via le domaine contenant les sérines 1181 et 1201. Cette régulation fine est médiée par les phosphorylations par Cdk5. Dans la maladie de Huntington, la forme polyQ induit son clivage par la caspase 6 libérant ainsi le domaine régulateur. Les fragments courts N-terminaux provoquent un certain nombre de dysfonctions dont la perturbation du transport vésiculaire et la formation d'agrégats. La dépression dans la MH pourrait donc, pour partie, être la conséquence d'une perte de fonction de la protéine normale.	177
Figure 42 : Les phosphorylations de la huntingtine sont associées aux symptômes dépressifs induit par un traitement continu à la corticostérone. Immunoprécipitation de la huntingtine à partir d'extraits hippocampaux et immunoblotting contre les phosphorylations sur les sérines 1181 et 1201.	178
Figure 43 : Stratégie de croisement pour obtenir des souris homozygotes pour l'absence de phosphorylations et qui expriment le transgène R6/1.	181

Chapitre 1. INTRODUCTION

Première Partie. La Maladie de Huntington

1. La Maladie de Huntington

1.1. Des premières descriptions de chorées à la Maladie de Huntington

1.1.1. Les danses de Saint Guy

Les premières descriptions de mouvements involontaires ou chorée datent du Moyen Âge (Grandmougin *et al.* 1997). Des gens se mettaient à danser et à chanter sans s'arrêter de façon sporadique en Europe, entraînant d'autres personnes à danser par imitation (Grandmougin *et al.* 1997). Ceux-ci pouvaient danser jusqu'à l'épuisement, voire parfois mourir de fatigue. Certains avaient des vertiges, des hallucinations. Ces gens étaient considérés à l'époque comme des possédés. Ces manies dansantes n'avaient rien à voir avec les descriptions des chorées faites par les médecins des siècles plus tard. En effet, ces épidémies de danse de St Guy n'étaient vraisemblablement pas d'origine somatique mais le fait d'un état émotionnel ou socio-culturel (Grandmougin *et al.* 1997). Néanmoins, les personnes atteintes de la Maladie de Huntington (MH) pouvaient être masquées par ces épidémies de chorée.

Au XVII^{ème} siècle, avec les chasses aux sorcières, les malades de la MH pouvaient être considérés comme des sorciers ou des possédés et finir au bûcher (**Figure 1**). Ainsi, en Nouvelle-Angleterre, sur 30 exécutions pour sorcellerie, 7 femmes étaient descendantes de malades de la MH (Grandmougin *et al.* 1997).



Figure 1 : Gravure illustrant le supplice de Anne Hendricks, accusée de sorcellerie et brûlée à Amsterdam en 1571 (Grandmougin *et al.* 1997).

1.1.2. La première caractérisation précise de la MH

La maladie de Huntington (ou chorée de Huntington) tient son nom du jeune médecin américain de 22 ans, qui l'a caractérisée pour la première fois : Georges Huntington. Celui-ci a publié en 1872 la première description précise de cette maladie qui, dès lors portera son nom, en seulement 3 paragraphes (**Figure 2**)(Huntington 1872). Il résuma ainsi la maladie selon trois critères distinctifs. En premier, il mit en avant le caractère héréditaire de cette chorée. En deuxième, il pointa la tendance progressive à la folie et au suicide, décrivant en particulier le cas de deux hommes mariés, souffrant de la MH et présentant une désinhibition forte les conduisant à une hyperactivité sexuelle extra-conjugale. Enfin, le dernier trait qu'il met en valeur est l'âge tardif d'apparition des premiers symptômes (Huntington 1872). En effet, il décrit la MH comme n'apparaissant qu'à l'âge adulte par opposition aux autres chorées qu'il connaît.

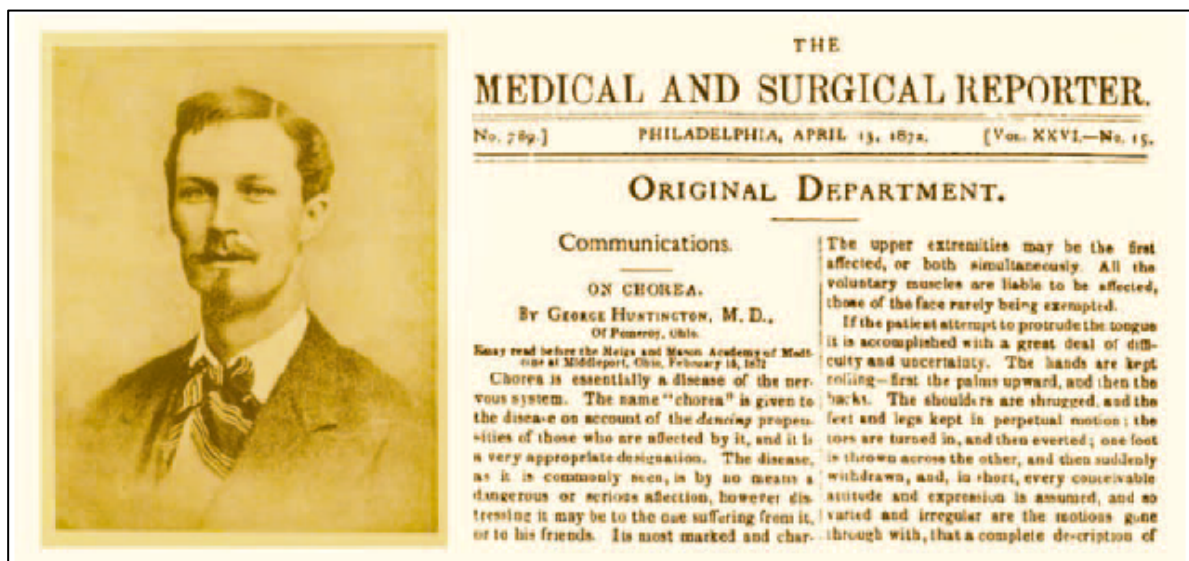


Figure 2 : Première page de l'article de Georges Huntington (Bates 2005).

Cette première description pose ainsi les bases permettant l'identification de la maladie et décrit les aspects cliniques principaux : moteurs, psychiatriques et cognitifs.

1.2. La description actuelle de la maladie de Huntington

La maladie de Huntington est définie par une triade de symptômes : moteur, psychiatrique et cognitif. Elle se transmet de façon héréditaire et la mutation est dominante.

1.2.1. Les symptômes moteurs

Les symptômes moteurs apparaissent progressivement à l'âge adulte vers 35-40 ans. Les mouvements involontaires deviennent de plus en plus présents et handicapent les patients (Gusella and MacDonald 1995). Parmi les troubles moteurs, on retrouve également des troubles oculomoteurs et une impersistance motrice (Walker 2007).

La chorée se présente comme des mouvements involontaires désordonnés, imprécis et excessifs. Les patients, à des stades précoces, ne sont souvent pas conscients de ces symptômes, qui sont accentués par différents facteurs comme la fatigue, l'alcool. Par la suite, les patients présentent des troubles de l'équilibre et de la marche qui entraînent des chutes fréquentes. La maladie conduit progressivement à une akinésie et les patients finissent invalides. Les mouvements choréiques nécessitent beaucoup d'énergie et les patients ont du mal à se nourrir. Initialement, les pertes de poids importantes des patients MH ont été associées à la chorée. Cependant, on a identifié des altérations du métabolisme des lipides, une résistance à l'insuline, une altération de la production d'énergie par les mitochondries, un catabolisme élevé et une dysfonction des systèmes neuroendocrinien et digestif qui expliqueraient la perte de poids (Valenza and Cattaneo 2006; Aziz *et al.* 2008; Saleh *et al.* 2009; van der Burg *et al.* 2009; Block *et al.* 2010). De plus, ces pertes de poids sont observées chez certains patients asymptomatiques (Aziz *et al.* 2008).

1.2.2. Les symptômes cognitifs

Les symptômes cognitifs s'installent progressivement par des troubles de l'attention, de la concentration et de la mémoire (Montoya *et al.* 2006). Un ralentissement de la pensée et de l'attention, des troubles du jugement, de la planification, de prise de décision et du langage, sont également présents graduellement. Ces problèmes cognitifs évoluent vers un syndrome de démence sous-corticale (Montoya *et al.* 2006). En effet, les symptômes se complètent de changement de

personnalité, une baisse de la motivation et un ralentissement global du traitement des informations.

1.2.3. Les symptômes psychiatriques

Les symptômes psychiatriques précèdent souvent les symptômes moteurs de plusieurs années.

Les symptômes psychiatriques incluent des troubles de l'humeur (dépression, trouble bipolaire, maladies dysthymique et cyclothymique), des troubles anxieux (anxiété générale, trouble panique, phobie simple, agoraphobie, phobie sociale), des dépendances à l'alcool, au tabac, des troubles de l'alimentation, de la schizophrénie, des troubles obsesso-compulsifs, de l'irritabilité, de l'apathie, de la psychose, des désinhibitions, des hyposexualités, des paraphilies (déviances sexuelles) et des tentatives de suicide (Rosenblatt and Leroi 2000; Julien *et al.* 2007). La prévalence de l'ensemble ces symptômes psychiatriques varie entre 33% et 76% (van Duijn *et al.* 2007). Cette variation importante peut s'expliquer par la diversité des méthodes d'évaluations de ces symptômes mais également par le nombre et le stade de la pathologie des patients recrutés pour les différentes études. De plus, l'environnement et les prédispositions génétiques peuvent intervenir dans la fréquence de ces symptômes (Julien *et al.* 2007).

Parmi les symptômes psychiatriques, les symptômes dépressifs sont les plus fréquents (**Figure 3**). Ils peuvent apparaître 20 ans avant les premiers symptômes moteurs, et ils augmentent progressivement en intensité (Julien *et al.* 2007). Ainsi, les patients prodromaux sont atteints de symptômes psychiatriques très tôt, ce qui est une cause supplémentaire de souffrance pour eux-mêmes et leurs familles. Une partie des symptômes dépressifs peut provenir de la connaissance de son état d'individu à risque pour la MH. Ainsi, les individus issus de familles MH qui ne portent pas le gène muté ont une fréquence de problèmes psychiatriques supérieure à celle de la population générale. Cependant, les individus MH ont des taux plus importants que les membres de leurs familles non porteurs de la mutation (Julien *et al.* 2007).

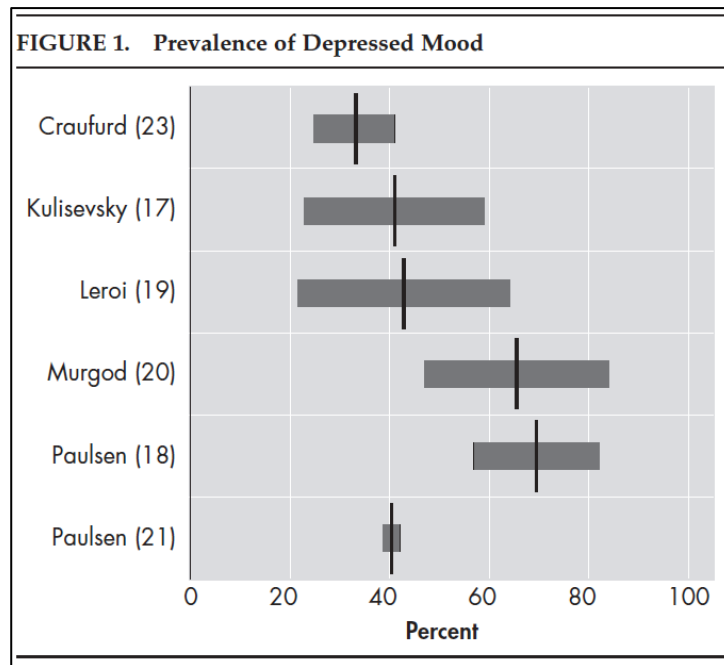


Figure 3 : Prévalence des symptômes dépressifs selon les différentes études (van Duijn et al. 2007).

1.2.4. Prévalence

La maladie de Huntington est une maladie rare. Sa prévalence est de l'ordre de 5-10 pour 100 000 chez l'homme de type caucasien. Des effets fondateurs ont cependant été décrits dans certaines régions (Tasmanie, lac Maracaibo au Venezuela) où la prévalence peut atteindre 700 pour 100 000 (Wexler 2012). Celle-ci est extrêmement faible en Asie et au Japon (**Figure 4**) ainsi que pour les populations africaines, excepté les régions où les taux de mariage avec des hommes de type caucasien sont élevés (Walker 2007). La différence de prévalence des hommes de type caucasien peut s'expliquer par une fréquence plus importante du nombre de répétitions du triplet CAG compris entre 28 et 35 en comparaison aux autres populations. L'idée de l'absence d'un haplotype particulier en Asie, mais présent en Europe et plus susceptible d'une expansion a été avancée (Warby et al. 2011).

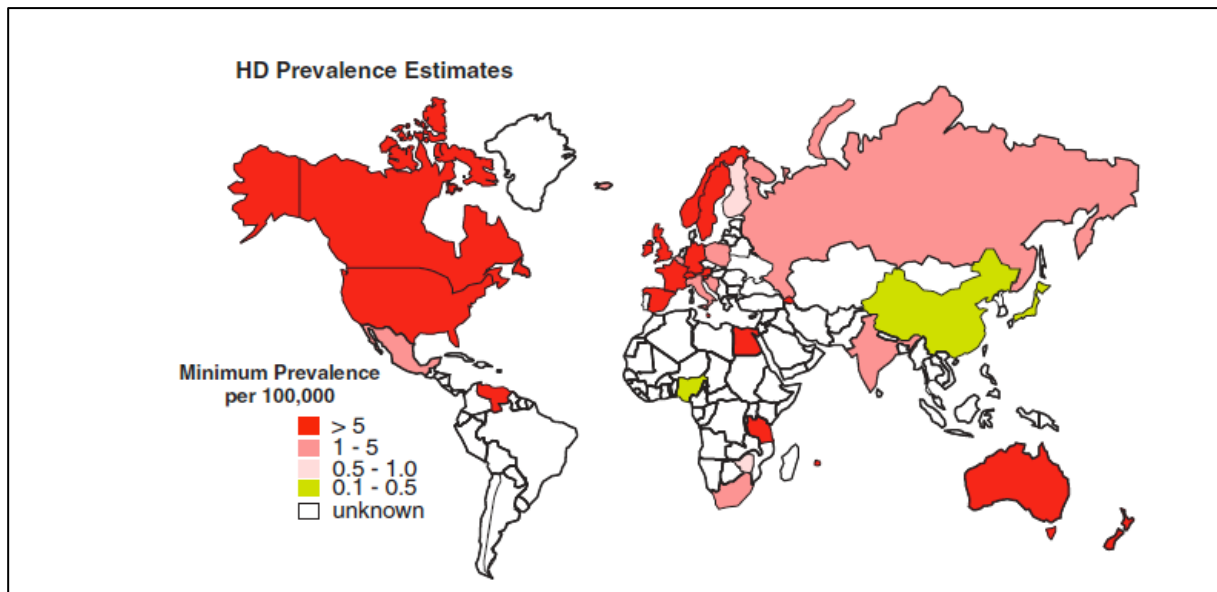


Figure 4 : Prévalence de la maladie de Huntington dans le monde (Warby et al. 2011).

Au Royaume uni, la prévalence est en cours de réévaluation. En effet, il semble que celle-ci ait été très nettement sous-estimée. De l'ordre de 7 pour 100 000 selon les chiffres officiels, Michael Rawlins avance le chiffre de 12,4 pour 100 000, voire plus (Rawlins 2010). La stigmatisation de la MH semble, en partie, expliquer pourquoi certains patients cachent leur maladie ou leur histoire familiale : discrimination à l'assurance-vie et à l'emploi par exemple (Wexler 2010).

Aux Etats-Unis, les politiques d'eugénisme, proposées pour la première fois en 1910 par Charles Davenport ont conduit à des grandes campagnes de stérilisations, parmi lesquels des patients avec la MH (Wexler 2010). Ces stigmatisations ont été catastrophiques pour les malades et leurs familles. Aujourd'hui encore, les malades peuvent ne pas révéler leur maladie ou leur histoire familiale de peur de perdre leur assurance. Le président Obama a fait promulguer en mars 2010 une loi en faveur des enfants atteints de maladies héréditaires visant à rendre obligatoire la couverture maladie par les compagnies d'assurance (Spinney 2010). Cette loi devrait s'étendre aux adultes en 2014. La prévalence estimée de 10 pour 100 000, semble donc également sous-évaluée.

1.3. La neurodégénérescence

La maladie se traduit par une neurodégénérescence du striatum, avec un élargissement des ventricules latéraux, puis du cortex (**Figure 5**)(Alexi et al. 2000).

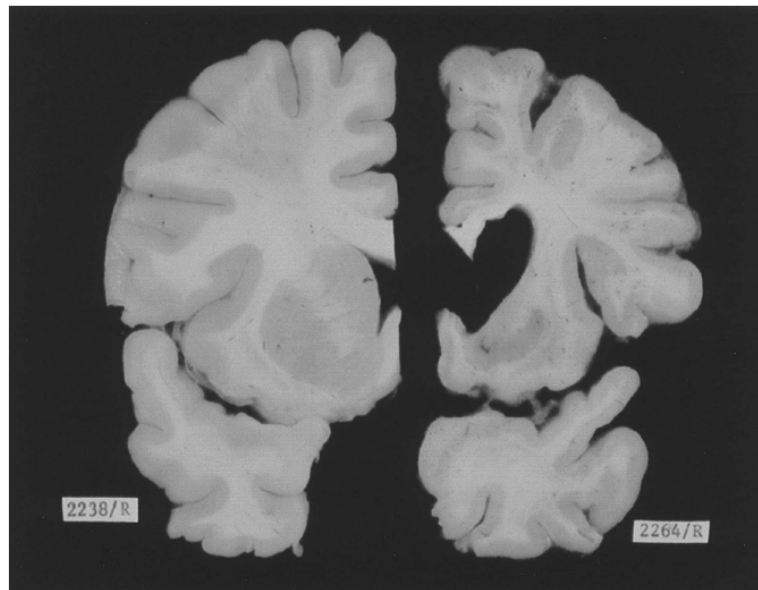


Figure 5 : Coupes coronales de cerveaux post-mortem d'un patient MH (droite) et d'un individu sain (gauche) (Alexi et al. 2000).

1.3.1. Le striatum

Le striatum fait partie des ganglions de la base. Il se compose du Noyau Caudé et du Putamen. Le striatum contient à 90% des neurones épineux moyens ("medium-sized spiny neurons" ou MSSNs) qui sont les premiers neurones à dégénérer dans la MH (Cepeda *et al.* 2007). Ces neurones sont GABAergiques et inhibiteurs.

Le striatum est le point d'entrée des afférences excitatrices des ganglions de la base. Le striatum reçoit des afférences de la plupart des régions du cortex cérébral et de noyaux thalamiques. Ces structures connectent les neurones striataux avec des synapses excitatrices glutamatergiques. De plus, des afférences dopaminergiques arrivent de la substance noire *pars compacta* (Cepeda et al. 2007). Selon que les neurones aient des récepteurs à la dopamine D1 ou D2, les MSSNs vont être soit inhibés soit activés (Purves *et al.* 2001).

Le globus pallidum agit sur le thalamus. Ce dernier est la voie de sortie des signaux moteurs. Il stimule le cortex moteur et génère la réponse motrice automatique qui suit le mouvement volontaire.

Deux voies de transmissions neuronales issues du striatum et rejoignant sur le thalamus modulent la réponse motrice : la voie directe connectant le striatum au segment interne du globus pallidum qui, à son tour, connecte le thalamus, et la voie indirecte qui relie le striatum au segment externe du globus pallidum puis au noyau sous-thalamique et au segment interne du globus pallidum qui connecte le thalamus.

La voie directe est une voie désinhibitrice faisant intervenir deux synapses inhibitrices à partir du striatum. En effet, les afférences nerveuses du cortex et de la substance noire *pars compacta* stimulent les neurones épineux moyens contenant la substance P du striatum. Ceux-ci en libérant du GABA à leurs synapses avec les neurones du segment interne du globus pallidum, conduisent à l'inhibition du segment interne du globus pallidum (**Figure 6**). Les signaux inhibiteurs du globus pallidum étant fortement réduits, ils relâchent la réponse motrice induite par le thalamus sur le cortex.

A l'inverse, la voie indirecte, *via* l'activation des neurones épineux moyens enképhaline positifs génèrent une inhibition de la réponse motrice. En effet, ceux-ci inhibent le segment externe du globus pallidum. Cette dernière structure qui inhibe le segment interne du globus pallidum et le noyau sous-thalamique, réduit son activité inhibitrice sur ces deux structures (**Figure 6**). Le noyau sous-thalamique stimule donc le segment interne du globus pallidum. Il en résulte un renforcement de l'activité inhibitrice du segment interne du globus pallidum sur le thalamus, freinant l'excitation du cortex et la réponse motrice (Purves *et al.* 2001).

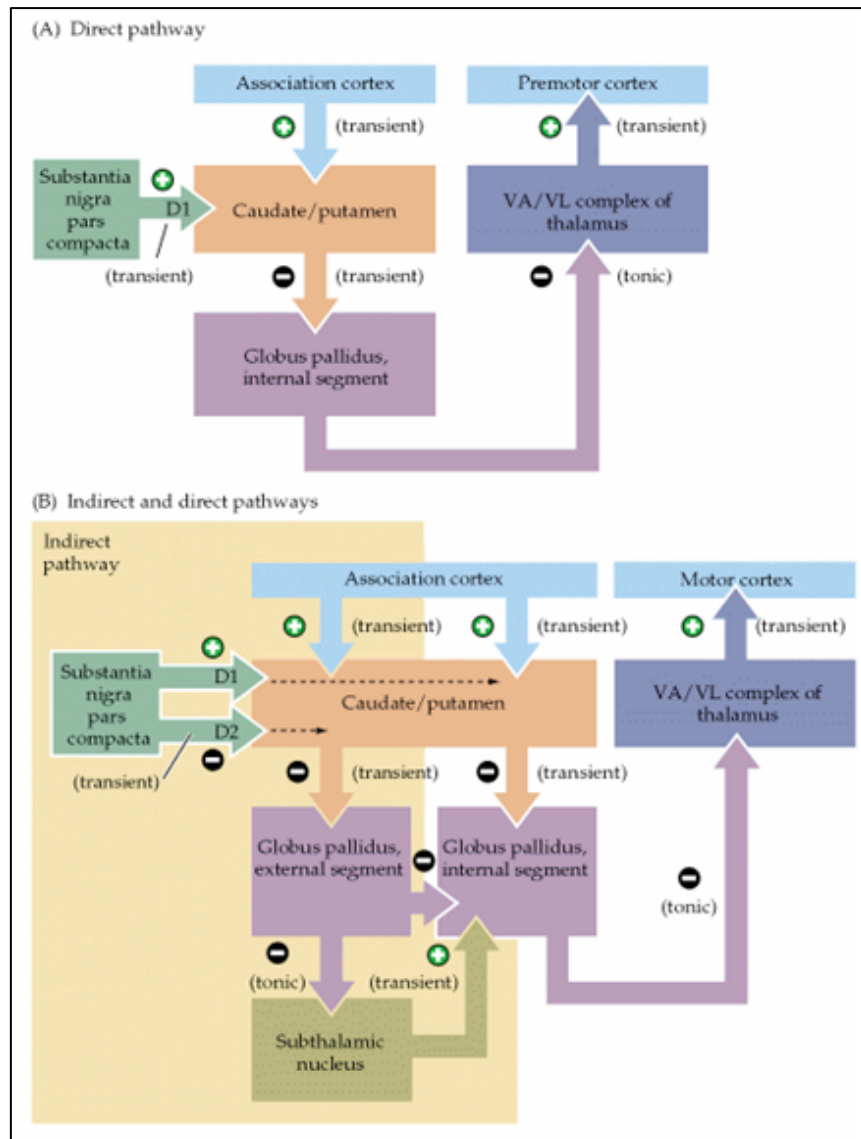


Figure 6 : Schéma illustrant les voies directe et indirecte du striatum (Purves et al. 2001).

Les neurones épineux moyens, inhibiteurs, reçoivent des afférences du cortex qui leur apportent des facteurs neurotrophiques comme le Brain-derived neurotrophic factor (ou BDNF). Dans le cadre de la maladie de Huntington, un déficit du support neurotrophique en provenance du cortex se produit (Gauthier *et al.* 2004). Ceci pourrait contribuer à la dégénérescence spécifique des MSSNs et expliquer la vulnérabilité du striatum.

La dégénérescence du striatum affecte dans un premier temps les neurones enképhaline positifs (Walker 2007) de la voie indirecte ce qui conduit à une augmentation de la désinhibition de la voie thalamo-corticale et une augmentation des

mouvements involontaires (**Figure 7**)(Sieradzan and Mann 2001). Par la suite, la voie directe est affectée, il s'ensuit une hypokinésie aux stades avancés de la maladie.

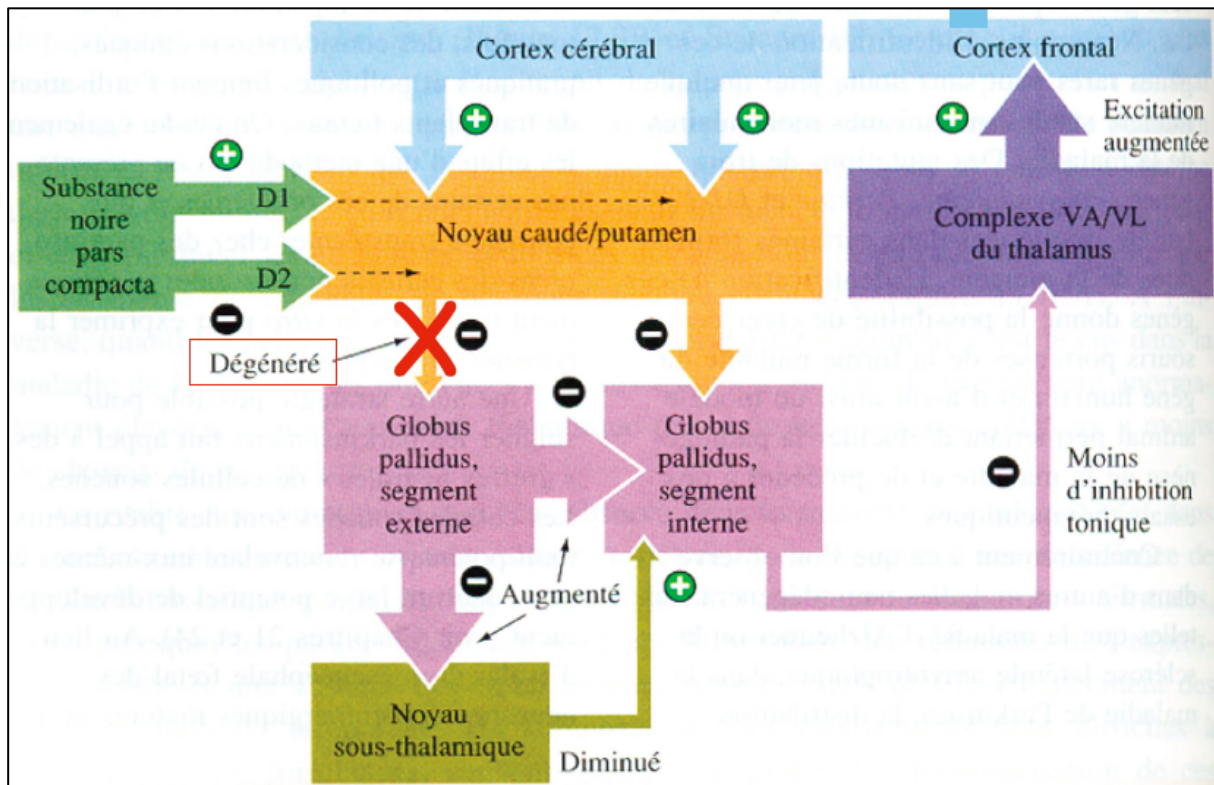


Figure 7 : Altération de la voie indirecte du striatum dans la MH. La réduction de l'inhibition du segment externe du globus pallidum conduit à un renforcement de son activité inhibitrice sur le noyau sous-thalamique et sur le segment interne du globus pallidum. Ainsi, l'activité excitatrice du thalamus n'est plus inhibée et des mouvements involontaires apparaissent.

1.3.2. Le cortex

Bien que le striatum soit la région où l'atrophie est la plus marquée, le cortex est également atteint au cours de la MH. En effet, les neurones pyramidaux dégénèrent dans de nombreuses régions du cortex : gyrus cingulaire (Cudkowicz and Kowall 1990) et gyrus angulaire du lobe pariétal (Macdonald *et al.* 1997), cortex frontal supérieur, cortex moteur (Macdonald and Halliday 2002; Thu *et al.* 2010), le cortex sensorimoteur, le cortex temporal et le cortex occipital (Rosas *et al.* 2008). Les couches III, V et VI du néocortex sont les plus affectées (Hedreen *et al.* 1991; Rosas *et al.* 2008; Thu *et al.* 2010). Chez le rat, la couche V du cortex moteur contient le plus de neurones riches en huntingtine (Fusco *et al.* 1999) et ces derniers, ainsi que les neurones de la couche III, projettent dans le striatum. La perte des neurones pyramidaux dans le cortex moteur primaire et le cortex cingulaire antérieur est, respectivement, de 27% et de 34% chez les

patients MH (Thu *et al.* 2010). Les patients présentent une grande variabilité dans le degré de neurodégénérescence de ces deux structures. De façon intéressante, l'intensité de la perte neuronale dans ces structures est associée aux symptômes moteurs et aux troubles de l'humeur (Thu *et al.* 2010). En effet, les patients qui présentent des troubles de l'humeur marqués mais des symptômes moteurs modérés, ont une réduction forte des neurones pyramidaux de la couche III du cortex cingulaire antérieur (45%) et peu de pertes neuronales dans le cortex moteur primaire (10%). La situation inverse est observée chez les patients qui présentent des symptômes moteurs (40% de perte dans le cortex moteur primaire) et peu de troubles de l'humeur (7% de perte dans le cortex cingulaire antérieur)(Thu *et al.* 2010). Enfin, les patients avec des symptômes mixtes ont des pertes importantes dans les deux régions (33% dans le cortex moteur primaire et 47% dans le cortex cingulaire antérieur). Le cortex cingulaire antérieur s'atrophie progressivement entre le stade prodromal et le début de la phase symptomatique (Hobbs *et al.* 2011).

1.4. Le gène et la mutation pathologique

1.4.1. Identification du gène

Le gène responsable de la maladie a été identifié en 1993 par un consortium international (The Huntington's disease collaborative research group, 1993), après environ vingt années de recherche intensive. Les échantillons de patients, qui ont permis cette découverte, provenaient d'une région vénézuélienne (au bord du lac Maracaïbo) où la prévalence de la MH est d'environ 700 pour 100 000 et dont le membre fondateur, qui a transmis la mutation sur plusieurs générations, a été identifié par l'équipe de Nancy Wexler avec Americo Negrette (Bates 2005; Wexler 2012). Cette mutation consiste en une expansion du triplet de nucléotides CAG sur le gène IT15 (interesting transcript 15). Elle correspond à une expansion de glutamines sur la protéine codée appelée huntingtine (HTT).

Le gène IT15, situé dans le bras court du chromosome 4 (région 4p16.3), se compose de 67 exons et de 3144 acides aminés. La mutation est localisée sur l'exon 1 en position N-terminale. Ce gène est retrouvé chez tous les métazoaires et présente un degré de conservation élevé chez les vertébrés (Schulte and Littleton 2011). Ainsi, 3 domaines majeurs sont conservés et correspondent chez l'homme aux régions situées

entre les acides aminés 1 et 386, 683 et 1586, et pour le dernier entre 2437 et 3078 (Tartari *et al.* 2008). Le nombre de répétitions CAG est de 4 chez les poissons, les oiseaux et les amphibiens. Les rongeurs (souris et rat) ont respectivement 7 et 8 répétitions (Zuccato *et al.* 2010). La présence des répétitions CAG est spécifique des organismes de type deutérostomien (Tartari *et al.* 2008). Le nombre de répétition CAG est polymorphique chez l'homme et est compris entre 16 et 20 dans la population générale (Warby *et al.* 2011).

1.4.2. Caractérisation de la mutation

La mutation se transmet de façon autosomale dominante. En d'autres termes, la descendance d'un patient MH a 50% de chance d'avoir un allèle muté et de développer la maladie.

Les variations normales extrêmes du nombre de triplets CAG sont comprises entre 9 et 35 répétitions. Entre 35 et 39 répétitions, la pénétrance est réduite mais au-delà de 40, celle-ci est totale (**Table 1**) (Bates 2005). Par ailleurs, il a été démontré que plus le nombre de répétitions est élevé, plus les symptômes apparaissent tôt. Les répétitions les plus élevées étant associées à des formes juvéniles de la maladie (allant jusqu'à 100 répétitions). Cependant, l'âge d'apparition des symptômes ne dépend pas exclusivement du nombre de répétitions, des facteurs environnementaux et génétiques étant également impliqués. En effet, on estime que le nombre de répétition contribue à l'âge de début de la maladie à hauteur de 50/60 % (Wexler 2012).

Number of CAG repeats	Risk of transmitting the disease	Age of onset and progression of the disease
<28	No risk	Unaffected
28-35	Intermediate (point mutations can lead to an increase in the number of CAG repeats)	Unaffected
35-40	Reduced penetrance	Possibility of manifesting the disease at an older age
40-50	Complete penetrance	Disease is manifested during adulthood and progresses over a period of 15-20 years.
>50	Complete penetrance	Disease is manifested during the juvenile period and progresses over a period of less than 10 years.

Table 1: Classification du risque de développer la MH en fonction du nombre de répétitions de CAG (Gil-Mohapel *et al.* 2011).

Le nombre de répétitions s'accroît au cours des générations. Celui s'accroît d'autant plus facilement lors d'une transmission paternelle de la mutation (**Figure 8**) (Ranen *et al.* 1995). Au delà de 46 répétitions, l'expansion devient instable entre les générations. Il en résulte une anticipation de l'âge d'apparition des symptômes avec ces

allongements successifs de la répétition polyQ au cours des générations successives (Ranen *et al.* 1995). Ainsi, les formes juvéniles (plus de 60 répétitions CAG) sont le plus souvent le résultat d'une transmission paternelle (Zuccato *et al.* 2010). Ceci est la conséquence d'un risque plus grand d'instabilité de l'expansion polyQ dans les spermatozoïdes au cours des mitoses (Pearson 2003; Zuccato *et al.* 2010). Cette instabilité est induite par des glissements des séquences CAG au cours de la réplication (Pearson 2003). Les enzymes de réparation de l'ADN telles que Msh2 (MutS homologue 2) et Msh3 sont susceptibles d'accroître le nombre des répétitions. En effet, l'inactivation de Msh2 et Msh3 chez la souris prévient l'instabilité des répétitions CAG (Manley *et al.* 1999; Dragileva *et al.* 2009).

L'instabilité de l'expansion CAG est également observée dans les neurones postmitotiques du cerveau, créant ainsi un mosaïcisme somatique. Les neurones du striatum sont caractérisés par un taux élevé, et progressif au cours du temps, d'instabilité de l'expansion (Kennedy and Shelbourne 2000; Gonitell *et al.* 2008). Par ailleurs, le mosaïcisme somatique n'est pas le même dans toutes les cellules. Chez la souris, les cellules de la queue et la rate ont des expansions très stables tandis que dans les cellules du foie et du striatum, les expansions sont particulièrement instables (Lee *et al.* 2011). Enfin, le degré d'instabilité au sein des neurones du cortex influe sur l'âge d'apparition de la maladie. Plus l'expansion somatique est importante, plus l'âge de début d'apparition des symptômes diminue (Swami *et al.* 2009).

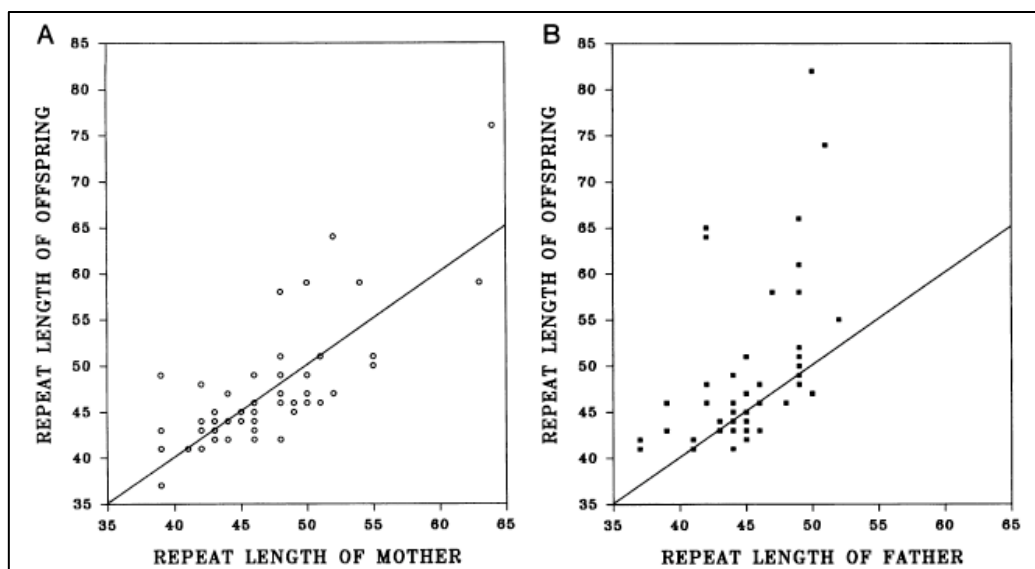


Figure 8 : Comparaison de la longueur de l'expansion polyQ de la mère ou du père et de leurs enfants (Ranen *et al.* 1995).

2. La protéine huntingtine

La HTT est ubiquitaire. Elle est cependant plus fortement exprimée dans les cellules du cerveau et des testicules. La HTT est une grande protéine de 348 kDa avec 4 clusters de répétitions HEAT (**Figure 9**)(Ross and Tabrizi 2011). Ces répétitions HEAT qui contiennent environ 50 acides aminés sont nommées ainsi en référence aux quatre protéines où elles ont été décrites : la HTT, le facteur d'élongation 3 (Elongation factor 3), la sous-unité PR65/A de la protéine phosphatase 2A et la lipid kinase TOR1 (Ehrnhoefer *et al.* 2011). Quatre régions riches en proline (P), acide glutamique (E), sérine (S) et thréonine (T), appelées PEST, contiennent la plupart des sites de modifications post-traductionnelles (Warby *et al.* 2008; Ehrnhoefer *et al.* 2011). Trois de ces PEST sont localisées entre les clusters de répétitions HEAT. Un signal d'export nucléaire (NES) en région C-terminale (Xia *et al.* 2003) et un signal de rétention cytoplasmique en région N-terminale (Rockabrand *et al.* 2007) sont présents également sur la HTT.

La HTT forme un solénoïde avec un noyau hydrophobique constitué de répétitions HEAT empilées (Ehrnhoefer *et al.* 2011). En effet, les domaines HEAT s'assemblent en structures tridimensionnelles appelées alpha-ROD (Palidwor *et al.* 2009). Ces structures sont composées de paires anti-parallèles d'hélice alpha. Trois domaines organisés en alpha-ROD sont décrits pour la HTT : des acides aminés 114 à 413, de 672 à 969 et de 2667 à 2938 (Palidwor *et al.* 2009). Les domaines HEAT forment des régions protéiques essentielles pour les interactions protéine-protéine (Zuccato *et al.* 2010). Ainsi, la HTT s'associe à de nombreux autres partenaires protéiques (Kaltenbach *et al.* 2007; Ratovitski *et al.* 2012). Ceci permet la formation de complexes protéiques modulant diverses fonctions cellulaires.

La région polyQ s'organise en structure appelé « polar zipper » (Perutz *et al.* 1994). Par ailleurs, la région polyQ adopte diverses conformations : hélice alpha, boucle étendue et bobine aléatoire (Zuccato *et al.* 2010).

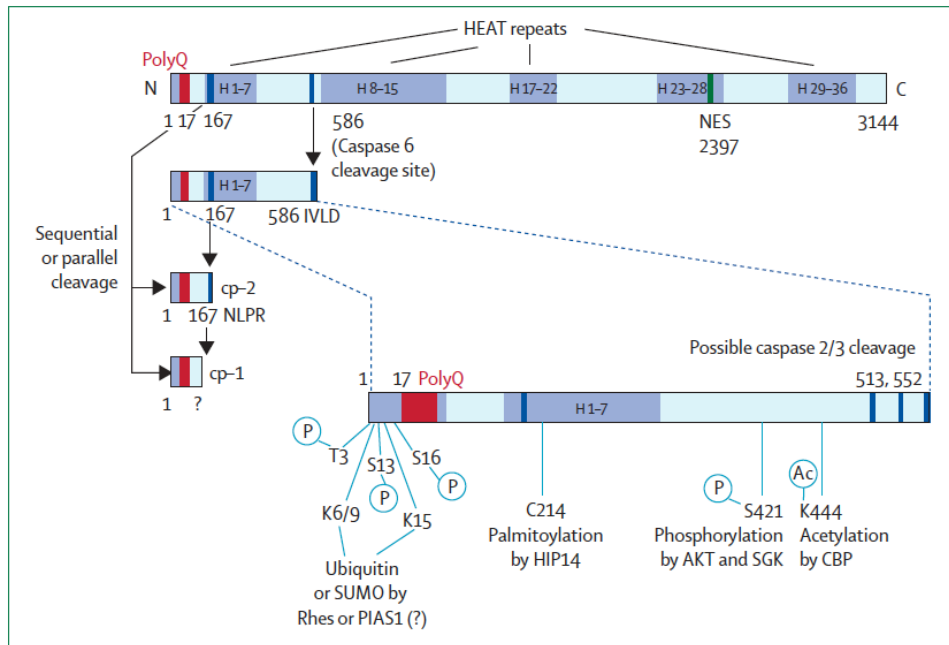


Figure 9 : Schéma de la protéine HTT illustrant les positions des domaines HEAT, de la région polyQ et de sites de modifications post-traductionnelles en position N-terminale (Ross and Tabrizi 2011).

La HTT est localisée principalement dans le cytoplasme où elle est associée à des organites intracellulaires : réticulum endoplasmique, golgi et mitochondries (Hilditch-Maguire *et al.* 2000; Hoffner *et al.* 2002; Strehlow *et al.* 2007; Zuccato *et al.* 2010). Elle s'associe également aux microtubules et aux synapses où elle est retrouvée associée aux vésicules recouvertes de clathrine, aux endosomes et aux cavéoles (DiFiglia *et al.* 1995; Velier *et al.* 1998; Li *et al.* 2003). Enfin la HTT est également retrouvée dans le noyau.

2.1. Les modifications post-traductionnelles

La HTT native est l'objet de nombreuses modifications post-traductionnelles. Elles permettent à la protéine de réguler ses fonctions *via* notamment des modulations de son affinité avec ses différents partenaires protéiques, sa localisation subcellulaire, sa protéolyse ou sa dégradation (Ehrnhoefer *et al.* 2011). La HTT fait l'objet de 6 types de modifications post-traductionnelles : l'acétylation, la phosphorylation, la SUMOylation, l'ubiquitination, la palmitoylation et la protéolyse (**Figure 10**). Cette dernière modification sera traitée dans la section 2.2.1.

2.1.1. Acétylation

La HTT peut être acétylée sur la lysine en position K444 (Jeong *et al.* 2009; Ehrnhoefer *et al.* 2011). La protéine CBP (CREB-binding protein) est l'acétyl-transférase qui catalyse cette réaction tandis que la dé-acétylation est due à l'histone dé-acétylase 1 (HDAC1).

2.1.2. SUMOylation et ubiquitination

La SUMOylation consiste en l'addition de SUMO-1 (small ubiquitin like modifier) par liaison covalente sur des résidus lysines. De la même manière, l'ubiquitination consiste en l'ajout d'une molécule d'ubiquitine (8 kDa) sur le même type de résidu.

La HTT est l'objet de ces deux types de modifications post-traductionnelles. Celles-ci sont en compétition pour les mêmes lysine-cibles en position 6, 9 et 15 de la région N-terminale (**Figure 10**)(Steffan *et al.* 2004). L'ubiquitine ligase E2-25K est impliquée dans l'ubiquitination de la HTT (Kalchman *et al.* 1996) et la E3 ligase Rhes (Ras homolog enriched in striatum) est impliquée dans la SUMOylation (Okamoto *et al.* 2009; Subramaniam *et al.* 2009).

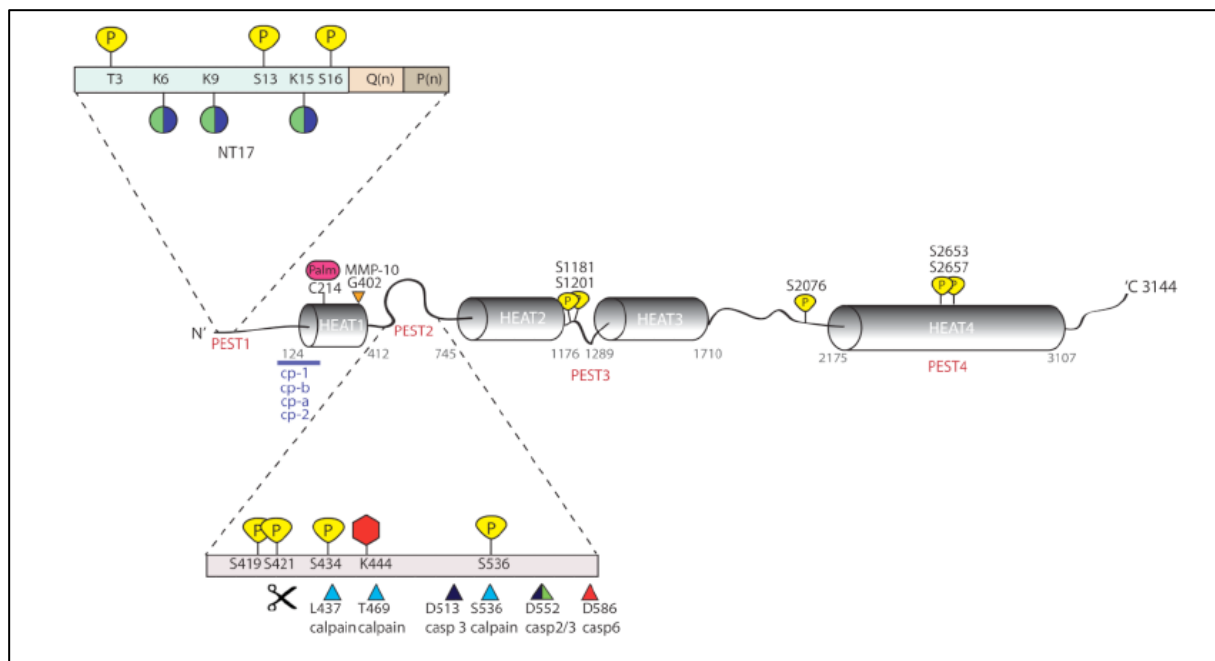


Figure 10 : Schéma illustrant les différents sites de modifications post-traductionnelles sur la protéine HTT (Ehrnhoefer *et al.* 2011). Les ronds pleins vert et bleu indiquent les sites de SUMOylation et d'ubiquitinylation. Les ovales jaunes indiquent les sites de phosphorylations.

2.1.3. Phosphorylations

Cette modification consiste en l'addition de groupements phosphates sur des résidus sérine, thréonine ou tyrosine.

La HTT est l'objet d'un nombre important de phosphorylations par différentes kinases (**Figure 11**). Les sérines 13 et 16 sont phosphorylées par le complexe IKK (Thompson *et al.* 2009). La sérine 421 (S421) est l'objet également de phosphorylations. Les kinases pour ce site sont Akt et SGK (Humbert *et al.* 2002; Rangone *et al.* 2004). Les phosphatases pour le site 421 sont PP1, PP2A et PP2B (calcineurine) (Pardo *et al.* 2006; Metzler *et al.* 2010). Les sérines S434, S1181 et S1201 sont phosphorylées par Cdk5 (et/ou CDC2) (Luo *et al.* 2005; Anne *et al.* 2007). Trois autres sites de phosphorylations avec des séquences consensus correspondantes à la kinase ERK1 (S2076, S2653 et S2657) ont été identifiés par spectrométrie de masse sur des modèles cellulaires (293T et PC12) qui expriment la HTT pleine longueur sauvage (23Q) ou mutée (148Q) (Schilling *et al.* 2006).

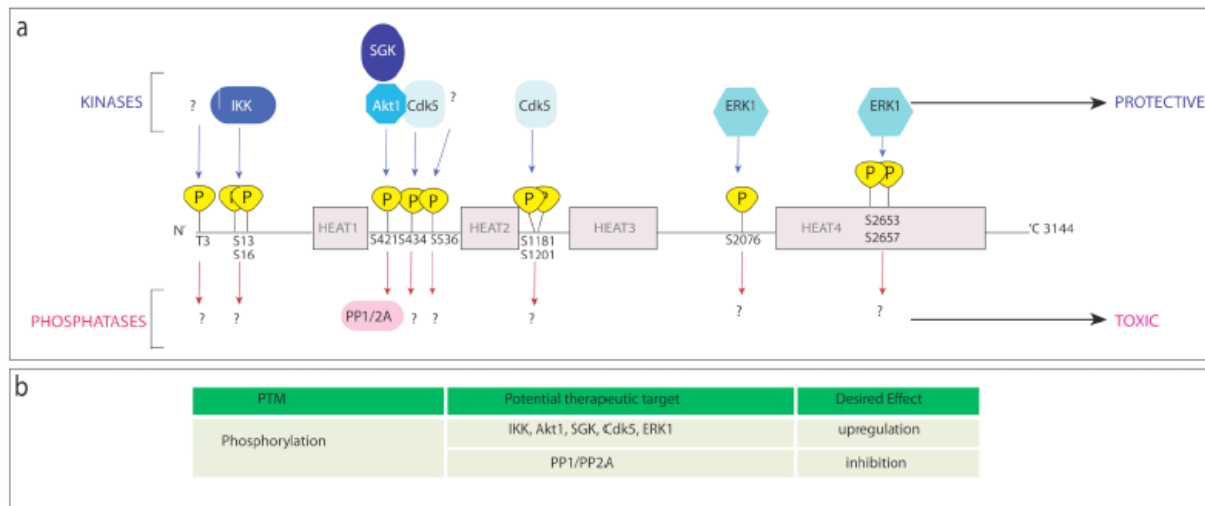


Figure 11 : Les sites de phosphorylations connus de la HTT (Ehrnhoefer *et al.* 2011). (a) Localisation des sites de clivage avec l'indication des kinases et des phosphatases lorsqu'elles sont connues. (b) Tableau indiquant les cibles thérapeutiques potentielles pour traiter la MH avec l'effet recherché sur la kinase ou la phosphatase.

2.1.4. Palmitoylation

Cette modification correspond à l'ajout d'un acide palmitique (un acide gras saturé) sur une cystéine *via* une liaison thioester (Ehrnhoefer *et al.* 2011).

La HTT est palmitoylée sur la cystéine en position 214 par les palmitoyl-transférases HIP14 et HIP14L (Yanai *et al.* 2006; Huang *et al.* 2009).

2.2. Les fonctions de la huntingtine

La HTT possède des propriétés anti-apoptotiques et exerce des fonctions transcriptionnelles, de transport, d'endocytose et dans la ciliogenèse. La HTT est également impliquée dans le développement embryonnaire à différents niveaux. Ce rôle sera discuté dans le chapitre 8 de la deuxième partie.

2.2.1. Propriétés anti-apoptotiques

L'inactivation totale de la HTT dans le cerveau et les testicules conduit à une dégénérescence et une stérilité chez l'adulte (Dragatsis *et al.* 2000). Le taux élevé de mort neuronale dans ce modèle a mis en évidence *in vivo* les propriétés anti-apoptotiques de la HTT. La HTT a également des propriétés anti-apoptotiques en réponse à différents stimuli dont la toxicité liée à la mutation polyQ.

Protection contre les stimuli apoptotiques

La surexpression de la HTT normale *in vitro* inhibe la mort neuronale induite par le 3NP, la suppression du sérum ou la transfection de gènes pro-apoptotiques (Rigamonti *et al.* 2000).

De plus, cette fonction anti-apoptotique a aussi été mise en valeur *in vivo* par la réponse protectrice de la surexpression de la HTT dans les souris transgéniques YAC18 dans une situation induisant l'apoptose par excitotoxicité *via* l'injection d'acide quinolinique dans le striatum (Leavitt *et al.* 2006), ou après induction d'une ischémie (Zhang *et al.* 2003).

La HTT protège également contre la toxicité induite par la forme polyQ. En effet, l'équipe dirigée par David Rubinsztein a montré que la surexpression de la HTT pleine longueur sauvage réduit la toxicité induite par l'exon 1 avec 72 glutamines dans des lignées neuronale (neuroblastomes humains) et non neuronale (COS 7)(Ho *et al.* 2001). Le modèle murin YAC72 dont la HTT endogène est supprimée, présente une apoptose cellulaire massive dans les testicules qui est abolie par la restauration du dosage de la HTT (Leavitt *et al.* 2001).

Mécanismes anti-apoptotiques

L'induction de signaux apoptotiques par les voies intrinsèque et extrinsèque, conduit à la libération du cytochrome c hors des mitochondries. Le cytochrome c recrute Apaf1 et la procaspase 9 pour former l'apoptosome. Celui-ci clive la procaspase 9 inactive en caspase 9 active. La surexpression de la HTT n'empêche pas la libération du cytochrome c mais bloque l'activation de la caspase 9 en agissant directement sur l'apoptosome (Rigamonti *et al.* 2001). Au final, l'inhibition de cette voie prévient l'activation de la caspase 3 et l'apoptose.

Par ailleurs, la HTT interagit physiquement directement avec la forme active de la caspase 3 pour bloquer son activité (Zhang *et al.* 2006). En effet, l'inactivation du gène de la HTT active la caspase 3 et sa surexpression réduit l'activité de cette enzyme.

La HTT est également impliquée dans la voie extrinsèque de mort cellulaire qui met en jeu le récepteur de mort Fas et la caspase 8. En effet, la HTT interagit normalement avec Hip1 (huntingtin interacting protein 1). Lorsque Hip1 est libre, il forme un complexe avec HIPPI (hip1 protein interactor). Ce complexe recrute la caspase 8 et induit l'apoptose par la voie extrinsèque. Ainsi, la HTT induit un effet anti-apoptotique par la séquestration de Hip1 (Gervais *et al.* 2002). De plus, la HTT interagit avec Pak2 (p21-activated kinase 2) qui est également un médiateur de la mort cellulaire. En réponse à des signaux dépendants de Fas, le clivage de Pak2 par les caspases 3 et 8 conduit à son activation. La surexpression de la HTT inhibe le clivage de Pak2 dans les cellules (Luo and Rubinsztein 2009).

2.2.2. Transcription

La HTT active ou inhibe la transcription de nombreux gènes *via* son interaction avec différents facteurs de transcription comme SP1, p53, CA150, REST/NRSF ou NcoR (Boutell *et al.* 1999; Steffan *et al.* 2000; Holbert *et al.* 2001; Zuccato *et al.* 2003; Zuccato *et al.* 2007). Par exemple, la HTT active l'expression de gènes dépendant de SP1 et REST/NRSF et réprime la transcription des gènes dépendant de NcoR et p53.

Activation de la transcription

Le facteur activateur de la transcription SP1 (specificity protein 1) et son co-activateur TAFII130 (TBP associated factor II 130) qui est une sous-unité de TFIID,

interagissent tous les deux avec la HTT (Dunah *et al.* 2002). Sp1 se lie aux séquences promotrices contenant des éléments riches en GC (Li *et al.* 2002). Sp1 recrute TFIID au niveau du promoteur pour activer la transcription génique de gènes comme le récepteur D2 de la dopamine (Dunah *et al.* 2002) ou le récepteur du NGF (nerve growth factor)(Li *et al.* 2002). Le rôle de la HTT au sein de ce complexe n'est pas élucidé mais elle pourrait faciliter leurs interactions pour induire la transcription des gènes cibles.

La HTT régule les gènes contenant dans leurs régions régulatrices des séquences RE1/NRSE. Ces séquences régulatrices RE1/NRSE sont présentes dans 1301 gènes et 997 gènes, respectivement chez l'homme et la souris (Johnson *et al.* 2006). Le facteur de transcription neuronale REST/NRSF se lie sur des séquences RE1/NRSE (neuron restrictive silencer element) qui répriment l'expression génique (Zuccato *et al.* 2003). La HTT n'interagit pas directement avec REST/NRSF mais elle est dans un complexe protéique comprenant p150^{Glued}, HAP1 et RILP. C'est cette dernière protéine qui interagit avec REST/NRSF (Shimojo 2008). Ainsi, la HTT au sein de ce complexe séquestre dans le cytoplasme le facteur de transcription REST/NRSF. Au final, la surexpression ou l'inactivation de la HTT, respectivement, augmente ou réduit l'expression de nombreux gènes contenant des séquences RE1/NRSE *in vitro* et *in vivo* (Zuccato *et al.* 2003; Zuccato *et al.* 2007).

Parmi les gènes contenant une séquence RE1/NRSE, on retrouve le gène du facteur neurotrophique dérivé du cerveau (Brain-derived neurotrophic factor ou BDNF). Ce facteur est particulièrement important dans la MH car il est nécessaire au maintien des synapses et à la survie des neurones. Cependant, le striatum n'en produit pas et l'essentiel du BDNF provient du cortex *via* les connexions cortico-striatales (Altar *et al.* 1997). L'inactivation du gène du BDNF spécifiquement dans le cortex réduit la survie à long terme des neurones épineux moyens du striatum (Baquet *et al.* 2004). Le BDNF contenant des séquences RE1/NRSE est soumis à cette régulation. *In vitro*, La surexpression de la HTT accroît la production de BDNF et, *in vivo*, les souris transgéniques YAC18, surexprimant la HTT native, ont des taux plus élevés de BDNF dans le cortex (Zuccato and Cattaneo 2007). La séquestration par la HTT sauvage de REST/NRSF, favorise l'expression de l'exon II du BDNF (Zuccato *et al.* 2003).

Répression de la transcription

La HTT réprime la transcription en interagissant avec NCoR (nuclear receptor co-repressor)(Boutell *et al.* 1999). Ce dernier réprime la transcription en formant un complexe avec mSin3 et des histones déacétylases. La HTT module l'activité de ce complexe et les gènes dont la régulation en dépend (Luthi-Carter *et al.* 2000).

La HTT régule également la transcription des gènes dépendants de p53 en interagissant directement avec cette protéine (Steffan *et al.* 2000).

2.2.3 Le Transport axonal

Dans les neurones, les protéines produites dans le soma et destinées à la synapse, doivent être transportées le long des microtubules pour rejoindre les terminaisons axonales : c'est le transport axonal. Des moteurs moléculaires ATP-dépendants tels que les kinésines et la dynéine, sont mis en jeu pour assurer ces mouvements.

La HTT interagit avec des complexes protéiques du transport axonal (Gunawardena and Goldstein 2005). La protéine HAP1 (huntingtin-associated protein-1) est transportée dans les axones et interagit avec la sous-unité p150^{Glued} de la dynactine (Engelender *et al.* 1997; Li *et al.* 1998; Borrell-Pages *et al.* 2006) et avec la HTT (Li *et al.* 1995). La HTT interagit aussi directement avec la Dynéine (Caviston *et al.* 2007). Cette dernière est un composant essentiel du moteur moléculaire formé par le complexe Dynéine/Dynactine. HAP1 interagit également avec la chaîne légère de la kinésine (McGuire *et al.* 2006).

L'ablation de la HTT chez la drosophile entraîne des défauts de transport axonal et la dégénérescence de l'œil (Gunawardena *et al.* 2003). La diminution du dosage de la HTT perturbe le transport des mitochondries qui deviennent progressivement immobiles (Trushina *et al.* 2004). Des anticorps dirigés contre la HTT inhibent le transport vésiculaire (Caviston *et al.* 2007). Ainsi, ces résultats indiquent que la HTT module le transport axonal.

Le transport de facteur neurotrophique comme le BDNF est également facilité par la HTT. Le BDNF est nécessaire au maintien des synapses et à la survie des neurones. Comme dit précédemment, le BDNF est produit par les neurones corticaux et transporté

au striatum par les afférences cortico-striatales (Altar *et al.* 1997). La HTT et le BDNF colocalisent dans les neurones du cortex (Fusco *et al.* 2003).

Notre équipe a mis en évidence cette nouvelle fonction de la HTT (Gauthier *et al.* 2004). En effet, la surexpression de la HTT augmente le transport axonal de BDNF le long des microtubules dans des cellules neuronales. Ceci passe par l'interaction avec HAP1 qui permet le recrutement des moteurs moléculaires (**Figure 12**).

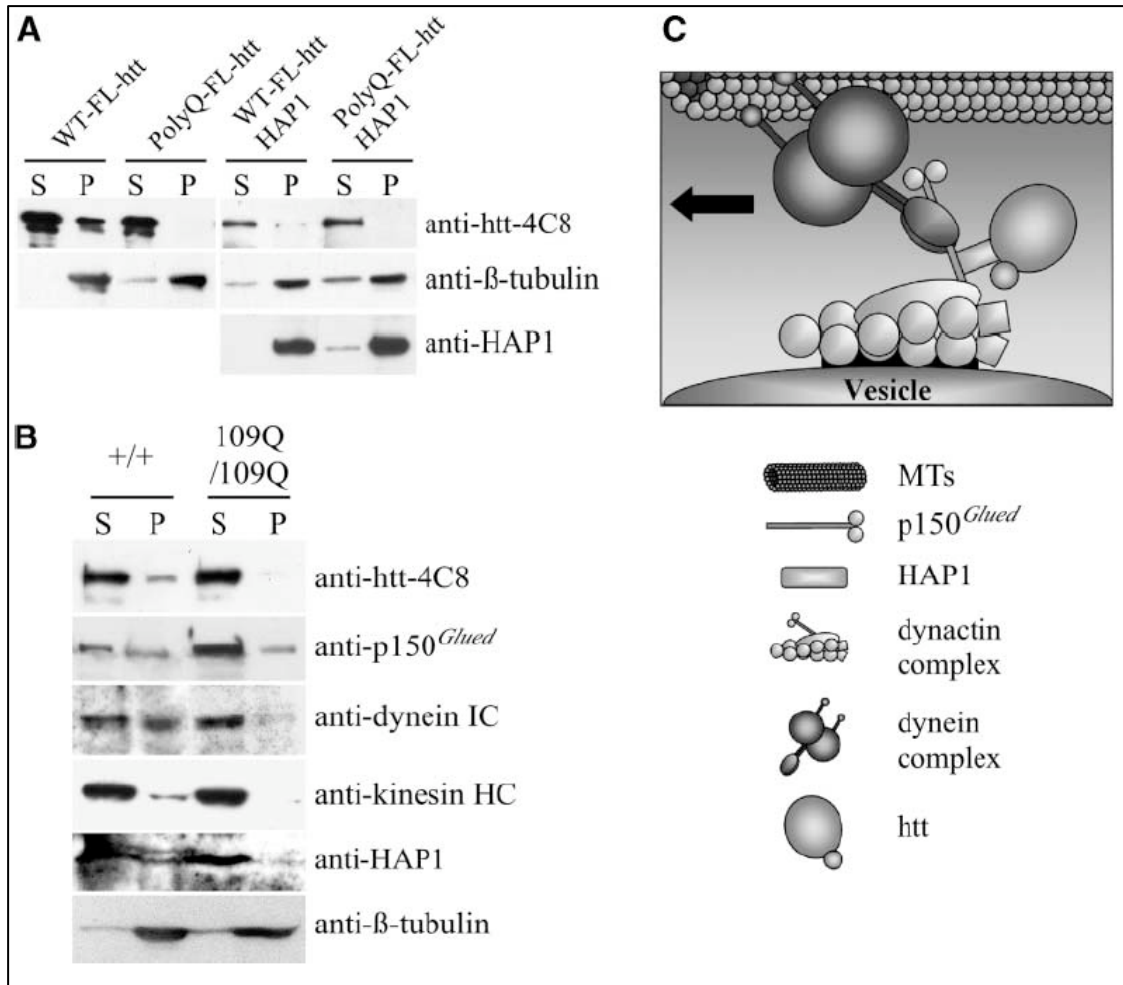


Figure 12 : La HTT module le transport axonal des vésicules de BDNF en modulant l'association des moteurs moléculaires aux microtubules et cette fonction est altérée en condition polyQ (Gauthier *et al.* 2004). (A) Préparation de microtubules à partir de cellules exprimant la WT-FL-htt ou la PolyQ-FL-htt en l'absence ou en la présence de HAP1. Les immunoblots montrent une réduction de l'association de la HTT polyQ aux microtubules. (B) Préparation de microtubules à partir de cellules knock in +/+ et 109Q/109Q. Le culot (P) contient les microtubules. Les moteurs moléculaires s'associent moins aux microtubules en situation 109Q/109Q par rapport à la situation sauvage. (C) Schéma illustrant l'association des complexes moteurs et de la HTT aux microtubules.

La HTT module également le transport des endosomes et des lysosomes (Caviston *et al.* 2011). En effet, dans la lignée de cellules cancéreuses Hela, l'inactivation

de la HTT conduit à la dispersion des lysosomes et des endosomes. La réexpression de la HTT pleine longueur restaure cette localisation. Dans ce modèle, la HTT facilite le transport de ces organites dépendants de la dynéine en régulant leurs associations au cytosquelette (Caviston *et al.* 2011).

De façon intéressante, la fonction de la HTT dans le transport axonal est modulée par son statut de phosphorylation sur la S421 (Colin *et al.* 2008). En effet, la phosphorylation de la HTT en S421 stimule le transport antérograde, c'est-à-dire vers la partie distale des axones (Colin *et al.* 2008). Ceci est induit par une modification de l'association des complexes moteurs avec la kinésine-1 en fonction du statut de phosphorylation en S421. D'une façon générale, les kinésines stimulent le transport dans le sens antérograde tandis que les dynéines stimulent le sens rétrograde. La phosphorylation à la S421 agit comme un interrupteur dictant la directionnalité du transport (Colin *et al.* 2008). La phosphorylation en S421 en favorisant l'association de la kinésine-1 au complexe moteur, va promouvoir le sens antérograde. A l'inverse, l'absence de phosphorylation, réduit l'association de la kinésine-1 et donc favorise le sens rétrograde (**Figure 13**).

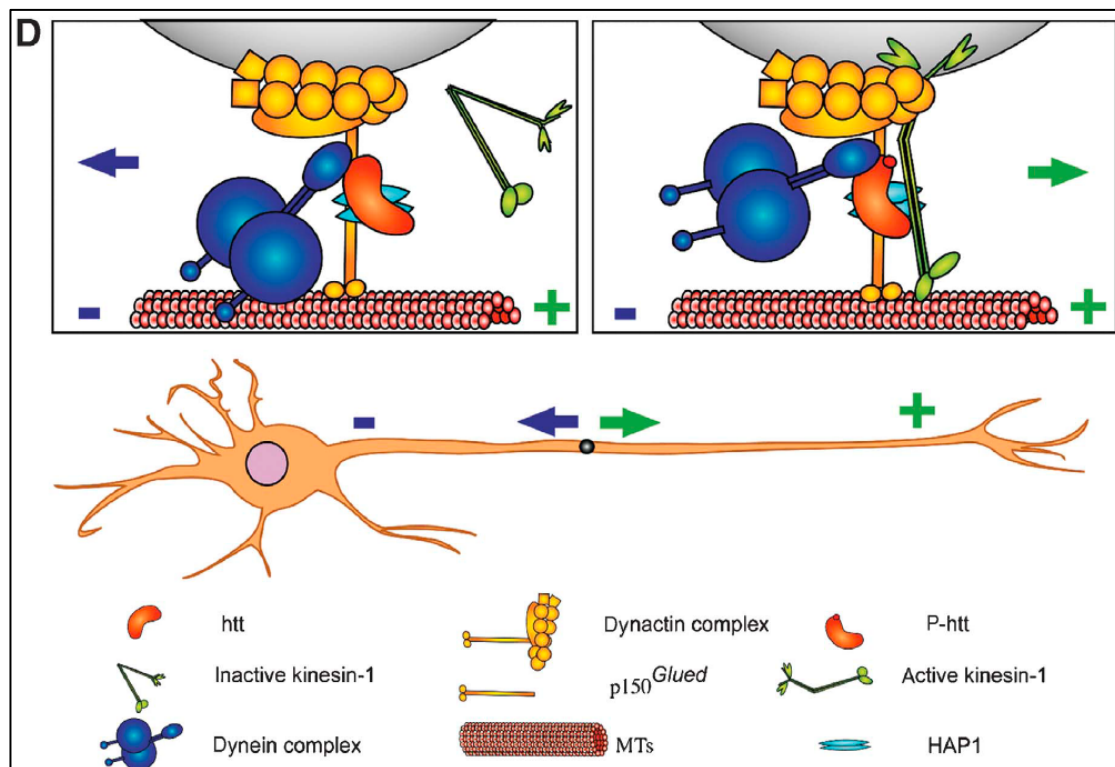


Figure 13 : Modèle illustrant le rôle de la phosphorylation en S421 sur la directionnalité du transport axonal (Colin *et al.* 2008). Le recrutement de la kinésine par la HTT phosphorylée favorise le transport antérograde.

2.2.4. L'endocytose

La HTT permet également le transport sur des courtes distances le long de l'actine du cortex cellulaire, modulant les voies d'endocytose (Schulte and Littleton 2011). L'inactivation de la HTT chez le poisson zèbre altère le trafic des vésicules d'endocytose de fer (Hilditch-Maguire *et al.* 2000). La HTT interagit avec le complexe Hap40 (HTT associated protein 40) et inhibe l'accrochage et la motilité des endosomes précoces sur les microtubules (Pal *et al.* 2006).

La HTT est présente sur les vésicules à clathrine, *via* son interaction avec HIP1 (huntingtin interacting protein 1). HIP1 en complexe avec HIP1R permet la liaison entre l'actine et la clathrine à la membrane plasmique (**Figure 14**). HIP1 et HTT s'associent également à AP-2 (Metzler *et al.* 2001). Ainsi, la HTT pourrait jouer un rôle dans la formation des puits recouverts de clathrine au cours de l'endocytose en modulant l'association et le recrutement à la membrane de HIP1, AP-2 et la clathrine (Harjes and Wanker 2003).

La HTT interagit également avec la PACSIN1 (PKC and CK2 substrate in neurons 1)(Modregger *et al.* 2002). Cette dernière protéine est impliquée dans l'endocytose régulée par la clathrine et interagit avec la synaptojanine qui régule le pool de phosphoinositides nécessaire à l'endocytose (Harjes and Wanker 2003).

Enfin, la HTT interagit avec HIP14 (huntingtin interacting protein 14), la syntaxine et l'endophilin A, des protéines impliquées aussi dans le recyclage des récepteurs et des vésicules synaptiques (Zuccato *et al.* 2010).

pathologique (Wexler *et al.* 1987), n'indiquent pas que la HTT n'est plus fonctionnelle. Si tel était le cas, les homozygotes ne seraient pas viables. De plus, l'expression seule d'une longue chaîne de glutamines (Ikeda *et al.* 1996), ou l'expression d'une expansion polyQ dans un autre contexte protéique, une protéine métabolique non spécifiquement neuronale (Ordway *et al.* 1997) suffit à induire la toxicité.

Cependant, ces dernières années, de nouvelles données indiquent que la mutation pathologique engendre des pertes de fonctions et permettent d'affiner la compréhension de la maladie (Zuccato *et al.* 2010). Plus particulièrement, l'inactivation de la HTT chez l'adulte conduit à un phénotype dégénératif dans le cerveau (Dragatsis *et al.* 2000).

A l'heure actuelle, la communauté scientifique admet que la pathologie résulte à la fois du gain de fonctions toxiques et de la perte de certaines des fonctions natives de la HTT. Plusieurs événements ont été décrits (résumés dans sur la **Figure 15**) et sont abordés dans la section qui suit.

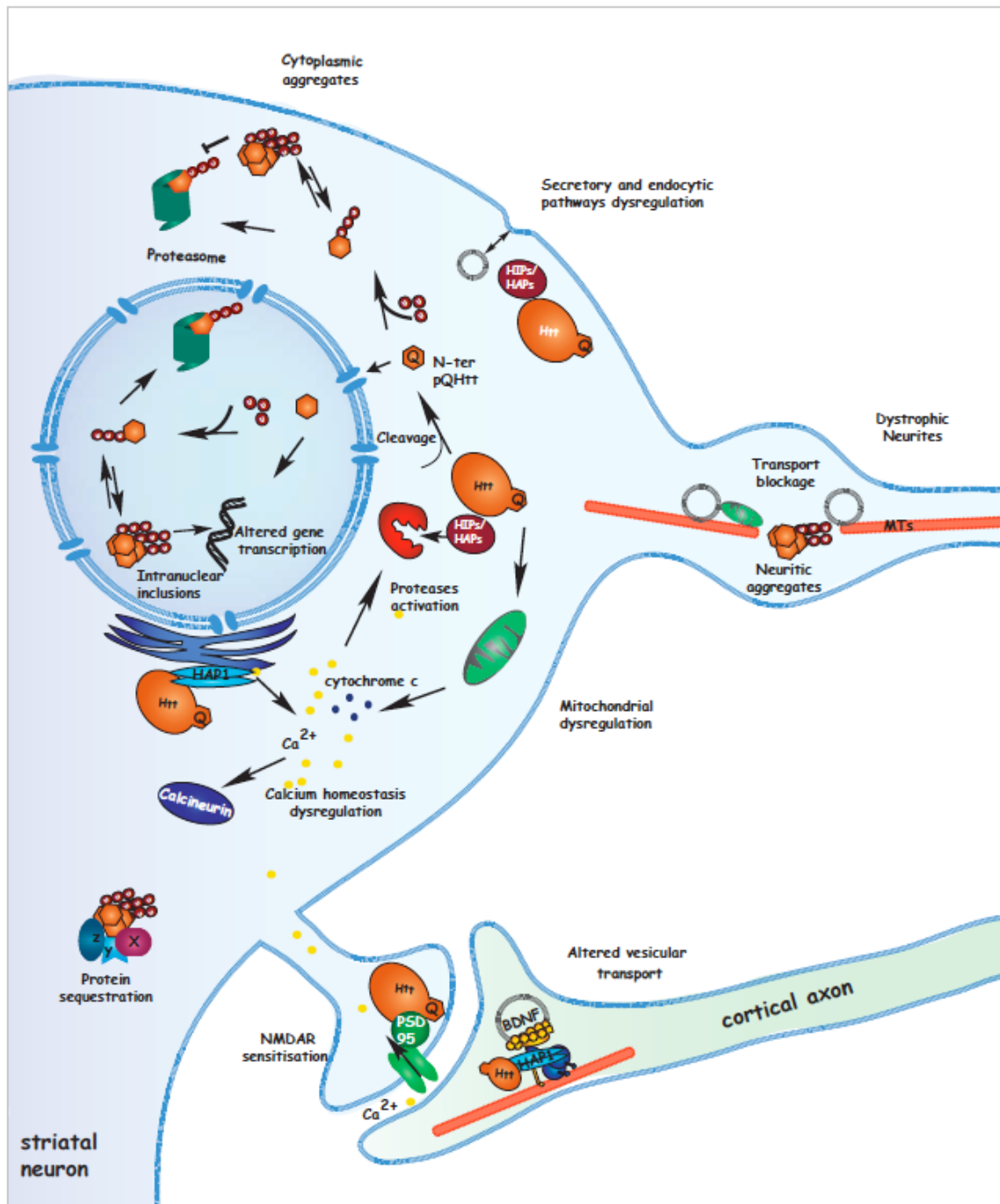


Figure 15 : Mécanismes proposés de la toxicité induite par la forme polyQ de la HTT (Borrell-Pages et al. 2006). La huntingtine mutée est clivée par des protéases dans le cytoplasme et forme des agrégats neuritiques et cytoplasmiques. La HTT polyQ altère également l'homéostasie du calcium et le transport et le recyclage des vésicules. Le défaut de transport du BDNF réduit le support trophique des neurones et induit la mort neuronale. Les agrégats de HTT bloquent physiquement le transport vésiculaire. Les fragments N-terminaux de HTT polyQ transloquent dans le noyau, perturbent la transcription et induisent la mort neuronale. Les fragments de HTT peuvent être ubiquitinylés et adressés au protéasome pour être dégradés.

3.1.1. Le clivage de la huntingtine et les agrégats

Le clivage et localisation nucléaire de la huntingtine mutée

La HTT peut être clivée par diverses enzymes (**Figure 16**) dont les caspase 3 et 7 en position 513 et 552, la caspase 6 en position 586, la caspase 2 en position 552, les calpaines en position 469 et 536 (Goldberg *et al.* 1996; Wellington *et al.* 1998; Qin and Gu 2004; Ehrnhoefer *et al.* 2011).

La forme polyQ de la HTT induit son clivage et l'inhibition de la caspase 1 retarde le développement des symptômes et l'apparition des agrégats (Ona *et al.* 1999). La forme polyQ peut également activer directement les caspases 3, 8 et 9 (Qin and Gu 2004) et donc induire son propre clivage. Le fragment N-terminal de la HTT (1-586 avec 82Q), exprimé sous le promoteur prion, induit une neuropathologie sévère, chez la souris (Waldron-Roby *et al.* 2012). La prévention du clivage par la caspase 6 en position 586 améliore également les symptômes du modèle murin de la MH YAC128 (Graham *et al.* 2006). Ces données indiquent donc que le clivage de la HTT est une étape cruciale dans la pathologie.

La forme polyQ de la HTT est enrichie préférentiellement dans le noyau par rapport à la HTT non pathogène (Havel *et al.* 2011). En effet, l'expansion polyQ de la HTT réduit l'interaction avec la protéine Trp (translocated promoter region) qui permet l'export des protéines hors du noyau, il en résulte l'accumulation de la HTT mutée dans le noyau (Cornett *et al.* 2005). Les fragments courts de la HTT transloquent également dans le noyau (Sawa *et al.* 2005) et ils s'y accumulent préférentiellement notamment *via* une augmentation de la phosphorylation en sérine 16 qui réduit l'interaction avec la Trp (Havel *et al.* 2011). De plus, l'interaction des fragments N-terminaux de la HTT mutée avec GAPDH (une enzyme de la glycolyse) et Siah1 (une ubiquitine E3 ligase) permet également la translocation nucléaire (Bae *et al.* 2006).

La mort neuronale est induite par l'entrée de la forme polyQ de la HTT dans le noyau. Ainsi, l'exclusion de la HTT du noyau à l'aide de l'introduction d'un signal d'export nucléaire prévient la mort neuronale (Saudou *et al.* 1998). De plus, l'addition d'un signal de localisation nucléaire à un fragment N-terminal de la HTT polyQ dans un modèle murin transgénique induit un phénotype similaire à la MH *in vivo*, indiquant que

la localisation nucléaire des fragments de la HTT induit la pathologie (Schilling *et al.* 2004).

En conclusion, clivage et accumulation dans le noyau de la HTT sont deux étapes fondamentales pour induire la toxicité neuronale.

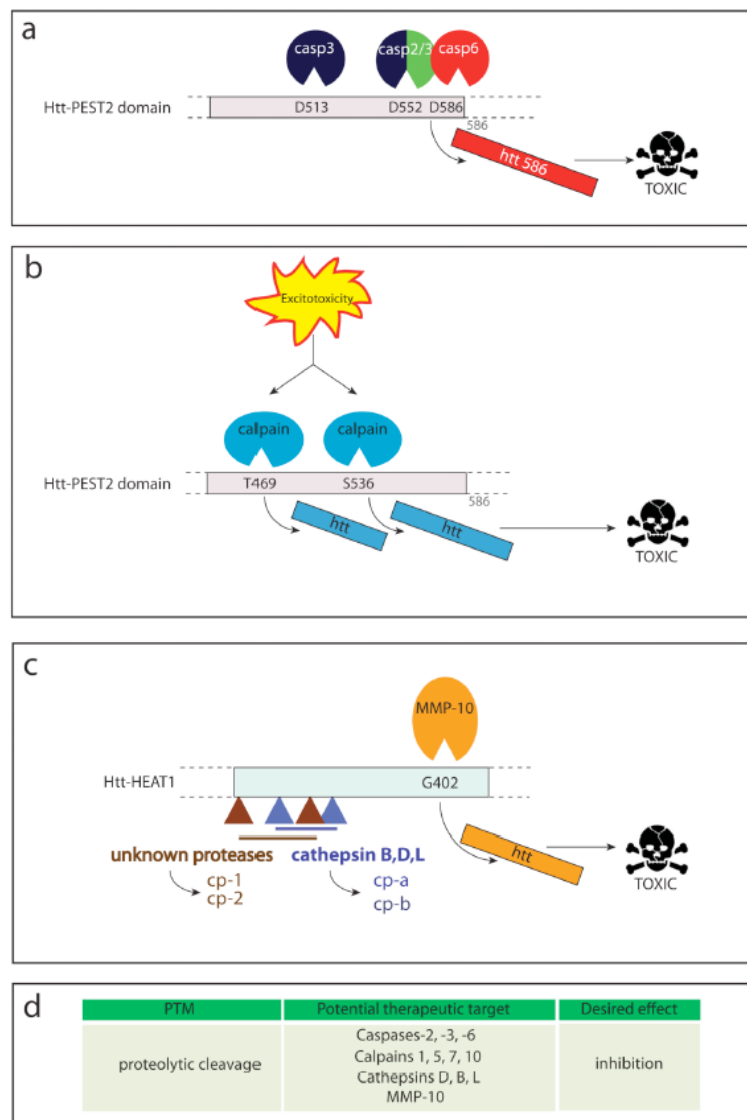


Figure 16 : Illustration des sites de clivages de la HTT induisant la mort neuronale avec les enzymes effectrices (Ehrnhoefer *et al.* 2011). (a) Sites de clivage par les caspases. La génération d'un fragment N-terminal de 586 acides aminés est toxique pour les neurones. (b) Sites de clivage par les calpains. (c) Sites par les cathépsines et la MMP-10. (d) Tableau récapitulatif des cibles thérapeutiques potentielles pour traiter la maladie de Huntington en inhibant le clivage de la HTT.

Les agrégats

La mutation polyQ conduit à une formation d'agrégats à la fois dans les modèles murins et dans les cerveaux des patients MH (Davies *et al.* 1997). Ces agrégats se forment dans le noyau (inclusions nucléaires) et dans le cytoplasme des neurones (inclusions cytoplasmiques). Les agrégats sont spécifiquement formés par la HTT mutante, apparaissent avant la neurodégénérescence et avant l'apparition des symptômes (Ross 1997).

Les inclusions sont retrouvées dans tous les neurones et n'expliquent donc pas la dégénérescence spécifique du striatum. D'autre part, les inclusions nucléaires sont peu fréquentes dans les cerveaux de patients de la MH, excepté pour les formes juvéniles (Aronin *et al.* 1999). Dans les formes adultes, on retrouve plutôt des accumulations dans le cytoplasme. De plus, il a été démontré que ces inclusions ne sont pas toxiques (Saudou *et al.* 1998; Aronin *et al.* 1999; Kuemmerle *et al.* 1999), mais relèveraient plutôt d'un mécanisme de protection (Gong *et al.* 2008). Par ailleurs, les neurones qui ont le plus d'inclusions sont les moins susceptibles de mourir (Bodner *et al.* 2006). Il est proposé que les inclusions stimuleraient l'autophagie et faciliteraient de cette façon la clairance de la forme polyQ (Ventruti and Cuervo 2007).

3.1.2. L'excitotoxicité

L'excitotoxicité est un phénomène causé par une activité synaptique anormale qui induit la mort neuronale. Lorsque suffisamment de glutamate est libéré à la synapse, les récepteurs au glutamate du neurone post-synaptique induisent la dépolarisation du neurone et la libération de calcium intracellulaire. Une activation excessive de ces récepteurs entraîne une augmentation massive de calcium intracellulaire. Ce calcium va activer diverses enzymes (dont la protéine kinase C, les phospholipases et les calpaines) qui dégradent les protéines cellulaires et causent des défauts mitochondriaux qui réduisent la production d'ATP. Le calcium induit également des espèces réactives de l'oxygène qui provoquent des dommages oxydatifs aux lipides, à l'ADN et aux protéines et altèrent le fonctionnement de ceux-ci (**Figure 17**) (Estrada Sanchez *et al.* 2008). Toutes ces altérations conduisent *in fine* à la mort neuronale.

Le striatum reçoit massivement des afférences en provenance du cortex. Celles-ci sont excitatrices et libèrent du glutamate. Les premiers modèles de la maladie de Huntington étaient basés sur l'injection d'agoniste des récepteurs du glutamate (acide kainique et acide quinolinique) dans le striatum (DiFiglia 1990; Hantraye *et al.* 1990). Ces modèles, activant excessivement les récepteurs du glutamate, induisent une excitotoxicité qui entraîne une mort neuronale similaire à celle observée lors de la MH ainsi que des anomalies biochimiques et comportementales caractéristiques de la MH. Ceci a permis de proposer un rôle pour l'excitotoxicité dans la physiopathologie de la MH. Les transporteurs du glutamate sont essentiels à l'homéostasie et à la clairance du glutamate. Ces transporteurs sont présents à la fois dans les neurones et les astrocytes. Dans le cadre de la MH, des altérations des transporteurs du glutamate sont décrites (Arzberger *et al.* 1997; Behrens *et al.* 2002). Une mauvaise élimination du glutamate conduit à une activation prolongée de ces récepteurs, et induit ainsi l'excitotoxicité (**Figure 17**)(Estrada Sanchez *et al.* 2008).

La HTT interagit avec la PSD95 (post-synaptic density 95), connue pour faciliter l'activation des récepteurs NMDA, et permettrait de séquestrer la PSD95, réduisant ainsi l'activation de ces récepteurs (Sun *et al.* 2001). En effet, la PSD95 permet le regroupement des récepteurs NMDA et régule leur activation. La HTT polyQ présente une interaction réduite avec la PSD95 (Sun *et al.* 2001). La HTT mutée induit également une augmentation de la localisation à la membrane plasmique de PSD95 (Song *et al.* 2003). Ceci permet à la PSD95 d'exercer sa fonction de régulation de l'activité des récepteurs NMDA et dans le cadre de la MH, cette dérégulation contribuerait à l'hyperactivation de ces récepteurs. La HTT polyQ augmente les phosphorylations des récepteurs NMDA, augmentant ainsi leur sensibilisation (Song *et al.* 2003). En effet, la HTT mutée induit une augmentation de l'activité et de la localisation de la Src (une enzyme tyrosine kinase) à la membrane plasmique. Ceci conduit aux phosphorylations des récepteurs NMDA du glutamate de type NR2B et contribue à leur sensibilisation (Song *et al.* 2003).

La toxicité est également induite par la dopamine, un autre neurotransmetteur qui est libéré de façon importante dans le striatum. En effet, la destruction spécifique de l'innervation dopaminergique par la 6-OHDA dans un modèle d'excitotoxicité par injection de 3NP (inhibiteur spécifique mCII (mitochondrial complex II)) dans le

striatum, protège de la toxicité chez le rat (Reynolds *et al.* 1998). La dopamine induit une réduction de mCII par les récepteurs D2 de la dopamine (Benchoua *et al.* 2008). En effet, l'application d'un antagoniste de ces récepteurs D2 abolit les effets de la dopamine sur mCII et la surexpression de mCII supprime la toxicité de la dopamine (Benchoua *et al.* 2008). Par ailleurs, l'application d'un agoniste des récepteurs D2 augmente la dysfonction neuronale induite par la HTT mutée *via* la voie de signalisation Rho/ROCK-II (Deyts *et al.* 2009). La dopamine amplifie également la toxicité de la HTT polyQ *via* la voie JNK/c-Jun en culture de neurones striataux, de même que la formation d'agrégats (Garcia *et al.* 2004; Charvin *et al.* 2005).

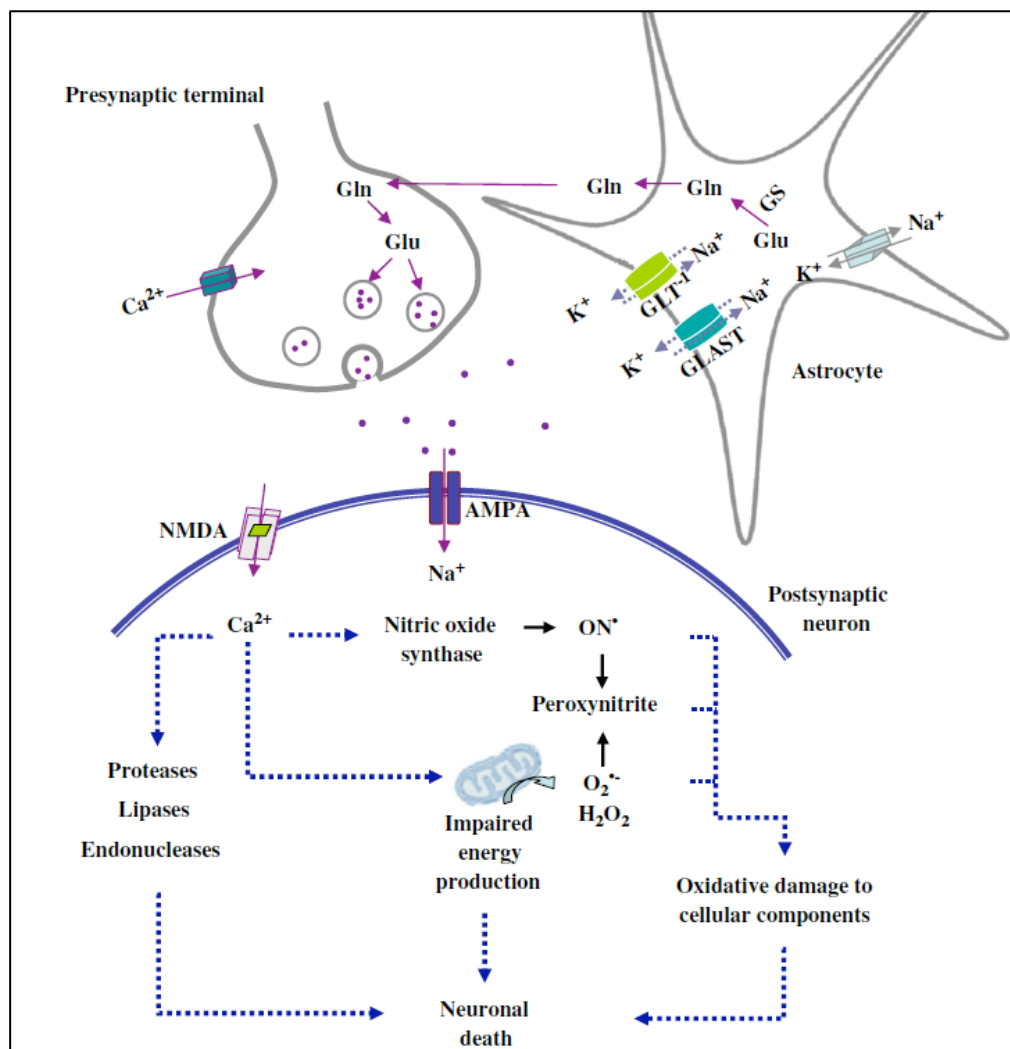


Figure 17 : Mécanismes de l'excitotoxicité neuronale induite par la forme polyQ de la HTT (Estrada Sanchez *et al.* 2008). L'activation excessive des récepteurs du glutamate entraîne une libération massive du calcium intracellulaire. Celui-ci active diverses enzymes telles que des protéases et des endonucléases, la NO synthase, et perturbe la production d'énergie par les mitochondries. Ces processus induisent la mort neuronale.

3.1.3. L'altération de la transcription

De nombreuses dérégulations transcriptionnelles sont reportées dans le cerveau des patients MH et des modèles murins modèles de la maladie (Hodges *et al.* 2006; Kuhn *et al.* 2007). Certains des mécanismes mis en jeu dans ces dérégulations sont décrits dans cette section.

La forme polyQ de la HTT ne séquestre plus efficacement le facteur de transcription REST/NRSF, induisant une diminution de l'expression du BDNF. La forme polyQ de la HTT diminue l'expression des exons IV et VI du BDNF (Zuccato *et al.* 2003; Zuccato *et al.* 2007).

La transcription de gènes contenant des séquences CRE (cAMP responsive element) dans leurs régions promotrices nécessite l'activation de CREB par phosphorylation qui recrute ainsi son co-activateur, la CREB binding protein (CBP). Il en résulte l'activation de gènes pro-survies. La HTT mutée interagit avec CBP plus fortement que la forme non mutée et induit également sa dégradation. Ceci contribue à réprimer son activité (Steffan *et al.* 2000; Nucifora *et al.* 2001; Cong *et al.* 2005). De fait, la HTT perturbe les gènes activés par la CBP et la surexpression de CBP compense ses anomalies (Nucifora *et al.* 2001).

Un autre activateur de la transcription, Sp1 (specificity protein 1), recrute TFIID au niveau du promoteur pour activer la transcription génique. La forme polyQ de la HTT forme des agrégats dans le noyau qui interagissent avec Sp1 et une sous-unité de TFIID (TAFII130). Il en résulte une inhibition de l'activité du complexe Sp1/TFIID sur la transcription de gènes cibles dont le récepteur de la dopamine D2 (Dunah *et al.* 2002).

La HTT polyQ réduit Bcl11b, un facteur de transcription enrichi dans le striatum adulte et qui active l'expression de gènes striataux (Benn *et al.* 2008). La HTT peut aussi s'associer directement à ce facteur. Ceci peut contribuer à la dérégulation des gènes striataux dans la MH.

La HTT mutée perturbe également l'activité de Brn-2, un facteur de transcription à domaine POU impliqué dans la différenciation et la fonction des neurones hypothalamiques neurosécréteurs (Yamanaka *et al.* 2010). En effet, Brn2 est séquestré

par la HTT polyQ et sa transcription réduite, conduisant à une réduction des neuropeptides hypothalamiques (Yamanaka *et al.* 2010).

Enfin, la HTT interagit directement avec l'ADN au niveau des régions promotrices et ceci de façon différentielle par rapport à la forme polyQ (Benn *et al.* 2008). L'expansion polyQ augmente aussi les interactions HTT-ADN, augmentant ainsi les dérégulations.

3.1.4. Les dysfonctions énergétiques

Les mitochondries sont également affectées dans la maladie de Huntington. Ces organelles sont essentielles pour la production d'ATP, fournissant l'énergie aux cellules, et pour la régulation du calcium intracellulaire.

Des défauts de mitochondries sont associés à une dégénérescence préférentielle du striatum (Damiano *et al.* 2010). De plus, des anomalies de la chaîne respiratoire ont été observées dans la MH (**Figure 18**). Le striatum de patients MH est caractérisé par une réduction forte de l'activité des complexes II/III, plus modérée du complexe IV de la chaîne respiratoire.

Il est difficile d'établir un lien de causalité entre les défauts mitochondriaux et la mort neuronale dans la MH. Cependant, dans les cellules modélisant la MH, la production d'ATP est réduite (Milakovic and Johnson 2005). Les mitochondries des lymphocytes de patients présentent un potentiel de membrane plus faible et se dépolarisent à des taux de calcium plus faibles que les contrôles. De plus, les mêmes défauts sont relevés dans les cerveaux des souris transgéniques exprimant la HTT mutée entière. De façon intéressante, ces défauts précèdent l'apparition des symptômes comportementaux et pathologiques (Panov *et al.* 2002). Ainsi, les neurones seraient prédisposés à l'excitotoxicité *via* ces altérations mitochondriales (excitotoxicité indirecte). Les neurones striataux étant particulièrement susceptibles, ils seraient les premiers atteints.

L'inhibition du complexe II de la chaîne respiratoire chez le rat et les primates non humains, par injection systémique d'acide 3-nitropropionique (3NP), conduit à la dégénérescence préférentielle du striatum, des mouvements anormaux et des déficits cognitifs ressemblant à la MH (Damiano *et al.* 2010). L'inhibition partielle de la succinate

déshydrogénase conduit à une lésion nerveuse comparable à la MH (Brouillet *et al.* 1998). Ce modèle montre donc que l'altération de la chaîne respiratoire des mitochondries est suffisante pour induire une dégénérescence du striatum, une structure également préférentiellement atteinte dans la MH. Néanmoins, ce modèle ne reproduit que certains aspects de la MH, les dysfonctions transcriptionnelles n'étant pas reproduites de façon comparable par exemple (Damiano *et al.* 2010).

Il a pu être montré que l'activation pharmacologique de la chaîne respiratoire par la coenzyme Q10 retarde l'apparition et le développement des symptômes, la perte de poids, les inclusions nucléaires et la durée de vie dans des modèles murins de la MH (Ferrante *et al.* 2002). Ceci indique que la restauration des fonctions mitochondriales est suffisante pour induire l'amélioration des symptômes.

Enfin, la HTT mutée intervient également dans les dynamiques de fusion/fission des mitochondries. En effet, la forme polyQ de la HTT interagit avec Drp1 (dynamin-related protein 1) et augmente son activité GTPase. Il en résulte une fragmentation excessive des mitochondries perturbant également les fonctions de cet organite (Reddy and Shirendeb 2012).

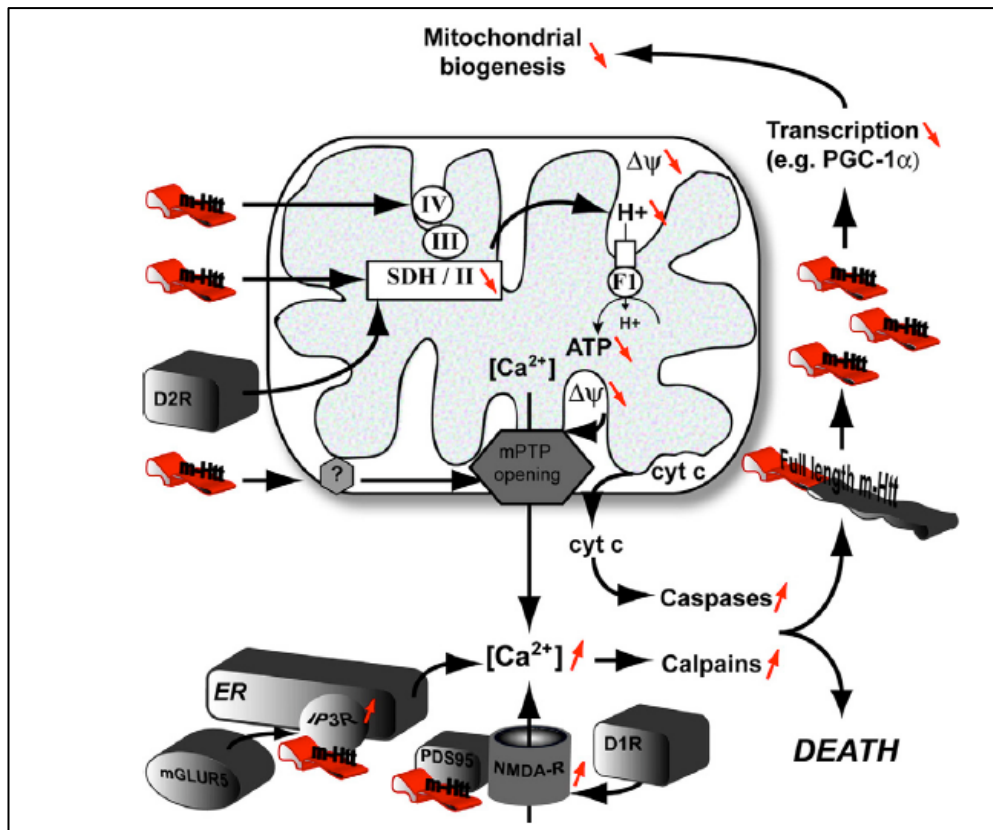


Figure 18 : Modèle proposé pour le rôle des altérations mitochondriales dans la pathogenèse de la MH (Damiano et al. 2010). La HTT mutée (m-Htt en rouge) induit des altérations à différents niveaux tels que l'activité de la chaîne respiratoire qui est réduite ainsi que la production d'ATP et l'activité des caspases qui est augmentée.

3.1.5. Les dynamiques intracellulaires

Comme cela a été mentionné précédemment, la HTT régule les dynamiques intracellulaires. Dans le cadre de la MH, la HTT mutée interagit de façon différente avec ses partenaires protéiques impliqués dans ces dynamiques. En conséquence, le transport intracellulaire est affecté par la mutation.

Le transport axonal

Les fragments N-terminaux de la HTT mutée, perfusés directement dans l'axone géant de calmar, inhibent le transport axonal rapide (Fast Axonal Transport ou FAT), à la fois dans le sens antérograde et le sens rétrograde (Szebenyi et al. 2003). Cet effet sur le transport se produit en l'absence d'agrégats.

Plus particulièrement, la forme polyQ de la HTT réduit les dynamiques des vésicules de BDNF, indiquant également la perte de cette fonction de la HTT sauvage

(Gauthier *et al.* 2004). Au niveau moléculaire, la HTT pathologique interagit plus fortement avec HAP1 et p150^{Glued} et de fait, inhibe leurs accrochages, ainsi que celui des moteurs moléculaires, aux microtubules (Gauthier *et al.* 2004). La HTT polyQ inhibe le FAT également en activant JNK3 (c-Jun N-terminal kinase 3), une JNK spécifique des neurones. Cette dernière phosphoryle la kinésine 1, essentielle au transport antérograde, réduisant son association aux microtubules (Morfini *et al.* 2009). Ceci entraîne une diminution du support trophique en BDNF dans le striatum. Cette diminution pourrait contribuer à la vulnérabilité préférentielle des neurones striataux dans la MH.

Dans le cadre de la MH, la stimulation de la voie IGF1/Akt ou l'inhibition de la calcineurine restaure les défauts de transport du BDNF en phosphorylant la HTT sur la sérine 421 (Zala *et al.* 2008; Pineda *et al.* 2009), pouvant ainsi contribuer à l'effet neuroprotecteur de cette phosphorylation (Humbert *et al.* 2002; Pardo *et al.* 2006).

Le transport des mitochondries est lui aussi affecté par la mutation polyQ dans les cultures de neurones corticaux qui surexpriment la HTT polyQ pleine longueur (Chang *et al.* 2006; Reddy and Shirendeb 2012) et dans les neurones striataux HD (Trushina *et al.* 2004; Orr *et al.* 2008). Les agrégats de HTT mutée séquestrent les protéines de transport axonal et la HTT sauvage, réduisant ainsi la motilité des mitochondries dans les cultures primaires de neurones striataux de souris transgéniques exprimant une HTT mutée pleine longueur (Trushina *et al.* 2004). Les fragments N-terminaux polyQ de la HTT s'associent aux mitochondries dans les souris Knock In avec 150 glutamines (Orr *et al.* 2008). Cette interaction réduit l'association des protéines de transport à ces organites. L'altération du transport des mitochondries se produit avant la formation d'agrégats dans les souris Knock In 150Q (Orr *et al.* 2008). Par ailleurs, le transport rétrograde n'est que peu affecté par rapport au transport antérograde qui est fortement diminué dans les cultures primaires de neurones issus des souris BACHD (Reddy and Shirendeb 2012; Shirendeb *et al.* 2012).

Enfin, les agrégats neuritiques de HTT bloquent physiquement le transport intracellulaire des protéines dans les cultures neuronales de striatum (Li *et al.* 2001). En effet, les mitochondries mobiles s'accumulent autour des agrégats dans les cultures de neurones corticaux (Chang *et al.* 2006; Reddy and Shirendeb 2012). Par ailleurs, chez la drosophile, les agrégats perturbent physiquement le transport et séquestrent les moteurs moléculaires réduisant la quantité de protéines disponibles pour assurer le

transport (Gunawardena *et al.* 2003). L'expression du cDNA de la HTT humaine avec 128 glutamines dans un autre modèle drosophile transgénique réduit la durée de vie, induit des troubles moteurs et la formation d'agrégats cytoplasmiques. Les auteurs montrent également que les agrégats bloquent le transport axonal (Lee *et al.* 2004). En effet, le diamètre des agrégats dépasse largement celui de l'axone des larves de drosophile et les vésicules de synaptotagmine (une protéine synaptique) s'accumulent à proximité des agrégats (Lee *et al.* 2004).

Les dynamiques d'endocytose

Les dynamiques de formation des vésicules d'endocytose et leur trafic sont cruciaux pour les cellules. Par exemple, les neurotrophines tels que le BDNF ou le NGF, sont endocytés après s'être fixées à leurs récepteurs, pour être adressées au noyau des neurones. Les récepteurs doivent ensuite retourner à la membrane plasmique ou être dégradés. La forme polyQ de la HTT perturbe ces processus à différents niveaux.

Le complexe Hap40 (HTT associated protein 40) et HTT inhibe l'accrochage et la motilité des endosomes précoces sur les microtubules (Pal *et al.* 2006). Ce complexe est un effecteur direct de Rab5 qui régule les dynamiques des endosomes précoces entre l'actine et les microtubules. Dans les fibroblastes HD, les niveaux de Hap40 sont augmentés et la motilité des endosomes précoces, positifs pour Rab5, est fortement réduite. En fait, le complexe HTT/Hap40 augmente l'accrochage des endosomes précoces à l'actine, inhibant ainsi leur accrochage aux microtubules.

La HTT mutée inhibe l'activation de Rab11, une GTPase régulant le trafic des endosomes de recyclage vers la membrane plasmique (Li *et al.* 2008; Li *et al.* 2009). Il en résulte, dans les fibroblastes de patients HD, une altération de la formation des vésicules à partir des endosomes de recyclage (Li *et al.* 2009). Cette anomalie est normalisée par la surexpression d'une forme dominante active de Rab11.

La HTT polyQ inhibe l'endocytose indépendante de la clathrine dans les cultures de neurones striataux. En effet, la HTT mutée inhibe l'internalisation de BODIPY-lactosylcéramide, qui est endocyté par un mécanisme dépendant des cavéoles (Trushina *et al.* 2006). La cavéoline 1, une protéine essentielle des cavéoles, se lie au cholestérol pour réguler son trafic dans la cellule. La HTT mutée interagit avec la cavéoline 1 et perturbe ce trafic. Le cholestérol s'accumule à l'intérieur des cellules. L'inactivation de la

cavéoline 1 bloque l'accumulation de cholestérol et restaure l'endocytose de BODIPY-lactosylcéramide (Trushina *et al.* 2006).

La Ciliogenèse

La forme polyQ de la HTT conduit à une accumulation de PCM1 au centrosome, ce qui conduit à une augmentation de la ciliogenèse (allongement des cils) (Keryer *et al.* 2011). L'origine de ce phénomène réside dans un défaut de transport du matériel péricentriolaire. La conséquence physiologique de ces anomalies de ciliogenèse est un battement asynchrone des cils motiles modulant le flux du liquide céphalo-rachidien (LCR). Dans ce cas précis, la forme polyQ conduit à un défaut de fonctionnalité au niveau moléculaire mais qui engendre une augmentation de la ciliogenèse en terme de phénotype cellulaire. Cet effet, qui est l'inverse de la perte de fonction, souligne toute la complexité de la MH.

3.2. Les modèles animaux de la maladie de Huntington

Différents modèles de la maladie de Huntington ont été développés pour déterminer les mécanismes moléculaires induisant la mort neuronale et les symptômes caractéristiques de la maladie. Chacun d'entre eux présente des atouts et des limitations.

3.2.1. Les modèles chimiques

Les modèles chimiques ont permis d'identifier des dysfonctions mitochondriales et ont donné une démonstration solide de l'excitotoxicité dans le striatum comme partie intégrante du processus de dégénération dans la MH.

Les premiers modèles ont été conçus avant même l'identification du gène responsable de la MH. Ils étaient basés sur une approche par injection de toxines. Les inhibiteurs pharmacologiques du complexe mitochondrial II (mCII), comme le 3NP ou le malonate, induisent dans le striatum des dommages et conduisent à des symptômes moteurs similaires à ceux de la MH (Kumar *et al.* 2010). En effet, l'activité du complexe II de la chaîne respiratoire (succinate ubiquinol oxidoreductase) est fortement réduite dans le noyau caudé et le putamen des patients MH.

L'acide quinolinique est un agoniste endogène des récepteurs NMDA du glutamate. Son injection intra-striatale induit la perte spécifique des neurones épineux

moyens par excitotoxicité. La toxicité est provoquée par une élévation des espèces réactives de l'oxygène, des dommages à l'ADN et une réduction des niveaux de glutathion.

3.2.2. Les modèles transgéniques

Les modèles exprimant des fragments N-terminaux

Suite à l'identification du gène de la HTT, un modèle transgénique murin a été développé en 1996 (Mangiarini *et al.* 1996). Le transgène correspond au premier exon du gène humain avec une expansion de glutamine de 116 répétitions pour la lignée R6/1 et de 150 pour la lignée R6/2. L'expression du transgène de la lignée R6/1 est de 31% du niveau de la HTT endogène, tandis que celle de la lignée R6/2 est de 75%. La lignée R6/2 développe rapidement des symptômes neurologiques et comportementaux (symptômes moteurs vers 6 semaines, tremblements, crises épileptiques conduisant à la mort à l'âge de 4 mois). La lignée R6/1 développe les signes de la maladie avec une cinétique plus lente. Tous deux restent cependant des modèles aigus de la maladie. Les R6 présentent des inclusions neuronales progressives et une atrophie striatale marquée (Mangiarini *et al.* 1996; Davies *et al.* 1997). Ces modèles permettent le screening de composés pharmacologiques puisque la cinétique de progression des symptômes est très rapide.

D'autres modèles transgéniques exprimant des fragments N-terminaux de la HTT mutée, ont également été développés chez la souris (Schilling *et al.* 1999) et le rat (von Horsten *et al.* 2003).

Les modèles exprimant la huntingtine pleine longueur

Des modèles transgéniques expriment la HTT pleine longueur humaine avec les régions flanquantes régulatrices également humaines. L'expression du transgène est donc plus proche de la situation physiologique. Cependant, s'agissant de modèle transgénique, le dosage de HTT reste supérieur aux conditions physiologiques.

Ces modèles expriment la HTT pleine longueur humaine sous contrôle du promoteur cytomegalovirus (CMV)(Reddy *et al.* 1998) ou dans des chromosomes artificiels (souris YAC128 (Slow *et al.* 2003) ; souris BACHD (Gray *et al.* 2008)). La séquence de polyQ des souris BACHD est codée par des répétitions mixtes CAA-CAG, ce

qui prévient les instabilités somatiques et germinales. En outre, ces modèles ont permis d'étudier l'influence de modifications post-traductionnelles sur le développement de la pathologie (Graham *et al.* 2006; Gu *et al.* 2009), ceci en modifiant directement le transgène.

3.2.3. Les souris Knock In

Les souris Knock In (KI) pour la HTT ont leur HTT endogène mutée. En effet, les régions contenant les CAG endogènes sont remplacées par des séquences avec des triplets CAG plus longs (50Q, 71Q, 80Q, 92Q, 94Q, 111Q, 140Q et 150Q). Leur caractéristique principale est la lente progression des symptômes qui reflète celle des patients MH (Lin *et al.* 2001; Menalled 2005; Rising *et al.* 2011; Brooks *et al.* 2012). Ces modèles sont plus proches des conditions physiologiques de la MH que les modèles transgéniques car le dosage en HTT n'est pas modifié. L'inconvénient majeur de ces modèles est l'absence de mort neuronale et une progression très lente des symptômes.

3.2.4. Les autres modèles

Des modèles animaux de plus grand gabarit et avec une physiologie plus proche de l'homme ont été développés dont le macaque rhésus MH transgénique et le mouton. Le macaque MH exprime l'exon 1 avec 84 glutamines qui est marqué GFP (Yang *et al.* 2008). Ce singe développe des symptômes cliniques de la MH avec une dystonie et une chorée. Le mouton transgénique exprime une HTT pleine longueur avec 73 glutamines et présentent une réduction de l'expression de DARPP32 (un marqueur des neurones épineux moyens du striatum) à 7 mois (Jacobsen *et al.* 2010). Des modélisations de la MH sont également disponibles chez le ver *C. elegans*, la drosophile et le poisson zèbre (Zuccato *et al.* 2010).

Deuxième Partie. Le Développement du Cortex Embryonnaire

1. Le cortex cérébral

1.1. Structure du néocortex

Le néocortex est une structure complexe qui recouvre les hémisphères. Il est composé d'unités fonctionnelles et anatomiques distinctes (Yamamori and Rockland 2006).

Le néocortex est une structure organisée en 6 couches cellulaires (**Figure 19**). Bien qu'il y ait des exceptions, les couches cellulaires sont associées à des connectivités propres (Watakabe 2009). Par exemple, les neurones de la couche 6 projettent leurs axones dans le thalamus tandis que les neurones de la couche 5 projettent dans les régions sous-corticales. Les neurones des couches 2-3 envoient leurs axones dans les autres aires corticales. Enfin, les neurones de la couches 4, reçoivent des connexions axonales du thalamus et d'autres régions corticales (Watakabe 2009).

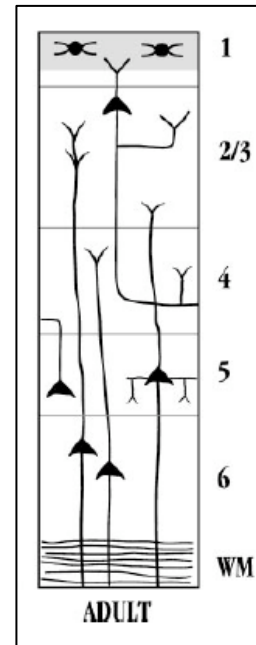


Figure 19 : Schéma représentant la structure en 6 couches du néocortex adulte. (Hatten 1999). WM= white matter.

Le néocortex est composé de neurones pyramidaux excitateurs glutamatergiques et inhibiteurs GABAergiques (Watakabe 2009). Ces derniers ne représentent que 10 à 20% des neurones du cortex. Parmi ces 2 grandes classes de neurones, il existe de nombreux sous-types. Le néocortex est également composé d'astrocytes.

Le cortex cérébral exerce différentes fonctions allant de la perception sensorielle et du contrôle moteur jusque des fonctions plus élaborées comme la pensée symbolique et le langage chez l'homme (Rakic *et al.* 2009).

1.2. Origine du cortex

Le tissu nerveux primitif (neuroectoderme) se forme à partir du feuillet ectodermique embryonnaire. Le neuroectoderme s'organise ensuite en plaque neurale qui s'invagine pour former la gouttière neurale (**Figure 20**) (Gammill and Bronner-Fraser 2003). Enfin, la gouttière neurale se referme en tube neural, qui correspond à la structure embryonnaire primordiale du système nerveux central. Le télencéphale, dérivant de la partie la plus antérieure du tube neural, est à l'origine du cortex cérébral.

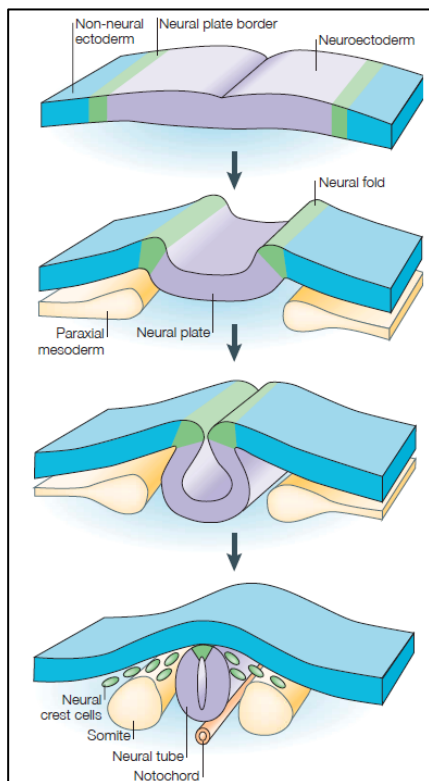


Figure 20 : Schéma illustrant la formation du tube neural à partir du neuroectoderme. La plaque neurale s'invagine en gouttière neurale puis se referme complètement en tube neural (Gammill and Bronner-Fraser 2003).

2. La neurogenèse : à l'origine des différents types cellulaires

2.1. Définition

La neurogenèse est l'ensemble des processus physiologiques qui conduisent, à partir d'une cellule souche nerveuse, à l'ensemble des trois types cellulaires du cerveau : neurones, astrocytes et oligodendrocytes (Alvarez-Buylla *et al.* 2001). Les cellules souches nerveuses se différencient en cellules progénitrices qui ont une potentialité réduite. En effet, elles ne pourront générer que l'un des trois types cellulaires du cerveau en situation physiologique. Au cours de la neurogenèse, les progéniteurs subissent des

cycles d'amplification pour accroître le nombre de progéniteurs, puis des cycles de productions des différents types cellulaires directement ou *via* la génération de progéniteurs intermédiaires (Farkas and Huttner 2008).

2.2. Séquence de formation des différents types cellulaires

Les trois types cellulaires différenciés du cerveau sont produits séquentiellement au cours du développement du cortex murin (**Figure 21**)(Sauvageot and Stiles 2002). Dans un premier temps, les neurones sont générés avec un pic de production autour du 14^{ème} jour embryonnaire (E14). L'essentiel des neurones est généré au cours du développement embryonnaire. Ensuite, les astrocytes sont produits entre le stade E14 et le 11^{ème} jour post-natal (P11), le pic se situant 1 à 2 jours après la naissance. Les oligodendrocytes sont générés en dernier avec un pic de production plus large à P14. Ces données ont été obtenues après la mise en culture des cellules issues du cortex aux différents stades embryonnaires et après analyse de leur devenir (Sauvageot and Stiles 2002). Par la suite, je ne décrirai que les mécanismes cellulaires et moléculaires de la neurogenèse aboutissant à la genèse des neurones corticaux.

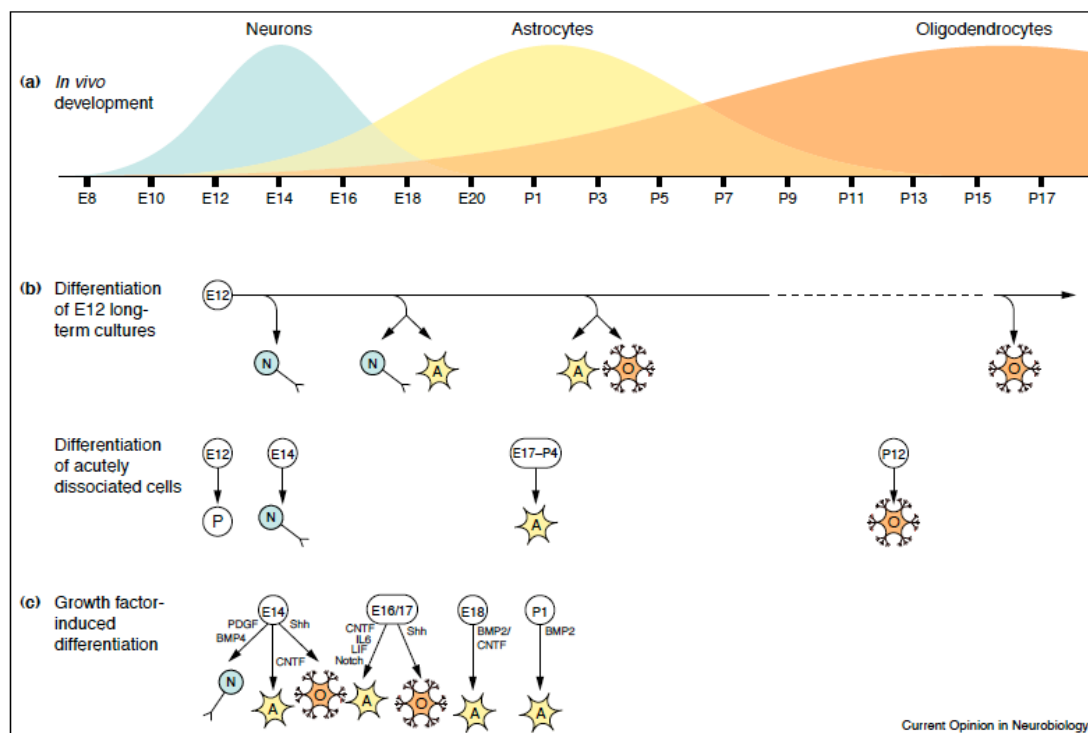


Figure 21 : Production des différentes populations cellulaires au cours de la formation du cortex chez le rat (Sauvageot and Stiles 2002).

3. Les différentes étapes de la genèse du neurone

La genèse d'un neurone mature comprend différentes étapes après sa production par un progéniteur. Parmi celles-ci, on peut citer :

- **La migration** : les cellules post-mitotiques sont produites à distance de leur position finale. Elles empruntent différentes trajectoires de migration pour rejoindre leurs localisations définitives. Au cours de ce processus, les cellules adoptent différents modes de migration (Heng *et al.* 2010). Les différentes vagues de migration vont permettre de former les 6 couches cellulaires du néocortex adulte.

- **la croissance axonale** correspondant au prolongement guidé de l'axone vers sa structure cible.

- la formation des dendrites et la synaptogenèse.

- **la maturation** : les neurones fonctionnels voient leurs synapses se renforcer et les neurones non utilisés sont éliminés.

L'apoptose se produit après ces processus, pour ne garder que les cellules qui sont correctement positionnées et qui ont reçu les signaux trophiques appropriés (Takahashi *et al.* 2000).

4. Les différents types cellulaires produisant les neurones

Dans le cortex somato-sensoriel de la souris, la neurogenèse dure 6 jours entre les stades E11 et E17 (Mitsubishi and Takahashi 2009). Ceci correspond à environ 11 cycles cellulaires. Une cellule progénitrice produit, selon des calculs mathématiques, environ 144 neurones au cours de ces différents cycles (Mitsubishi and Takahashi 2009).

Lors de la neurogenèse, différents types cellulaires sont produits : les cellules neuroépithéliales qui permettent d'initier la neurogenèse, les cellules de la glie radiaire et les progéniteurs intermédiaires qui produisent les neurones.

4.1. Les cellules neuroépithéliales

Les cellules en prolifération dans la partie antérieure du tube neural, à partir desquelles dérivent les cellules souches nerveuses, sont appelées les cellules neuroépithéliales (neuroepithelial stem cells ou NES). Les NES possèdent des caractéristiques épithéliales telles que :

- la polarité apico-basale, identifiée avec des marqueurs tels que la prominine 1 (membrane apicale), l'alpha6-intégrine (membrane basale) et les cadhérines (membranes latérales)(Kosodo and Huttner 2009).

- l'organisation en monocouches.

Les NES subissent plusieurs cycles de divisions visant à produire un nombre suffisant de cellules souches, indispensables à l'initiation de la neurogenèse. Ainsi, ces cellules permettent une expansion tangentielle du télencéphale dorsal, qui contribuera à former les hémisphères cérébraux.

Les NES se différencient en cellules de la glie radiaire qui représentent les cellules souches et progéniteurs produisant la majorité des neurones excitateurs du cortex (Malatesta *et al.* 2008). Les cellules neuroépithéliales produisent également des neurones dans les phases initiales de la neurogenèse, en même temps qu'elles produisent les cellules de la glie radiaire (Pinto and Gotz 2007). Par la suite, ces dernières deviennent la principale source de production de neurones. La transition entre les deux types cellulaires (cellules neuroépithéliales et glie radiaire) coïncide avec le début de la neurogenèse soit vers E9/E10 chez la souris.

4.2. Les cellules de la glie radiaire

Les cellules de la glie radiaire (CGR) sont localisées au bord des ventricules latéraux. Elles sont présentes dans tous les cerveaux de vertébrés. Du fait de la présence de la fibre piale caractéristique, ces cellules ont initialement été décrites pour leur rôle de support de la migration neuronale (Rakic 1971; Rakic 1971; Malatesta *et al.* 2008). Jusque dans les années 2000, on a considéré qu'elles n'étaient pas capables de produire des neurones malgré de nombreuses données contradictoires (Pollard and Conti 2007). Ce n'est qu'à cette époque, que plusieurs groupes ont sorti des études *in*

vivo et *in vitro* démontrant la fonction de progéniteurs nerveux des cellules de la glie radiaire (Malatesta *et al.* 2000; Hartfuss *et al.* 2001; Miyata *et al.* 2001; Noctor *et al.* 2001; Noctor *et al.* 2002; Pollard and Conti 2007).

Deux modes de division des CGR sont décrits : symétrique et asymétrique (**Figure 22**). Les CGR se divisent symétriquement pour produire deux CGR identiques, amplifiant ainsi le pool de progéniteurs (Pinto and Gotz 2007). Les CGR se divisent également asymétriquement pour produire des progéniteurs intermédiaires et des neurones (discuté dans la section 5).

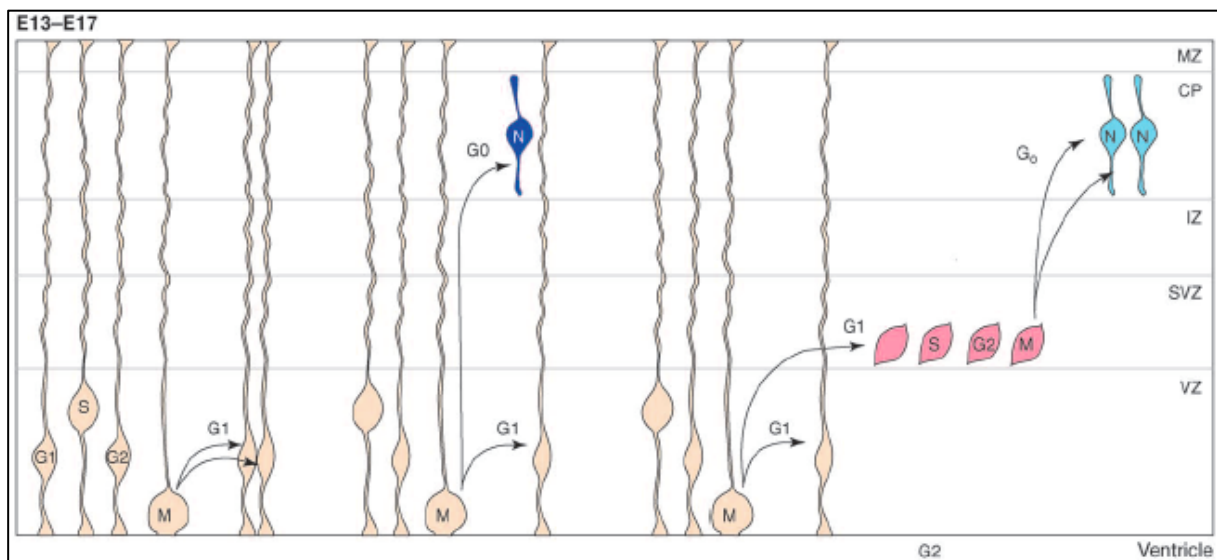


Figure 22 : les divisions des cellules de la glie radiaire. Les CGR se divisent symétriquement et produisent deux autres CGR. Elles se divisent également asymétriquement pour produire une autre CGR et un neurone (en bleu) ou un progéniteur basal (en rose) (Guillemot 2005).

Les CGR conduisent ainsi à la production de neurones glutamatergiques excitateurs représentant 80 % des cellules du néocortex (Mitsubishi and Takahashi 2009; Tabata *et al.* 2012), les interneurons inhibiteurs provenant des éminences ganglionnaires.

4.2.1. Morphologie

Dans le cortex, les CGR présentent des caractéristiques épithéliales héritées des NES mais expriment également des marqueurs gliaux (Guillemot 2005). Ces cellules présentent 2 types de fibres qui émanent de leur corps cellulaire :

- La fibre piale s'étend sur toute la longueur du cortex en formation jusqu'à la membrane basale. Cette dernière se situe vers l'extérieur du cerveau en formation. L'origine de cette inversion de la membrane basale provient des mouvements cellulaires qui conduisent à la formation du tube neural avec l'invagination puis la fermeture de la gouttière neurale. La partie apicale se retrouve ainsi dans la partie luminale du tube.

- La fibre apicale des cellules de la glie radiaire est beaucoup plus courte et rejoint les ventricules.

4.2.2. Migration intercinétique

Le noyau des cellules de la glie radiaire subit une migration dite intercinétique, dépendante de l'avancée du cycle cellulaire. En effet, il se situe au bord du ventricule en mitose tandis que les autres phases du cycle se déroulent à l'extrémité distale de la zone ventriculaire (Kriegstein and Alvarez-Buylla 2009). Cette migration intercinétique est également observée au cours de la division des cellules neuroépithéliales.

Bien que les mécanismes moléculaires régulant la migration intercinétique restent peu décrits, plusieurs protéines y participant sont connues. Parmi elles, on retrouve :

- Les moteurs moléculaires : les kinésines sont impliquées dans le mouvement intercinétique en direction de l'extrémité (+) des microtubules tandis que la dynéine est impliquée dans le mouvement en direction de l'extrémité (-) des microtubules (Taverna and Huttner 2010; Tsai *et al.* 2010). Le blocage du complexe moteur dynéine/dynactine conduit à une sortie prématurée du cycle cellulaire (Kriegstein and Alvarez-Buylla 2009).

- Le matériel péricentriolaire : Cep120, une protéine enrichie au centrosome, interagit avec TACC1-3 (transforming acidic coiled-coiled protein 1-3), une protéine associée au centrosome et aux microtubules, impliquée dans la migration nucléaire. Ces deux protéines régulent les dynamiques des microtubules (Xie *et al.* 2007). L'inhibition de l'expression de Cep120 ou de TACC1-3 par shRNA et à l'aide de l'électroporation *in utero*, bloque la migration intercinétique. Les progéniteurs se divisent alors à distance du ventricule. Il en résulte une sortie du cycle cellulaire et la génération de neurone migrant radialement (Xie *et al.* 2007). De même, la perturbation de l'interaction entre Hook3, une protéine qui associe le noyau au centrosome, et PCM1 (pericentriolar

material 1) *in vivo* altère la migration intercinétique et augmente la production de neurones (Ge *et al.* 2010).

La migration intercinétique pourrait permettre la modulation de l'exposition du noyau à Notch qui régule la neurogenèse. En effet, Notch stimule la prolifération et bloque la différenciation. Notch présente un gradient apico-basal avec une concentration plus forte dans la partie apicale du cortex en développement (Kriegstein and Alvarez-Buylla 2009).

4.2.3. Marqueurs

Les CGR expriment des marqueurs comme la nestine, qui est un filament intermédiaire, des antigènes pour RC1 et RC2 (Radial cell 1 et 2), ainsi que des marqueurs de cellules astrocytaires comme le transporteur du glutamate GLAST (Glutamate astrocyte-specific transporter), la glutamine synthétase, la sous-unité beta de la protéine liant le calcium (S100beta), la ténacine C, la vimentine (un autre filament intermédiaire du cytosquelette), la BLBP (brain lipid binding protein) (**Figure 23**)(Pinto and Gotz 2007; Kriegstein and Alvarez-Buylla 2009). De façon intéressante, lorsque l'on compare l'expression de la GFAP (glial fibrillary acid protein) entre différentes espèces, on observe une disparité évidente. Ce marqueur est exprimé par les cellules de la glie radiaire du cortex des primates mais est absent de celles du cortex des rongeurs. Par ailleurs, ce marqueur est présent dans toutes les cellules souches nerveuses adultes dérivant de la glie radiaire embryonnaire quelle que soit l'espèce étudiée. Le promoteur de la GFAP humaine, lorsqu'il est inséré au génome murin par transgénèse, s'exprime au cours du développement embryonnaire par ces cellules (Malatesta *et al.* 2008).

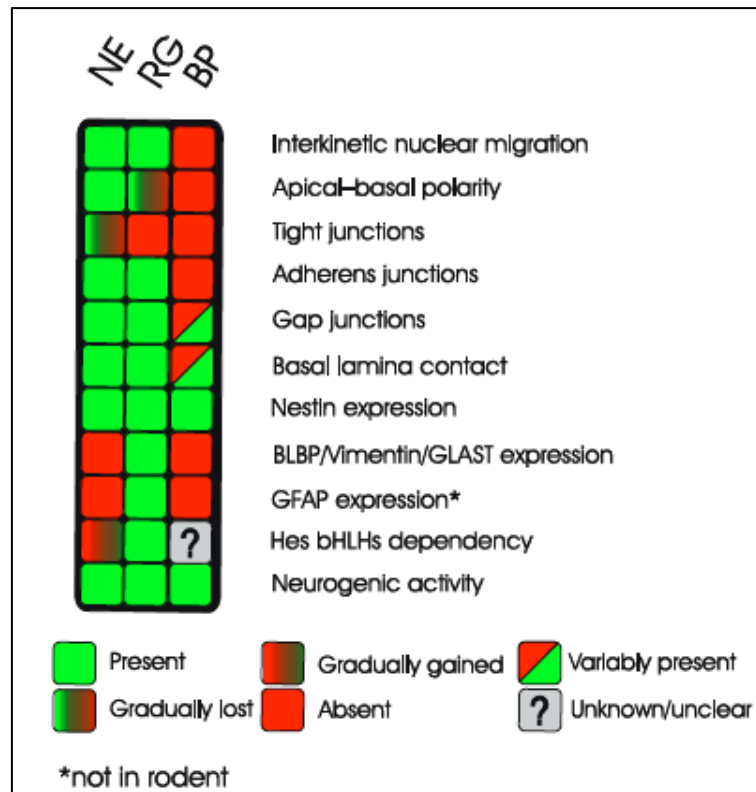


Figure 23 : Caractéristiques des différentes populations de progéniteurs du cortex en développement (Malatesta et al. 2008). NE= cellules neuro-épithéliales; RG= cellules de la glie radiaire; BP= progéniteurs basaux.

4.3. Les progéniteurs intermédiaires

Un dernier type de progéniteurs se différencie à partir des CGR : ce sont les progéniteurs intermédiaires encore appelés progéniteurs basaux. Contrairement aux CGR, ils ne se situent pas au bord du ventricule et ils se divisent exclusivement dans la zone sous-ventriculaire.

Les progéniteurs intermédiaires ne possèdent ni la structure bipolaire des cellules de la glie radiaire, ni n'expriment de marqueurs astrogliaux. De plus, ils n'expriment plus Hes, un facteur de transcription qui maintient l'état prolifératif et inhibe la neurogenèse (Pinto and Gotz 2007). Ces progéniteurs intermédiaires se distinguent également des progéniteurs apicaux par l'expression de nouveaux marqueurs, comme le facteur de transcription Tbr2 (T-box brain gene-2) (Malatesta et al. 2008). L'existence de cette seconde population de progéniteurs permettrait d'amplifier certaines populations de neurones à des moments spécifiques de la neurogenèse. En effet, dans leur grande majorité, ils ne sont capables, chez la souris, que d'effectuer, des

divisions terminales donnant naissance à deux neurones post-mitotiques (Pinto and Gotz 2007). Dans le cerveau des primates, ces progéniteurs sont beaucoup plus nombreux. En effet, ceux-ci pourraient contribuer à l'évolution du volume du cerveau (Tabata *et al.* 2012).

5. Mécanismes de production des nouveaux neurones

Les neurones sont produits de différentes manières : (i) directement après la division d'une cellule de la glie radiaire ou (ii) indirectement *via* la progéniteurs basaux comme décrits précédemment (**Figure 24**).

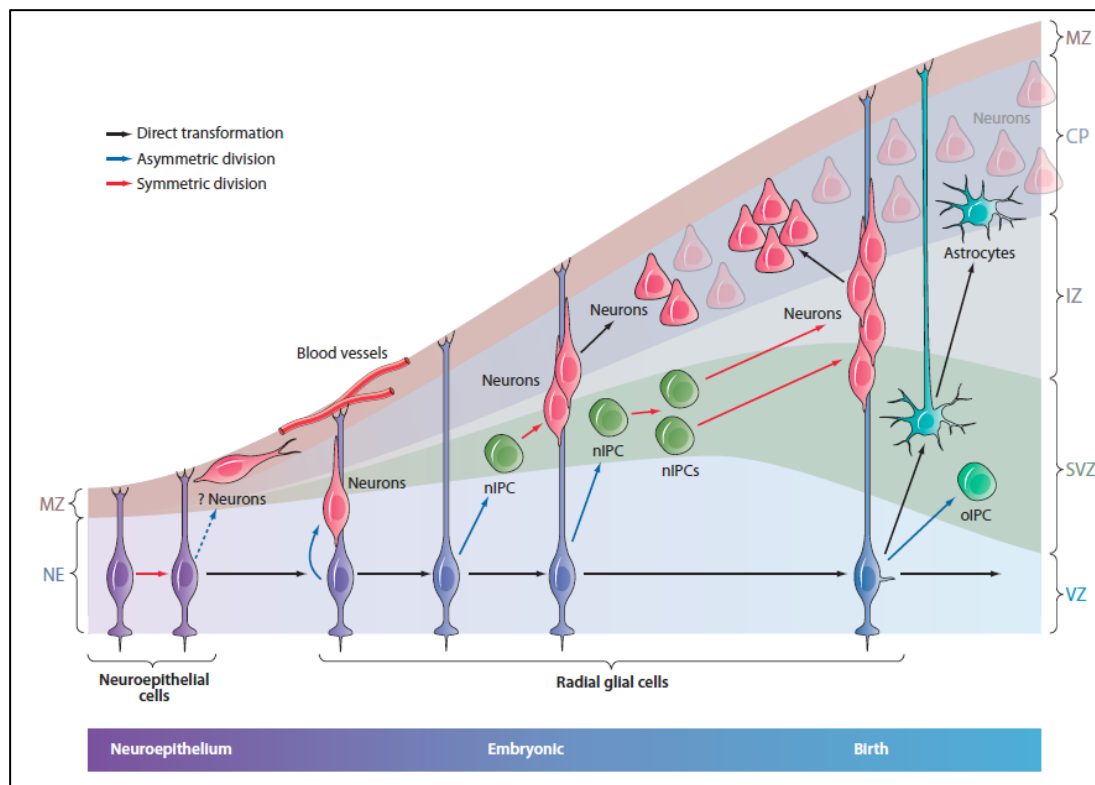


Figure 24 : Les modes de production de neurones : directement par divisions asymétriques ou indirectement par les progéniteurs intermédiaires (nIPC) après une ou deux divisions (Kriegstein and Alvarez-Buylla 2009).

5.1. Production directe

En marquant les cellules avec un colorant vital (le DiI), il a été observé, par vidéo-microscopie que celles-ci produisent, par division asymétrique, un neurone post-

mitotique, et une autre cellule fille progénitrice qui peuvent l'un et l'autre, conserver ou non la fibre piale de la cellule mère en fonction de l'avancée de la neurogenèse. En effet :

- En début de neurogenèse (lorsque le cortex est encore fin), le neurone hérite de la fibre piale, contrairement à la cellule fille progénitrice qui doit de nouveau l'étendre (Miyata *et al.* 2001).

- Lors de la progression de la neurogenèse et de l'épaississement du cortex, le neurone post-mitotique n'hérite pas de la fibre et migre le long de la fibre piale de l'autre cellule fille (Weissman *et al.* 2003; Noctor *et al.* 2004).

5.2. Production indirecte

Les cellules de la glie radiaire se divisent aussi asymétriquement pour produire un progéniteur intermédiaire et une cellule de la glie radiaire. Ce progéniteur intermédiaire va rejoindre la zone sous-ventriculaire et produire deux neurones au cours d'une division terminale ou alors, phénomène plus rare, produire deux autres progéniteurs intermédiaires (Kriegstein and Alvarez-Buylla 2009).

5.3. Mécanismes impliqués dans le choix du type de division

Quels sont les mécanismes qui conditionnent le choix entre divisions symétriques et divisions asymétriques ? Chez la drosophile, le choix du type de division est régulé par l'orientation du fuseau de division (Knoblich 2008). Par comparaison à la division des neuroblastes chez la drosophile, on a souvent cherché à montrer que l'orientation du fuseau de division pouvait conditionner le devenir cellulaire des cellules de la glie radiaire chez les mammifères. En effet, les cellules de la glie radiaire ont une asymétrie apico-basale du fait de leurs caractéristiques épithéliales et elles maintiennent les fibres piale et apicale au cours de la division. Les premières expériences réalisées chez le furet ont démontré que l'orientation du plan de clivage des cellules progénitrices était associée au devenir cellulaire. En effet, les divisions horizontales sont asymétriques et les divisions verticales sont généralement symétriques (Chenn and McConnell 1995). Mais cette comparaison a des limites. En effet, le nombre des divisions horizontales est extrêmement faible et ne peut expliquer à lui seul tous les neurones produits (Stricker *et al.* 2006; Konno *et al.* 2008).

Chez la drosophile, il existe des déterminants cellulaires qui sont distribués de façon asymétrique au sein de la cellule progénitrice nerveuse (facteurs intrinsèques) et dont la répartition au sein des cellules va dépendre de l'orientation du plan de clivage (Knoblich 2008). Des déterminants cellulaires ont été décrits parmi lesquels Par-3 et Par-6, Numb, et Inscuteable (**Figure 25**). Ces derniers ont été étudiés également chez la souris.

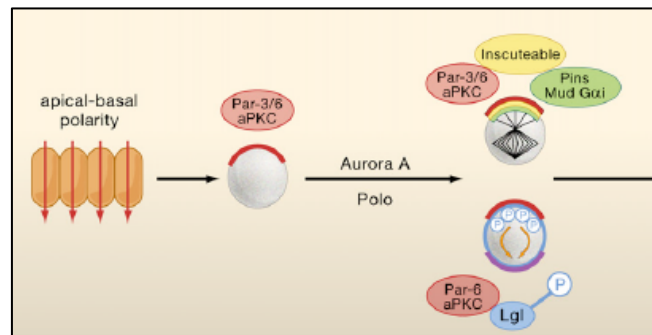


Figure 25 : Divisions asymétriques et ségrégation de marqueur chez la drosophile (Knoblich 2008). Par-3/6 et aPKC forment un complexe apical. Mud oriente le fuseau de division et est recruté au pôle apical par Pins et Gai. Mud s'associe ensuite à inscuteable et Par-3.

5.3.1. Par-3 et Par-6

Certains gènes homologues de ceux de la drosophile impliqués dans les divisions asymétriques, comme Par-3 et Par-6, ont des fonctions conservées chez la souris. En effet, l'inactivation de Par-3 ou Par-6, conduit à une sortie du cycle cellulaire et à une différenciation des progéniteurs (Costa *et al.* 2008). De plus, la surexpression de Par-6 augmente le nombre de divisions asymétriques.

5.3.2. Numb

Numb a deux homologues chez la souris : Numb et Numlike. Le premier a une localisation baso-latérale, au niveau des jonctions adhérentes, et le second est une protéine cytoplasmique sans asymétrie quant à sa localisation. Numb semble réguler la polarité épithéliale plutôt que véritablement jouer un rôle de marqueur de ségrégation (Knoblich 2008).

5.3.3. Inscuteable

L'homologue de Inscuteable chez la souris (mouse Inscuteable ou mINSC) joue un rôle important dans le devenir cellulaire en régulant l'orientation du fuseau de division

(Figure 26)(Postiglione *et al.* 2011). Chez la drosophile, une seule fonction (régulation de l'orientation du fuseau de division) est décrite pour mINSC. Ceci contraste avec les autres protéines identifiées chez la drosophile pour cette même fonction et permet donc d'étudier spécifiquement le rôle de l'orientation du fuseau de division. Les auteurs démontrent, à l'aide de l'inactivation et de la sur-activation de mINSC, que cette protéine régule l'orientation du plan de clivage dans le cortex murin en développement (Postiglione *et al.* 2011). L'inactivation du gène réduit les divisions obliques et horizontales tandis que la surexpression produit l'effet inverse avec l'augmentation des divisions verticales. L'analyse clonale des cellules issues de ces divisions a permis de conclure que les divisions verticales permettent une production directe de neurones par les cellules de la glie radiaire tandis que les divisions obliques et horizontales génèrent des progéniteurs intermédiaires qui produiront deux neurones à la suite d'une division terminale (Postiglione *et al.* 2011).

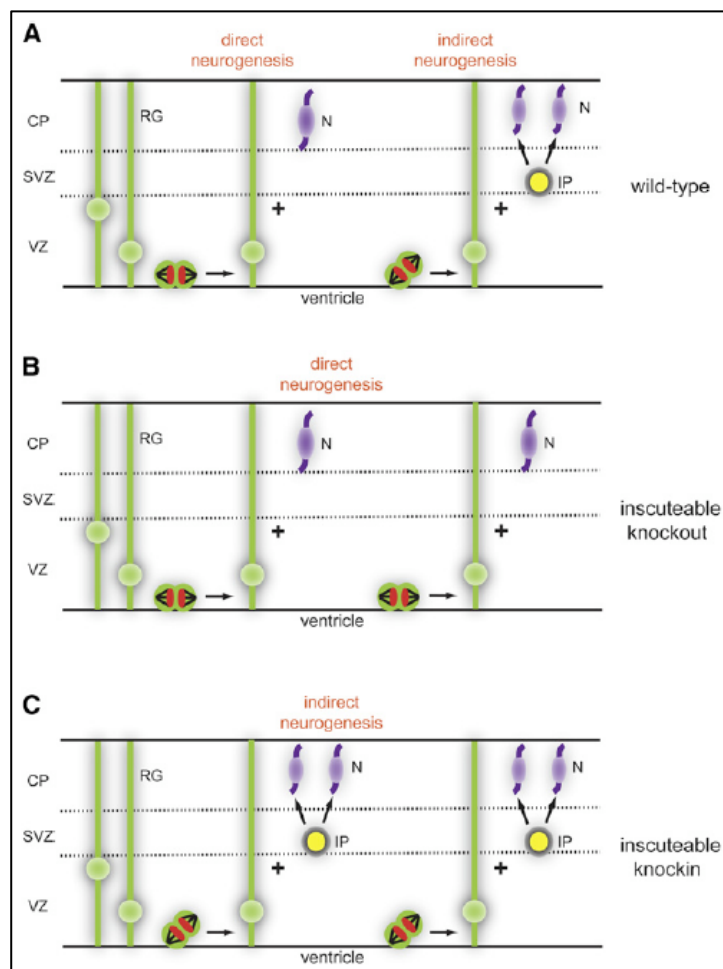


Figure 26 : Modèle du lien entre l'orientation du fuseau de division et le devenir cellulaire, dans le cas de l'inactivation ou la surexpression de mINSC (Postiglione *et al.* 2011).

5.3.4. Protéines impliquées dans les microcéphalies

Certaines protéines impliquées chez l'homme dans des microcéphalies et des lissencéphalies humaines, modulent l'orientation du fuseau de division et les divisions symétriques chez la souris (Yingling *et al.* 2008). Ainsi, LIS1 est essentiel à l'orientation du fuseau de division (**Figure 27**). Il assure l'ancrage des microtubules astraux au cortex cellulaire, permettant d'orienter le fuseau mitotique qui conditionnera l'orientation du plan de clivage et la nature de la division (symétrique ou asymétrique). L'inactivation du gène conduit à une augmentation des divisions horizontales et de fait, l'analyse du devenir des cellules indique la nature asymétrique de ces divisions. D'autres protéines causant des microcéphalies sont associées également à une augmentation des divisions obliques et horizontales, tels que Magoh (Silver *et al.* 2010) et Nde1 (Feng and Walsh 2004).

Dans les cellules neuroépithéliales, les divisions asymétriques induisent leur apoptose, limitent l'expansion tangentielle et, par conséquent, réduisent le pool de progéniteurs pour initier la neurogenèse (Yingling *et al.* 2008). De plus, l'augmentation du nombre de divisions asymétriques des CGR conduit également à une déplétion des progéniteurs et à une augmentation de la production de neurones issus de ces divisions. Il en résulte une diminution du nombre final de neurones.

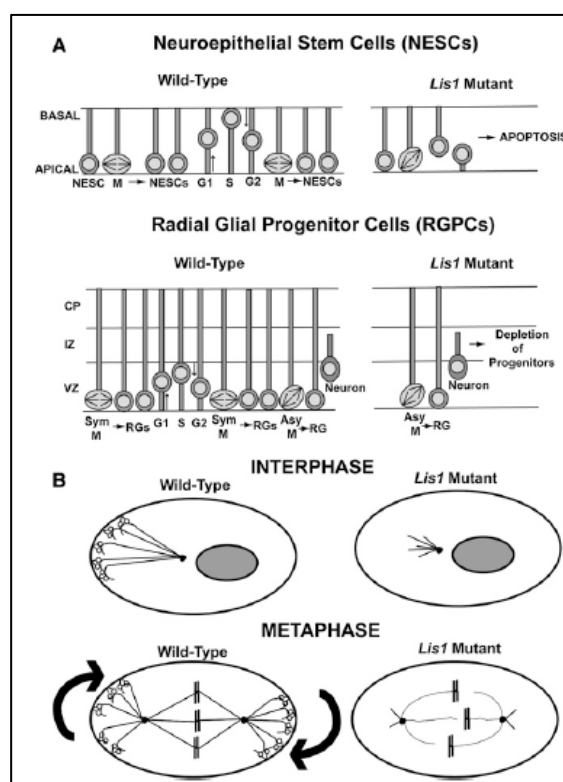


Figure 27 : Modèle représentant le rôle de LIS1 dans les divisions symétriques et asymétriques des cellules neuroépithéliales et de la glie radiaire (Yingling *et al.* 2008). (A) Dans les cellules neuroépithéliales, le mutant Lis1 induit l'apoptose des cellules filles. Dans les cellules de la glie radiaire, le mutant Lis1 induit une déplétion des progéniteurs. (B) Modèle moléculaire expliquant le défaut d'orientation du fuseau de division des mutants Lis1.

5.4. Synthèse sur le lien entre orientation du plan de clivage et la nature de la division

De nombreuses autres protéines participent à la régulation de l'orientation du fuseau de division (Lancaster and Knoblich 2012). Les conséquences de la perte de leurs fonctions sont résumées dans la **table 2**.

Regulators of spindle orientation and their phenotypes in the neocortex			
Gene/protein	Function	Effect on spindle	Cortical phenotype (human; mouse or rat)
Centrosome/MTOC			
MCPH1	DNA damage repair, chromosome condensation, centrosome function	LOF: increased vertical orientation [48*]	Microcephaly [76]; mild microcephaly [48*]
ASPM	Centrosome/spindle pole localization, Wnt signaling	LOF: increased oblique orientation [49]	Microcephaly, simplified gyri [77]; mild microcephaly [78]
Cdk5Rap2	Centrosome function, centriole duplication, DNA damage response	LOF: increased vertical orientation [79*]	Microcephaly [80]; microcephaly [79*]
Cenpj	Centrosome localization, centriole duplication and elongation	LOF: randomized in HeLa cells [81]	Microcephaly [80]
Stil	Spindle pole localization, centriole duplication, Shh signaling	LOF: randomized in HeLa cells [81]	Microcephaly, simplified gyri [82]; neural tube defects [83]
Microtubule organization/positioning			
DCX	Microtubule organization, stability	LOF: randomization [13]	Lissencephaly/Subcortical band heterotopia [84]; neuronal migration defects [85]
Lis1	Dynein/dynactin complex function	LOF: randomization [51]	Lissencephaly; cortical disorganization [86]
Magoh	Splicing, Lis1 expression	LOF: increased vertical and oblique [87*]	Cortical disorganization, microcephaly
Nde1	Lis1-dynein complex	LOF: increased vertical and oblique [17]	Microcephaly; mild microcephaly [88,89]
Arhgef2	GEF, microtubule associated	LOF: increased planar orientation [90]	Decreased neurons, increased RGs
Tctex1	Dynein light chain, G protein signaling	LOF: decreased planar orientation [90]	Increased neurons, decreased RGs
Htt	Dynein-dynactin complex	LOF: increased vertical and oblique orientation [91*]	Huntington disease; decreased RGs, increased neurons [91*]
Apical complex			
Par3	Apicobasal polarity	LOF: increased oblique and vertical in MDCK [32]	Decreased RGs (LOF), increased RGs (GOF) [53,60]
Par6	Apicobasal polarity	LOF: increased oblique in Caco-2 cells [27]	Increased RGs (GOF) [53]
aPKC	Apicobasal polarity	LOF: increased oblique in Caco-2 cells [27]	Normal neurogenesis (aPKC λ)
Cdc42	Apicobasal polarity	LOF: Increased oblique in Caco-2 cells [92], but no change in telencephalon [93]	Decreased RGs, increased IPs [93]
Adherens junctions			
Beta-catenin	Adherens junctions, Wnt signaling	LOF: increased oblique and vertical orientations in midbrain [94]	Decreased RGs (LOF) [95], increased RGs (GOF) [96]
Spindle positioning			
mlnsc	Spindle orientation	LOF: increased planar orientation [40*], GOF: increased vertical and oblique orientation [40*,41]	Decreased neurons and IPs (LOF) [40*], increased IPs and oRGs (GOF) [40*,41]
LGN	Spindle orientation	LOF: increased oblique and vertical orientations [41]	Decreased RGs, increased IPs and oRGs [41]
Other			
Lamin-B	Nuclear lamina	LOF: increased oblique orientations [97]	Cortical disorganization [97]
Pax6	Transcription factor, neurogenesis and self-renewal	LOF: increased oblique and vertical orientations [98]	Increased asymmetric fates [98]
Vangl2	Planar cell polarity	LOF: increased planar orientation [99]	Increased early-born neurons, decreased RGs [99]
Not all factors affecting cortical progenitor asymmetric division are shown. This table is limited to those factors where spindle orientation was specifically examined. LOF = Loss of function, GOF = Gain of function.			

Table 2 : Les protéines impliquées dans la régulation du fuseau de division dans le néocortex en développement et les conséquences de leur inactivation (Lancaster and Knoblich 2012).

L'ensemble de ces résultats peut être mis en perspective avec la nature hétérogène des cellules de la glie radiaire. En effet, l'analyse clonale des CGR a révélé

que celles-ci sont composées de différents sous-types (Pinto and Gotz 2007), et que la nature de la division dépendrait de ces sous-types cellulaires. La majorité de ces sous-types ne produisent qu'un type cellulaire donné, neuronal ou astrocytaire (**Figure 28**). Bien que les astrocytes soient générés très tardivement, les CGR spécifiées pour être à leur origine, sont présentes dès le début de la neurogenèse. De plus, pendant la phase neurogénique, la majorité des CGR (60-70%) isolées et cultivées à très faible densité, ne produisent que des neurones alors qu'une minorité de ces cellules se divise exclusivement de façon symétrique ou produit des astrocytes (Pinto and Gotz 2007). En conclusion, ce ne sont pas exactement les mêmes sous-types cellulaires qui se divisent symétriquement et asymétriquement.

Ainsi, mINSC affecterait l'orientation du fuseau de division (Postiglione *et al.* 2011) exclusivement dans le sous-type de cellules de la glie radiaire qui serait affecté à la production de neurones. Ceci concilierait les résultats des autres études dans lesquelles les protéines étudiées, comme Lis 1, auraient un spectre d'action plus large et impliqueraient d'autres sous-types (Yingling *et al.* 2008). En conclusion, le positionnement du fuseau de division et l'orientation du plan de clivage conditionnent, du moins en partie, la nature de la division des cellules de la glie radiaire. Il en résulte une modulation du nombre final de neurones.

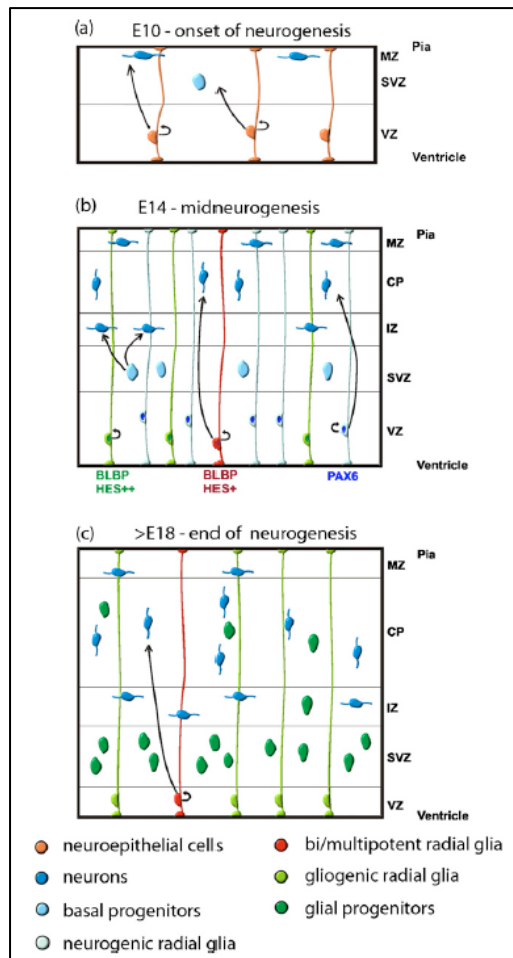


Figure 28 : Hétérogénéité des cellules de la glie radiaire. (a) Les cellules neuroépithéliales au début de la neurogenèse se divisent symétriquement et asymétriquement. (b) Au stade E14, différents sous-types de cellules de la glie radiaire sont présents : certains se divisent exclusivement symétriquement ils expriment BLBP et des niveaux élevés de Hes, d'autres se divisent exclusivement asymétriquement et expriment PAX6. Un autre sous-type est bi-potent et capable de produire des neurones et des astrocytes (BLBP et expression réduite de Hes). Enfin, il existe également un sous-type produisant uniquement des astrocytes qui se divise en majorité de façon symétrique (c). Ces cellules par la suite se différencient en progéniteurs gliaux à la fin de la période neurogénique (Pinto and Gotz 2007).

6. Fenêtre de régulation des différentes populations neuronales

6.1. Formation du cortex : le modèle « inside out »

Les premiers neurones corticaux générés forment la première couche neuronale, appelée pré-plaque (stade E11,5 chez la souris)(Molyneaux et al. 2007). Les différentes vagues de neurones produits par la suite séparent la pré-plaque en une couche superficielle qui formera la zone marginale et une couche plus profonde, que ces derniers traversent, nommée sous-plaque (Kriegstein and Noctor 2004).

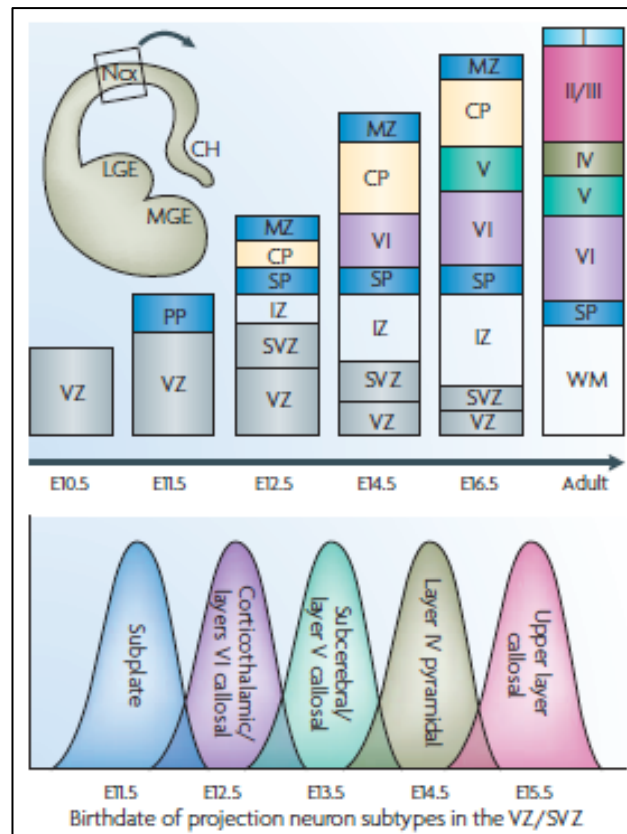


Figure 29 : Représentation schématique de l'ordre d'apparition des différentes couches neuronales et du stade de production des différentes populations de neurones (Molyneaux et al. 2007). Ncx= néocortex; CH= ourlet cortical; LGE= éminence ganglionnaire latérale; MGE= éminence ganglionnaire médiane; PP= pré-plaque; VZ= zone ventriculaire; SVZ= zone sous-ventriculaire; IZ= zone intermédiaire; CP= plaque corticale; SP= sous-plaque; MZ= zone marginale; I, II/III, IV, V, VI= identification des couches corticales.

La chronologie de production des neurones est cruciale pour déterminer à quelle sous-population ceux-ci vont appartenir et leur positionnement dans le futur cortex. En effet, les neurones sont produits dans une fenêtre de temps donnée et colonisent une couche cellulaire du néocortex déterminée pour former les six couches cellulaires (**Figure 29**). Les différentes couches sont créées selon un schéma dénommé « inside-out » (Molyneaux et al. 2007). Les couches les plus profondes du cerveau sont formées les premières. Par la suite, les neurones nouvellement produits traversent les premiers jusqu'à atteindre la partie distale de la plaque corticale et former la couche supérieure et ainsi de suite (Tabata *et al.* 2012). Cette chronologie de production est la même pour les interneurones issus des éminences ganglionnaires et les neurones pyramidaux issus du cortex (Kriegstein and Noctor 2004).

6.2. Régulation du volume du cerveau et du nombre de neurones

La taille de cerveau et le nombre de neurones sont variables entre les espèces mais remarquablement similaires entre individus d'une même espèce. Parmi les paramètres qui régulent ces caractéristiques, les plus finement régulés sont la durée de la neurogenèse et le taux de production de neurones au cours de la phase neurogénique.

Durée de la neurogenèse

Avant le début de la phase neurogénique, les cellules neuroépithéliales passent par une phase d'expansion latérale au cours de divisions symétriques amplificatrices. L'existence de cette étape, ainsi que sa durée, conditionnent le nombre de cellules progénitrices de départ pour initier la phase neurogénique. Par exemple, chez l'homme, la neurogenèse débute quelques jours plus tard par rapport au singe. Ceci permet 3 à 4 divisions supplémentaires et, *in fine*, une expansion de la surface cortical 8 à 16 fois plus importante (Miyata *et al.* 2010).

La phase neurogénique, comme cité précédemment (section 3.1), coïncide avec la transition des cellules neuroépithéliales en cellules de la glie radiaire. Fgf10, exprimé transitoirement à ce stade, est impliqué dans cette transition. Lorsque l'on supprime l'expression de Fgf10 chez la souris, la transition entre les deux types cellulaires est retardée, induisant, dans un premier temps, un retard de la neurogenèse puis un excès de production de neurones dans la région rostrale du néocortex (Sahara and O'Leary 2009). Ceci conduit à une augmentation du volume final du cerveau.

Taux de production de neurones

Par ailleurs, la production de neurones peut être accrue par une augmentation du potentiel prolifératif des progéniteurs intermédiaires. Chez les rongeurs, une majorité d'entre eux produit directement 2 neurones à la suite d'une division terminale alors que seulement 10% de ces progéniteurs intermédiaires font un cycle de division supplémentaire avant d'effectuer leur division terminale (Noctor *et al.* 2004). A l'inverse, les progéniteurs intermédiaires chez l'homme, gardent beaucoup plus longtemps leur statut de progéniteurs et sont donc capables de s'amplifier un grand nombre de fois.

7. De la nécessité de migrer pour atteindre sa position finale

Les neurones post-mitotiques, étant produits à distance de leur localisation définitive, doivent migrer pour atteindre leur position finale. Les neurones, produits au bord du ventricule par les progéniteurs apicaux et dans la zone sous-ventriculaire par les progéniteurs basaux, rejoignent la plaque corticale en suivant une migration dite « radiaire ». En parallèle, les neurones générés dans les éminences ganglionnaires migrent de façon tangentielle pour rejoindre leur emplacement dans la plaque corticale en formation.

7.1. La migration radiaire

7.1.1. Les modes de migration

Deux modes de migration radiaire sont décrits : la locomotion et la translocation somatique. Dans le premier mode, les cellules de la glie radiaire se divisent de façon asymétrique pour produire un neurone et une autre cellule de la glie radiaire. Cette dernière conserve la fibre piale issue de la cellule mère. Cette fibre piale va servir de support de migration pour le neurone issu de cette division (Noctor *et al.* 2004). Le second mode de migration est associé à une division asymétrique où le neurone cette fois-ci hérite de la fibre piale. Ce dernier migre en transférant son soma en direction de la membrane basale et en résorbant progressivement sa fibre piale (Miyata *et al.* 2001).

Avant de migrer sur la fibre piale au cours du phénomène de locomotion, le neurone post-mitotique passe à travers différentes phases de migration (**Figure 30**)(Noctor *et al.* 2004).

Phase 1 : Le neurone post-mitotique migre rapidement de la zone ventriculaire, où il a été généré, vers la zone sous-ventriculaire.

Phase 2 : Il s'arrête ensuite 24 heures ou plus et adopte une morphologie multipolaire. C'est la phase de migration multipolaire (Heng *et al.* 2010). Cette phase de migration pourrait permettre de synchroniser la migration des interneurones issus de la migration tangentielle.

Phase 3 : Le neurone retourne vers le ventricule. Le retour au ventricule concerne une majorité de neurones mais n'est pas systématique (Noctor *et al.* 2004).

Phase 4 : Enfin, le neurone subit une polarisation, en adoptant la forme bipolaire caractéristique des neurones migrant sur une cellule de glie radiaire et migre radialement vers la plaque corticale (Noctor *et al.* 2004).

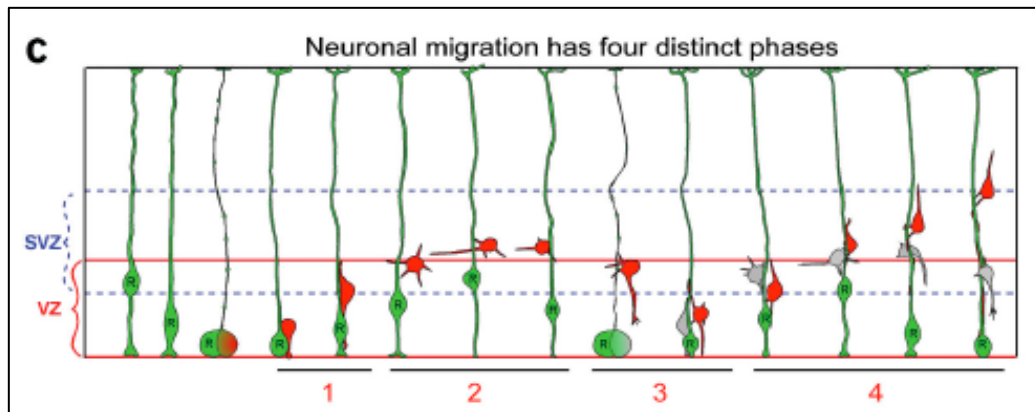


Figure 30 : Mécanismes de migration radiale (Noctor *et al.* 2004). Les nouveaux neurones corticaux migrent à travers quatre différentes phases.

Les neurones au cours des processus de migration émettent une extension neuritique qui explore l'environnement. Puis, le noyau subit un mouvement de translocation (appelé nucléokinèse) en direction de cette extrémité neuritique, une fois que celle-ci est stabilisée (Ayala *et al.* 2007). Ce mouvement est permis par une cage de microtubules entourant le noyau. Ces microtubules se projettent à partir du centrosome situé en avant et ils exercent une force de traction qui tire le noyau vers le centrosome (Ayala *et al.* 2007). A l'arrière du noyau, le réseau d'acto-myosine se contracte également pour propulser le noyau (Bellion *et al.* 2005; Schaar and McConnell 2005; Tsai *et al.* 2007). En effet, l'inhibition de la myosine II (un moteur moléculaire basé sur l'actine) par la blebbistatine, perturbe la nucléokinèse (Bellion *et al.* 2005).

7.1.2. Les voies de signalisation impliquées

De nombreuses voies de signalisation sont impliquées dans la migration radiale et modifient les réseaux d'actines et de microtubules (Heng *et al.* 2010). Parmi ces voies de signalisation, la protéine kinase cyclin dependent-kinase 5 (Cdk5) joue un rôle majeur dans les processus modulant le cytosquelette, directement en régulant des protéines s'associant aux réseaux de microtubules et/ou d'actine, ou indirectement en

régulant d'autres voies de signalisation (**Figure 31**). En effet, Cdk5 phosphoryle des protéines telles que p27, Pak1, DCX, Nudel, FAK, DISC1 et Dixdc1 impliquées dans la migration. L'inactivation de Cdk5 conduit à des défauts sévères de migration et une létalité périnatale (Su and Tsai 2011). L'inactivation de Cdk5 bloquent les neurones en migration au stade multipolaire (Heng *et al.* 2010).

La protéine p27

La protéine p27 régule la migration neuronale puisqu'il a été montré que son inactivation par RNAi inhibait cette migration (Kawauchi *et al.* 2006). De plus, la phosphorylation de p27 par Cdk5 module la migration neuronale (Heng *et al.* 2010). La voie p27/Cdk5 active la cofiline, une protéine associée au réseau d'actine, qui, elle aussi, est impliquée dans la migration neuronale (Kawauchi *et al.* 2006). En effet, p27 prévient l'activation de RhoA et limite l'inactivation de la cofiline par la voie de signalisation RhoA/ROCK/LIMK (Heng *et al.* 2010).

La protéine Pak1 (serine/threonine p21-activated kinase 1)

L'activateur de Cdk5, p35, s'associe avec Rac. La kinase Pak1 colocalise avec le complexe Rac/p35/Cdk5 (Nikolic *et al.* 1998). Cdk5/p35 induit une hyperphosphorylation de Pak1, et ce, de manière dépendante de Rac. Ceci conduit à une diminution de l'activité kinase de Pak1. Au final, la régulation par Pak1 module les dynamiques de réorganisation du réseau d'actine et permet la migration neuronale (Nikolic *et al.* 1998).

La doublecortine (DCX)

La protéine DCX s'associe aux microtubules et augmente leur stabilité (Moore *et al.* 2004). L'inactivation de la DCX altère la migration des neurones en déstabilisant les microtubules autour de l'enveloppe nucléaire et en perturbant le déplacement du noyau au cours de la migration (Bai *et al.* 2003; Heng *et al.* 2010). Le niveau de phosphorylation de DCX, régulé par plusieurs kinases dont Cdk5, réduit son association aux microtubules (Tanaka *et al.* 2004). Ainsi, la phosphorylation de DCX sur la sérine 297 par Cdk5 permet d'augmenter les dynamiques du cytosquelette pendant la migration des neurones (Tanaka *et al.* 2004; Su and Tsai 2011).

La protéine Nudel (Nuclear distribution gene E homolog-like)

Nudel, qui régule la localisation de la dynéine, est également la cible de Cdk5 (Niethammer *et al.* 2000; Sasaki *et al.* 2000). Sa phosphorylation augmente son association à Lis1. Lis 1 est une protéine associée aux microtubules et augmente leur stabilité. Le complexe Nudel/Lis1 s'associe ainsi de façon plus stable aux microtubules (Heng *et al.* 2010) et assure le couplage du centrosome et la translocation du noyau au cours de la migration. Lis 1 interagit également avec DCX pour réguler l'activité de la dynéine (Ayala *et al.* 2007).

La protéine FAK (focal adhesion kinase)

La protéine FAK est également phosphorylée par Cdk5 en sérine 732. La phosphorylation de FAK est nécessaire à l'organisation des microtubules, aux mouvements du noyau et à la migration neuronale (Xie *et al.* 2003). En effet, elle régule la translocation du noyau au cours des processus migratoires puisque l'inhibition de la phosphorylation (par la surexpression de FAK S732A dont la phosphorylation est bloquée génétiquement), conduit à une perturbation du mouvement du noyau *in vitro* (Xie *et al.* 2003).

La protéine DISC1 (disrupted in schizophrenia-1)

Cdk5 phosphoryle DISC1 en sérine 710 (Ishizuka *et al.* 2011). Cette phosphorylation permet le recrutement de BBS1 (Bardet-Biedl syndrome 1) au centrosome. L'inactivation de BBS1 ou de DISC1 conduit à des défauts de migration. L'expression d'une forme phospho-mimétique de DISC1 en sérine 710, après inactivation de cette protéine, rétablit le phénotype migratoire (Ishizuka *et al.* 2011). Par ailleurs, la forme phospho-mimétique de DISC1 compense également une partie des défauts de migration induits par l'expression d'une forme dominante négative de Cdk5.

De plus, DISC1 s'associe avec Dixdc1 (DIX domain containing-1), qui est également la cible de Cdk5 dans ces processus de migration neuronale (Singh *et al.* 2010). En effet, la phosphorylation de Dixdc1 par Cdk5 augmente son affinité avec Nudel (Su and Tsai 2011). Cette interaction Nudel/DISC1/Dixdc1 est requise pour la migration neuronale (Singh *et al.* 2010).

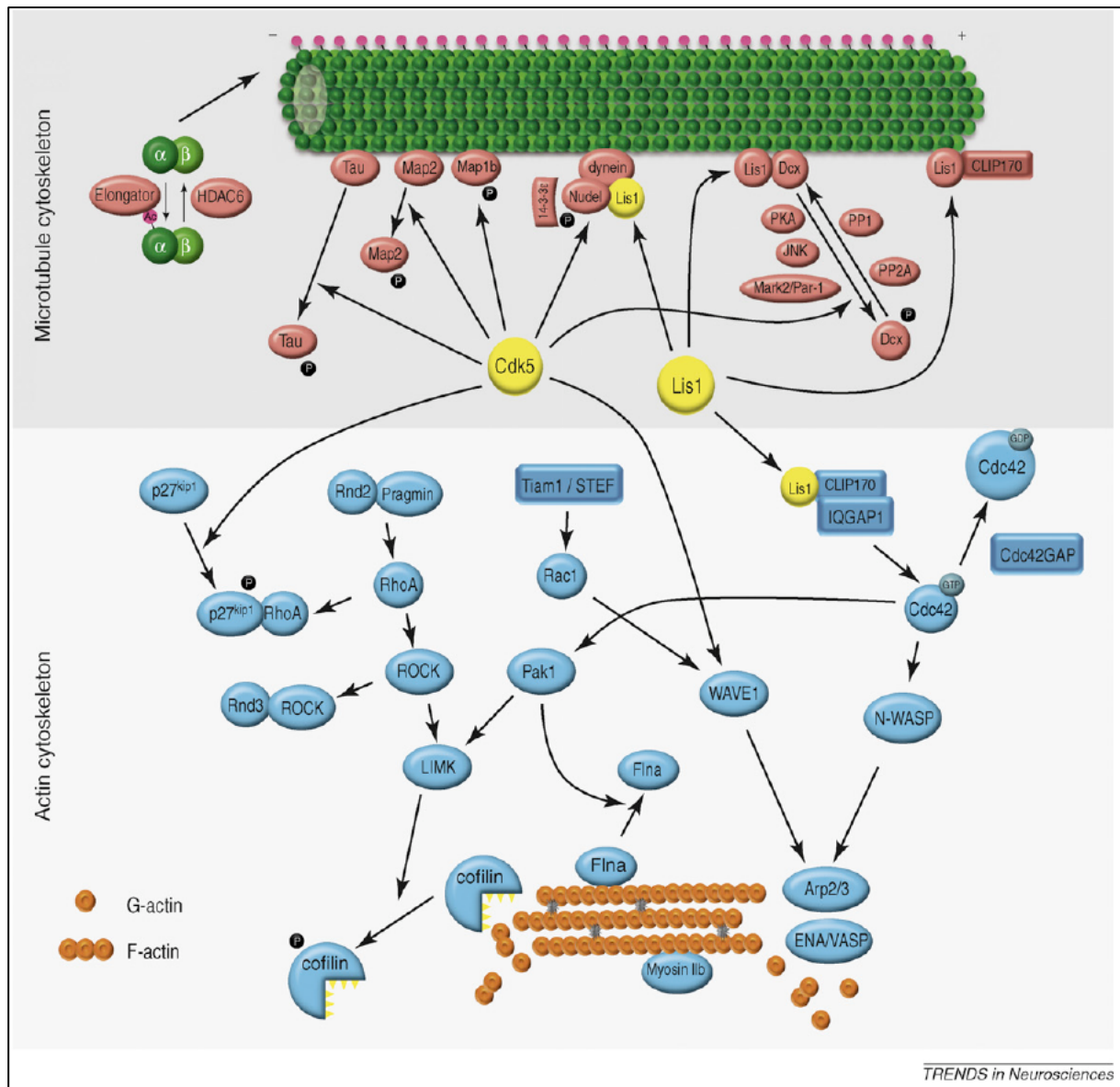


Figure 31 : Les voies de régulation du cytosquelette d'actine et de microtubule (Heng et al. 2010). Les cibles de Cdk5 et de Lis1 (en jaune) sont indiquées par des flèches.

7.2. La migration tangentielle

Pour rejoindre la plaque corticale, les interneurons issus des éminences ganglionnaires du télencéphale ventral (principalement la zone médiane) migrent tangentiellement en empruntant différents trajets (**Figure 32**). Ils passent par les zones ventriculaire et sous-ventriculaire, par la zone intermédiaire et par la zone marginale. Une fois à proximité de leur position finale, ils rejoignent la plaque corticale *via* une

migration cette fois-ci radiaire, voire oblique, de façon à adopter une trajectoire plus directe (Kriegstein and Noctor 2004).

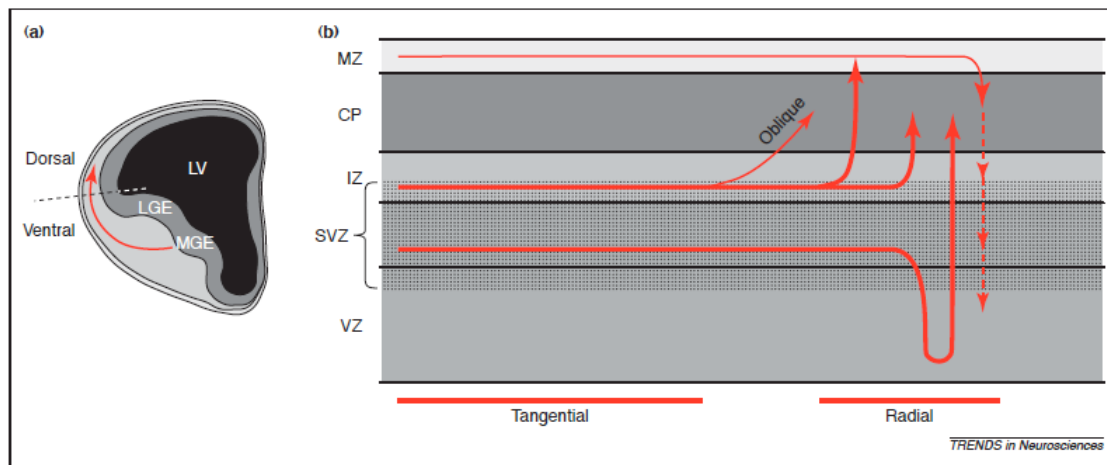


Figure 32 : Voies migratoires des interneurons issus des éminences ganglionnaires (Kriegstein and Noctor 2004).

8. Huntingtine et développement du cerveau

L'inactivation du gène de la HTT, conduisant à une létalité embryonnaire, a mis pour la première fois en lumière sa fonction capitale au cours du développement (Duyao *et al.* 1995; Nasir *et al.* 1995; Zeitlin *et al.* 1995). Bien que la létalité ait lieu au stade E7.5, c'est-à-dire avant la mise en place du système nerveux, les différentes équipes ont cherché à déterminer le rôle de la HTT dans le développement du cerveau.

8.1. Expression de la huntingtine

En premier lieu, on a montré que la HTT est exprimée dans le cerveau en développement chez l'homme et la souris (Bhide *et al.* 1996). Le niveau d'expression de la HTT est constant au cours du développement de l'embryon et jusqu'au 7^{ème} jour post-natal dans le cerveau. A partir de ce stade, le niveau d'expression de la HTT dans le cerveau augmente considérablement jusqu'à la fin du premier mois post-natal, stade auquel il atteint son niveau définitif (Bhide *et al.* 1996).

L'expression de la HTT dans le cortex augmente progressivement entre P7 et P15 pour atteindre à P15 le niveau d'expression adulte. Dans le striatum, cette augmentation se poursuit jusqu'à P30 où le niveau adulte est atteint (Bhide *et al.* 1996).

8.2. Fonctions de la huntingtine dans le développement du cerveau embryonnaire

La huntingtine est nécessaire au développement du cerveau

Les premières études visant à caractériser la fonction de la HTT dans la neurogenèse ont été menées sur le modèle murin Knock In *Hdh^{neoQ50}* homozygote dans lequel la HTT endogène possède 50 glutamines et dont l'expression est à moins de 50% de la HTT non mutée (White *et al.* 1997). En effet, la réduction de l'expression de la HTT dans les embryons homozygotes *Hdh^{neoQ50}*, conduit à une létalité périnatale et à des défauts de développement du cerveau. Par ailleurs, cette équipe a montré que la forme polyQ de la HTT (modèle *Hdh^{Q50}* dont l'expression de la HTT est comparable à l'endogène) est suffisante pour permettre le développement et obtenir des adultes en apparence normaux (White *et al.* 1997). Cette étude démontre néanmoins un rôle crucial de la HTT dans le développement du cerveau.

Le rôle de la HTT dans le développement du cerveau a également été approché par l'analyse de chimères. Des cellules souches embryonnaires, dans lesquelles le gène de la HTT est inactivé, ont été injectées dans des blastocystes sauvages (Reiner *et al.* 2001). L'analyse des cerveaux adultes des souris ainsi générées a permis de mettre en évidence une différence de localisation entre les cellules sauvages et celles nullizygotes pour la HTT. En effet, ces dernières sont absentes du thalamus et du télencéphale (cortex cérébral et ganglions basaux) des souris chimériques adultes, montrant ainsi que l'absence d'expression de la HTT, dans ces régions spécifiques, empêche de générer des neurones viables à l'âge adulte (Reiner *et al.* 2001).

Enfin, l'équipe dirigée par Ioannis Dragatsis a inactivé la HTT dans le lignage cellulaire exprimant *Wnt1* qui contribue à la formation du mésencéphale, du rhombencéphale, des cellules granulaires du cervelet et des structures sécrétoires de l'épendyme (Dietrich *et al.* 2009). Cette absence d'expression de la HTT entraîne une hydrocéphalie congénitale avec un accroissement de la production du liquide céphalo-

rachidien et des anomalies de formation de l'organe sous-commissurale (Dietrich *et al.* 2009).

La huntingtine est nécessaire à la neurulation

Plus récemment, avec l'essor de nouvelles techniques et une meilleure connaissance de la neurogenèse, les fonctions de la HTT au cours de la neurogenèse ont été éclaircies. Dans le modèle du poisson-zèbre, la présence de la HTT, et plus particulièrement sa région N-terminale est nécessaire à la neurulation (Lo Sardo *et al.* 2012). La HTT joue un rôle de régulation de l'adhésion des cellules neuroépithéliales impliquant le clivage de la N-cadhérine, une protéine des jonctions adhérentes, par la métalloprotéase ADAM10. En effet, la HTT inhibe ADAM10 et la déplétion de la HTT augmente l'activité de ADAM10 et le clivage de la N-cadhérine.

La huntingtine et le développement du striatum

L'étude des éminences ganglionnaires (futur striatum) de souris exprimant une forme mutée de HTT (avec 111 glutamines), montre des anomalies de développement (Molero *et al.* 2009). En effet, chez ces souris, les progéniteurs de cette structure retardent leur sortie du cycle cellulaire. Ce phénotype est associé à une augmentation de facteurs impliqués dans la pluripotence comme Sox2. Plus particulièrement, ces défauts développementaux induisent une réduction de la différenciation en neurones épineux moyens.

La huntingtine et la formation du cortex embryonnaire

L'analyse *in vivo* de l'absence ciblée d'expression de la HTT dans les cellules de la glie radiaire a permis une avancée dans la compréhension du rôle de la protéine dans la neurogenèse corticale. Notre équipe a caractérisé une fonction de la HTT dans la régulation de l'orientation du fuseau mitotique dans les cellules en prolifération (Godin *et al.* 2010). Cette fonction est importante pour la régulation des divisions symétriques et asymétriques des progéniteurs apicaux. Ainsi, l'inactivation de la HTT conduit à une augmentation du nombre de divisions horizontales et modifie le devenir cellulaire des cellules issues de ces divisions. Ceci entraîne une augmentation de la production de neurones, réduisant la population de progéniteurs (Godin *et al.* 2010). C'est *via* son rôle de protéine d'échafaudage que la HTT est impliquée dans ce mécanisme. En effet, elle

forme un complexe avec p150^{Glued}, la dynéine et NuMA aux pôles du fuseau de division. L'inactivation du gène de la HTT conduit à la délocalisation de p150^{Glued}. Cette fonction est conservée chez la drosophile.

De plus, une étude récente démontre un rôle pour la HTT dans la survie et de la migration neuronale au cours de la neurogenèse corticale (Tong *et al.* 2011). En effet, la déplétion de la HTT par shRNA aux stades E12,5, E14,5 et E16,5 perturbe la migration des neurones corticaux spécifiquement, les neurones issus du cervelet n'étant pas atteints. L'absence de la HTT dans ces cellules affecte également la survie cellulaire *via* une apoptose dépendante des caspases (Tong *et al.* 2011).

Le rôle de la huntingtine dans les progéniteurs *in vitro*

L'étude des cellules souches et progéniteurs nerveux *in vitro* a permis également d'identifier des altérations de leurs propriétés (Ritch *et al.* 2012). En effet, des progéniteurs nerveux exprimant la HTT avec 140Q ont des défauts de motilité, une diminution de cholestérol et une augmentation des espèces réactives de l'oxygène indiquant une élévation du stress oxydatif (**Table 3**). L'inactivation de la HTT réduit également les propriétés migratoires mais, contrairement à la situation polyQ, elle augmente les niveaux de cholestérol (Ritch *et al.* 2012).

Placées en conditions de différenciation, ces cellules produisent des neurones et des astrocytes. L'expansion polyQ conduit à une production élevée d'astrocytes proliférants (50%) par comparaison à la situation contrôle (10%)(Ritch *et al.* 2012).

Htt Genotype	Source	Cholesterol	ROS	Motility	Differentiation
7Q/7Q	E16 mouse brain	-	-	-	-
140Q/140Q	E16 mouse brain	↓	↑	↓	↑ GFAP ⁺ cells
F7Q/7Q	ES cells	-	-	-	NE
F140Q/7Q	ES cells	-	↑	↓	NE
-/-	ES cells	↑	-	↓	NE

NE, not examined.

Table 3 : Comparaison phénotypique des progéniteurs nerveux en fonction de la présence et de l'absence de la huntingtine sauvage ou mutée (Ritch *et al.* 2012).

Une autre équipe a observé des différences dans la production de neurones à partir de cellules ES et de précurseurs nerveux issus de la zone sous-ventriculaire adulte de souris Knock In avec 150Q (Lorincz and Zawistowski 2009). En effet, l'expansion de polyQ dans cette étude conduit à une augmentation de la production des progéniteurs nerveux et des neurones (Lorincz and Zawistowski 2009). Les résultats sur la capacité de production de neurones sont contradictoires en fonction du modèle étudié et varient selon, entre autres, le nombre de glutamines et le type cellulaire étudié (Lorincz and Zawistowski 2009; Ritch *et al.* 2012).

8.3. Et chez les patients atteints de la maladie de Huntington ?

Les défauts de neurogenèse dans les modèles décrits précédemment sont autant d'éléments indiquant que la HTT joue un rôle fondamental dans ces processus. Cependant, existe-t-il des anomalies de développement chez les patients atteints de la maladie de Huntington ?

Une étude réalisée chez des patients prodromaux, c'est-à-dire qui ne présentent pas les signes cliniques caractéristiques de la maladie (chorée), vient apporter des éléments de réponse (Nopoulos *et al.* 2011). Sur une cohorte de patients prodromaux, le volume intracranial a été déterminé par imagerie par résonance magnétique (IRM). Ce volume correspond à la taille maximale que le cerveau a atteint au cours du développement, et qui, par conséquent, n'est pas influencé par la perte de neurones (Nopoulos *et al.* 2011). Une réduction significative de 4% du volume intracrânien est observée dans le cas de la mutation pathologique chez les hommes, les différences n'étant pas statistiques chez les femmes (**Table 4**).

Variable	Males				Females			
	CAG expanded prodromal Huntington's disease, n = 185 Mean (SD) range	CAG non-expanded n = 58 Mean (SD) range	t	P	CAG expanded prodromal Huntington's disease, n = 352 Mean (SD) range	CAG non-expanded n = 112 Mean (SD) range	t	P
CAG Repeat	42.1 (2.2) 38–52	20.1 (4.0) 16–34	n/a	n/a	42.4 (2.5) 38–61	20 (2.9) 15–29	n/a	n/a
Intracranial volume (cc) unadjusted	1444 (120) 1171–1754	1502 (111) 1253–1794	3.28	0.001	1262 (95) 1056–1610	1277 (98) 1052–1546	1.38	0.17
Intracranial volume (cc) adjusted ^a	1415	1472	3.71	0.0002	1276	1289	1.14	0.25
Age (years)	43.4 (10.5) 21.8–77.8	44.6 (13.4) 19.1–83.7	0.65	0.52	41.9 (10.0) 20.1–69.8	44.3 (10.9) 19.5–68.2	2.11	0.04
Height (cm)	178.8 (7.3) 145–201	179.0 (6.2) 169–193	0.24	0.81	164.3 (6.6) 147–183	164.5 (7.0) 139–179	0.23	0.82

Table 4 : Comparaison du volume intracrânien en fonction du sexe et de l'expansion polyQ de la huntingtine (Nopoulos *et al.* 2011).

Ces données suggèrent ainsi que des problèmes neurodéveloppementaux pourraient être associés à la maladie de Huntington. Ceci pourrait expliquer, d'une part, une prédisposition à la neurodégénérescence des neurones qui ne se manifesterait qu'avec le vieillissement et expliquerait ainsi l'âge tardif d'apparition des symptômes. D'autre part, ceci pourrait expliquer certains symptômes cognitifs et psychiatriques qui se manifestent chez les patients prodromaux. En effet, des anomalies de développement du cerveau entraînent des maladies psychiatriques dont la schizophrénie et la dépression (Nopoulos *et al.* 2011).

Troisième Partie. La Neurogenèse Adulte et Les Troubles de l'Humeur

1. La Neurogenèse adulte

1.1. Historique de la découverte de la neurogenèse adulte

Jusque très récemment le cerveau adulte était considéré comme une structure figée. En particulier, on pensait que les neurones n'étaient produits qu'au cours du développement embryonnaire (Ramon y Cajal 1913; Stahnisch and Nitsch 2002). Chaque individu avait un capital de neurones de départ et leur perte était définitive et irréversible. Ce n'est qu'avec l'apparition d'une nouvelle technique de marquage, la thymidine tritiée, que l'on a pu suivre le devenir des cellules ayant incorporé ce marqueur au cours de la division. Cette approche a permis d'identifier, chez le rat adulte, la formation de nouveaux neurones à la fin des années 70 (Ming and Song 2005).

La neurogenèse se produit dans des régions discrètes du cerveau. Les principales régions de production sont la zone sous-ventriculaire bordant les ventricules latéraux et la zone sous-granulaire du gyrus denté de l'hippocampe (Vukovic *et al.* 2011). Les neurones générés dans la zone sous-ventriculaire sont destinés au bulbe olfactif et empruntent la voie de migration rostrale (rostral migratory stream ou RMS) pour atteindre leur destination. Les neurones produits dans la zone sous-granulaire sont destinés au gyrus denté, et par conséquent, ils n'auront que quelques couches cellulaires à traverser pour atteindre leur position définitive. Je m'attacherai dans la suite de cet exposé à décrire la neurogenèse qui a lieu dans le gyrus denté de l'hippocampe.

1.2. La neurogenèse hippocampique

1.2.1. La structure de l'hippocampe

L'hippocampe est une structure du système limbique. Cette structure est impliquée dans la mémoire, la navigation spatiale et le traitement des émotions. Les neurones de l'hippocampe forment un circuit tri-synaptique. Le cortex entorhinal envoie des axones (fibres perforantes) dans le gyrus denté (**Figure 33**). Ce dernier renvoie ses axones (fibres moussues) à la couche CA3. La couche CA3 contacte ensuite la couche CA1 *via* les collatérales de Schaffer (Duman and Monteggia 2006; Deng *et al.* 2010). Enfin, ces derniers renvoient leurs axones vers le subiculum ou le cortex entorhinal.

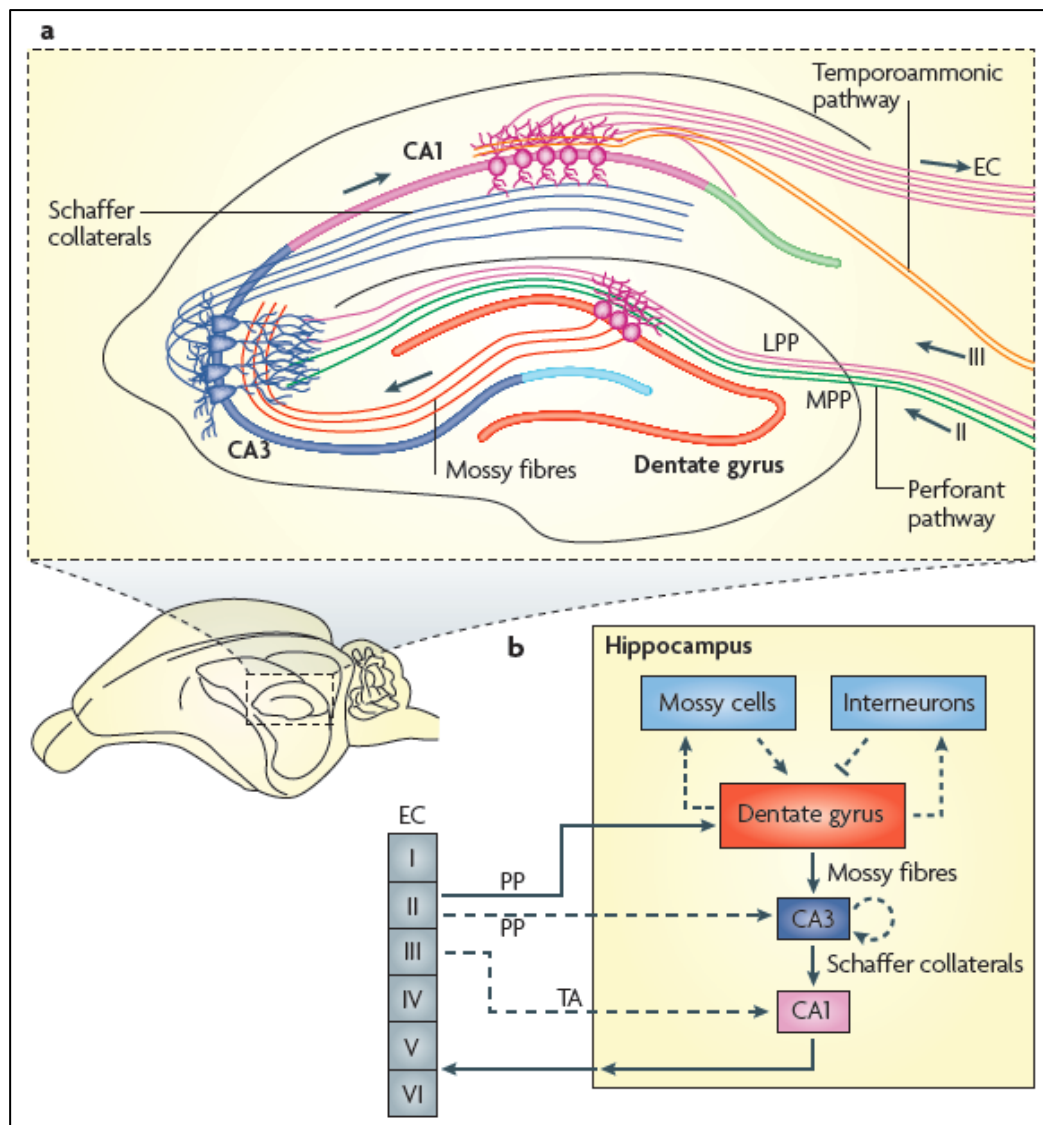


Figure 33 : Schéma des principales connexions au sein de l'hippocampe (Deng et al. 2010). EC=cortex entorhinale ; PP=voie perforante ; LPP= voie perforante latérale ; MPP : voie perforante médiane ; TA : voie temporo-ammonique ; CA : corne d'Ammon.

L'hippocampe ventral est impliqué plus particulièrement dans les comportements en lien avec l'affect (émotions) tandis que l'hippocampe dorsal est plus associé à la mémoire et l'apprentissage (Sahay and Hen 2007). Ceci est la conséquence d'un dimorphisme dorso-ventral en terme de connexions avec les autres structures du cerveau (**Figure 34**).

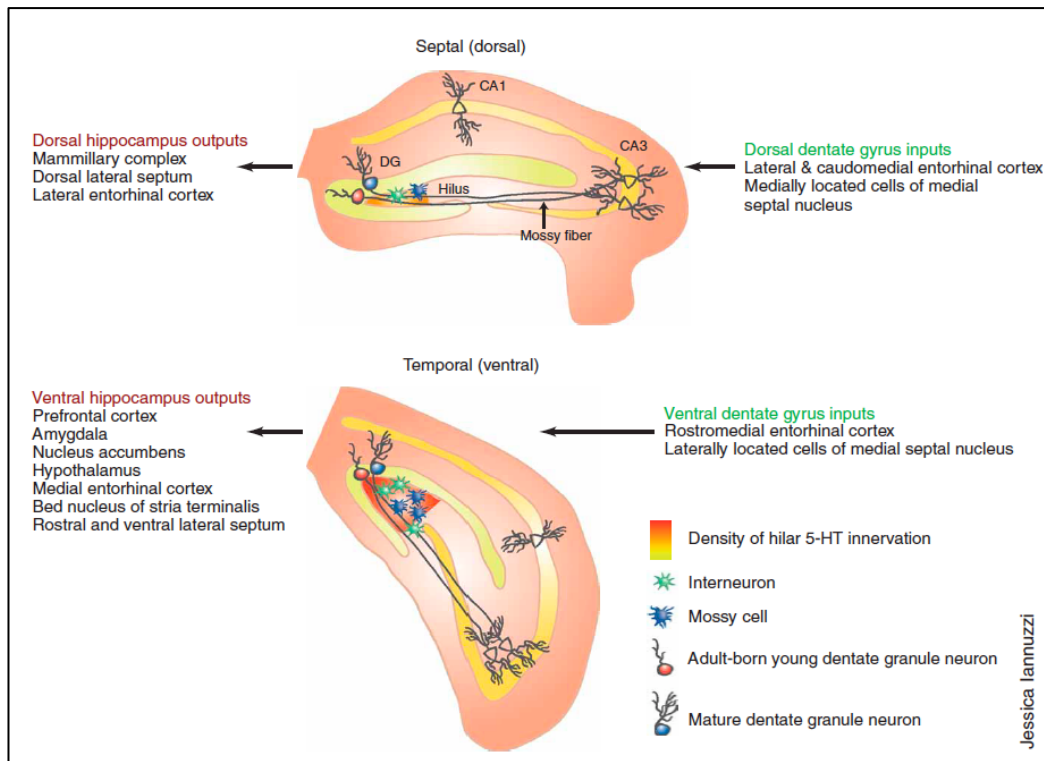


Figure 34 : Fonctions de l'hippocampe ventral et dorsal et connectivité des neurones du gyrus denté (Sahay and Hen 2007).

1.2.2. La neurogenèse dans le gyrus denté

La neurogenèse dans le gyrus denté récapitule la neurogenèse embryonnaire. En effet, les principales étapes sont similaires. Les cellules souches nerveuses, qui dérivent de la glie radiaire embryonnaire, sont localisées dans la zone sous-granulaire du gyrus denté. Les cellules souches sont composées de cellules de type glie radiaire qui sont GFAP (glial fibrillary acidic protein), Sox2 (sex-determining region Y-box 2) et nestine positives (Zhao *et al.* 2008; Bonaguidi *et al.* 2012). Un autre type de cellule souches est composé de cellules non-radiaires Sox2 positives mais qui n'expriment pas la GFAP (Ming and Song 2011). Les cellules souches engendrent des progéniteurs intermédiaires Tbr2 positifs. Ces derniers se différencient par la suite en neuroblastes, qui migrent et mûrissent en neurones (**Figure 35**). Les neuroblastes expriment la doublecortine (DCX), une protéine qui est associée aux microtubules et permet leur stabilité (von Bohlen und Halbach 2011). Cette dernière spécifie le lignage neuronal et son expression est maintenue dans les neurones immatures (Ming and Song 2011). L'expression de DCX diminue ensuite à mesure que le neurone mûrit (**Figure 35**). En parallèle à cette diminution de DCX, les neurones en cours de maturation expriment NeuN (neuronal

nuclear antigen)(von Bohlen und Halbach 2011). Pendant cette phase courte de transition, les neurones expriment ces deux marqueurs. A la fin du processus, les neurones matures n'expriment plus que NeuN.

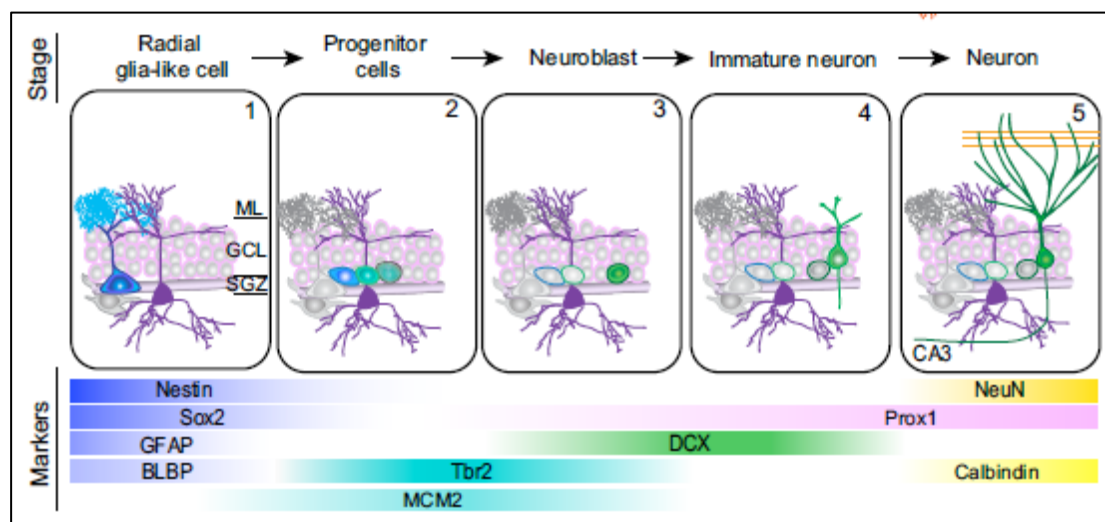


Figure 35 : Etapes de production des neurones à partir des cellules souches de la zone sous-granulaire, illustration adaptée de (Ming and Song 2011). Les marqueurs des différents stades sont indiqués ainsi que le timing d'apparition et de disparition de ceux-ci.

1.2.3. Fonctionnalité des nouveaux neurones

Dans un premier temps, les nouveaux neurones sont activés par le GABA ambiant relargué par les interneurons locaux, puis par les synapses GABAergiques (une semaine après formation) et enfin par les synapses glutamatergiques (2 semaines après formation)(Ming and Song 2005). Les nouveaux neurones de la zone sous-granulaire ne sont capables d'émettre des potentiels d'action qu'après la mise en place des synapses afférentes (Ming and Song 2005). Cette caractéristique permettrait l'intégration des nouveaux neurones, excitateurs, dans le cerveau mature sans perturber les circuits neuronaux préexistants.

Les neurones produits dans le gyrus denté ont une maturation très lente par rapport aux cinétiques au cours du développement embryonnaire (Overstreet-Wadiche *et al.* 2006).

La neurogenèse dans le gyrus denté présente deux périodes critiques pour la survie des cellules. La première se situe à la transition entre progéniteurs

intermédiaires et neuroblastes et la seconde, à l'étape d'intégration du neurone immature (Ming and Song 2011).

Au cours de leur maturation, les nouveaux neurones présentent des caractéristiques originales qui les distinguent des neurones granulaires matures. En effet, ils présentent une hyper-excitabilité qui leur permet d'être recrutés et d'émettre des potentiels d'action à des seuils d'excitation plus faibles que les neurones matures. Par conséquent, les neurones immatures produisent une réponse différente des neurones matures (Overstreet-Wadiche *et al.* 2006). Par ailleurs, ils présentent une plasticité synaptique élevée leur permettant d'établir de nouvelles synapses. Les nouveaux neurones sont également dépolarisés par le GABA en début de maturation puis, lorsqu'ils reçoivent les afférences glutamatergiques, ils sont hyper-polarisés par ce neurotransmetteur, comme c'est le cas pour les cellules granulaires matures (Zhao *et al.* 2008).

1.2.4. Rôle de Cdk5 dans la neurogenèse hippocampique adulte

Comme au cours de la neurogenèse embryonnaire, la kinase Cdk5 exerce des fonctions importantes dans la neurogenèse hippocampique adulte.

Cdk5 n'est pas requis pour la prolifération et la différenciation des progéniteurs nerveux *in vitro* mais cette kinase est importante pour la complexité et le guidage des dendrites (Jessberger *et al.* 2008). L'inhibition spécifique de Cdk5 par une stratégie rétrovirale, conduit à une croissance aberrante des extensions dendritiques et un défaut de migration des nouveaux neurones hippocampaux (Jessberger *et al.* 2008). Bien que la formation et la maturation des épines dendritiques est réduite, des dendrites forment des synapses ectopiques avec les neurones hilaires, indiquant un défaut dans le guidage des dendrites. Avec la même stratégie rétrovirale, la surexpression de Cdk5 n'impacte pas la morphologie des nouveaux neurones quatre semaines après l'injection virale. Les branchements et la longueur des dendrites sont réduits lors de l'inhibition de l'expression de Cdk5 (Jessberger *et al.* 2008). Cependant, la suppression de Cdk5 dans les nouveaux neurones de l'hippocampe n'affecte que modérément leur survie.

Par une approche CRE recombinase conditionnelle où Cdk5 est supprimé des cellules souches et des cellules qui en dérivent dans le gyrus denté, Lagace et collaborateurs (2008) ont montré que la maturation des nouveaux neurones est altérée

ainsi que leur survie. De plus, la suppression de Cdk5 dans les neurones matures du gyrus denté réduit le nombre de neurones immatures, sans que le nombre de cellules en prolifération soit modifié (Lagace *et al.* 2008). Les auteurs concluent que Cdk5 a un rôle majeur dans la survie des nouveaux neurones par des mécanismes intrinsèques et extrinsèques à la cellule.

Les différences observées sur la survie dans les deux modèles peuvent s'expliquer par une réduction plus importante du niveau de Cdk5 dans le système CRE recombinase par rapport à la méthode rétrovirale (Jessberger *et al.* 2009).

Enfin, la suractivation de Cdk5 dans l'hippocampe par la surexpression inducible de son activateur p25, conduit à une augmentation transitoire à deux semaines du nombre d'épines dendritiques et de synapses puis conduit à une diminution du nombre de synapse et une mort neuronale à 6 semaines (Fischer *et al.* 2005).

1.2.5. Modulateurs de la neurogenèse hippocampique

Plusieurs facteurs modulent la neurogenèse adulte. C'est le cas de l'enrichissement de l'environnement, de l'activité physique et neuronale (**Figure 36**) (Ma *et al.* 2009; Deng *et al.* 2010). Les composés pharmaceutiques utilisés pour traiter la dépression stimulent également la neurogenèse. Leurs rôles dans ces processus seront décrits dans la section 2.2.3.

L'environnement enrichi et l'activité physique

L'environnement enrichi (nid, tubes en papier et en plastique, des tunnels et une roue) stimule spécifiquement la survie des neurones conduisant à une augmentation du volume du gyrus denté ainsi qu'une augmentation du nombre de neurones granulaires (Kempermann *et al.* 1997). La résultante de ces changements hippocampiques est une amélioration des performances dans la piscine de Morris. Il semble également que l'activité physique elle-même produit les mêmes effets sur la neurogenèse hippocampique (Ma *et al.* 2009). L'environnement enrichi et l'activité physique augmentent tous les deux l'activité synaptique dans l'hippocampe et modulerait ainsi la neurogenèse (Vukovic *et al.* 2011).

L'activité neuronale

L'activité neuronale au sein du gyrus denté module activement la neurogenèse. En particulier, le GABA libéré par les interneurones, qui hyper-polarise les neurones matures et inhibe ainsi les potentiels d'actions, dépolarise les progéniteurs nerveux et les neurones immatures (Ma *et al.* 2009). Les récepteurs du glutamate (NMDAR), un autre neurotransmetteur, sont importants pour la survie et pour la plasticité synaptique des nouveaux neurones.

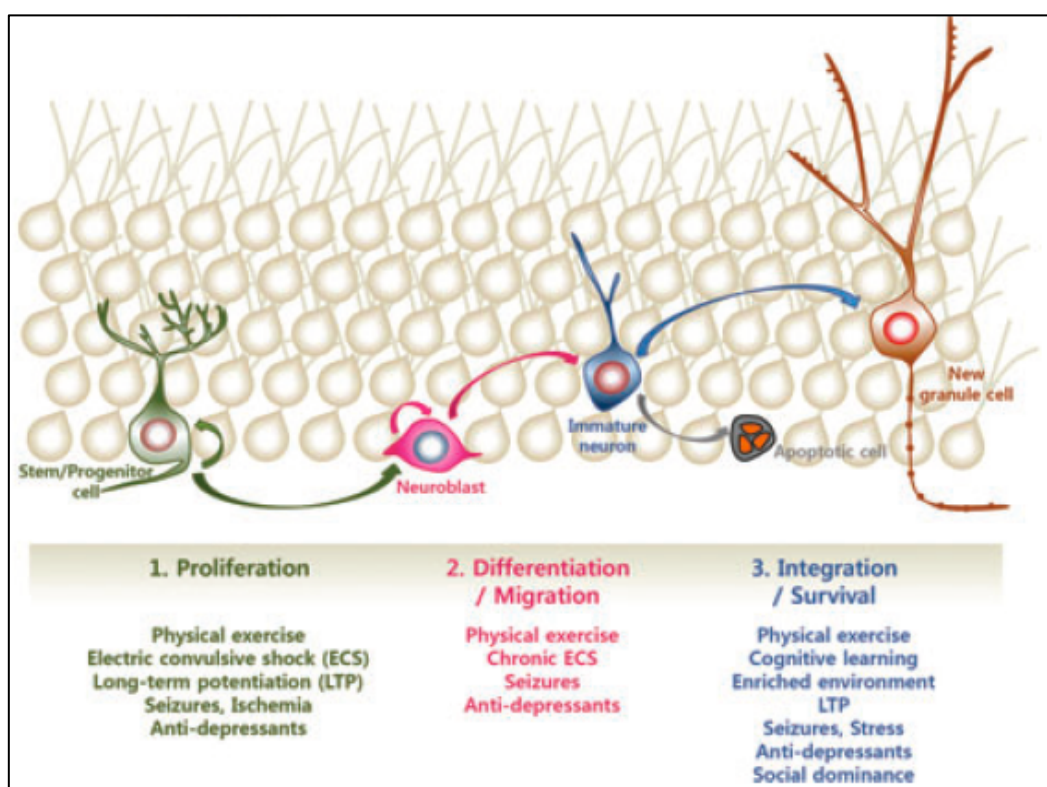


Figure 36 : Modulateurs extrinsèques de la neurogenèse hippocampique (Ma *et al.* 2009).

1.3. La neurogenèse hippocampique adulte et la Maladie de Huntington

1.3.1. La neurogenèse hippocampique dans la maladie de Huntington

Plusieurs modèles murins de la Maladie de Huntington présentent des défauts de neurogenèse hippocampique (**Table 5**)(Gil-Mohapel *et al.* 2011).

Model	Age range	Dentate gyrus			Subventricular zone			References
		Proliferation	Differentiation	Maturation	Proliferation	Differentiation	Maturation	
Full-length transgenic mice YAC 128	3–18 months	26% ↓ BrdU 26% ↓ Ki-67 6% ↓ (n.s.) PCNA	63% ↓ DCX 71% ↓ NeuroD	50% ↓ NeuN/BrdU	No difference in Ki-67 and PCNA	No difference in DCX	N.D.	Simpson et al., 2011
Truncated transgenic mice R6/1	5–25 weeks	64% ↓ BrdU	66% ↓ DCX	76% ↓ NeuN/BrdU	No difference in BrdU	N.D.	N.D.	Lazic et al., 2004 Lazic et al., 2006
	20 weeks	No difference	N.D.	↓ NeuN/BrdU	N.D.	N.D.	N.D.	Grote et al., 2005
R6/2	3.5–12 weeks	66–70% ↓ BrdU 72% ↓ Ki-67 36% ↓ (n.s.) PCNA	63% ↓ DCX	↓ NeuN/BrdU	No difference in PCNA and BrdU	N.D.	N.D.	Gil et al., 2004 Gil et al., 2005
	8 weeks	No difference in BrdU	N.D.	N.D.	Small ↑ BrdU	N.D.	N.D.	Jin et al., 2005
	8–13 weeks	No difference in BrdU	↓ DCX	No difference in NeuN/BrdU	No difference in BrdU	No difference in DCX	N.D.	Phillips et al., 2005
Rat models HD transgenic rats	8–12 months	67% ↓ BrdU 39% ↓ PCNA	↓ DCX	43% ↓ NeuN/BrdU	N.D.	N.D.	N.D.	Kandasamy et al., 2010
Human HD brain HD post-mortem brain tissue	Grades I–III CAGs: 41–52	N.D.	N.D.	N.D.	↑ PCNA	↑ PCNA/βIII-tub ↑ PCNA/GFAP	N.D.	Curtis et al., 2003

Values represent differences detected at the latest time-points. βIII-tub, βIII-tubulin (neuronal marker); BrdU, bromodeoxyuridine; DCX, doublecortin; GFAP, glial fibrillary acidic protein (glial cell marker); N.D., not determined; NeuN, neuronal nuclei; n.s., non-significant trend; and PCNA, proliferating cell nuclear antigen.

Table 5 : Liste des différents modèles de la maladie de Huntington avec les défauts de neurogenèse observés par les études listées (Gil-Mohapel et al. 2011).

Les souris R6/1

Le modèle transgénique R6/1, contenant 112/120 répétitions de CAG et exprimant l'exon 1 à 31% du niveau de la HTT endogène (Mangiarini *et al.* 1996), présente des défauts de prolifération dans l'hippocampe à l'âge de 22 semaines qui ne sont pas améliorés significativement par un enrichissement de l'environnement (Lazic *et al.* 2004). La survie des cellules BrdU positives, après une chasse de 4 semaines, est réduite de 64% sur des souris âgées de 10 semaines (Lazic *et al.* 2006). De même, le nombre de cellules doublecortine positives (neurones immatures) est considérablement réduit. Ces neurones migrent sur des distances plus courtes et présentent des défauts morphologiques : neurites courts, somas petits et irréguliers (Lazic *et al.* 2006).

Les souris R6/2

Le modèle R6/2, avec 139/148 répétitions de CAG et exprimant le transgène à 75% du niveau de la HTT endogène (Mangiarini *et al.* 1996), présente également une réduction marquée de la prolifération qui est détectée dès 2 semaines et atteint 70% aux stades avancés (12 semaines)(Gil *et al.* 2004; Gil *et al.* 2005; Peng *et al.* 2008). Bien que certaines études ne retrouvent pas les défauts de prolifération, elles relèvent tout de même des altérations de la morphologie et du nombre des neurones immatures DCX positifs et des défauts de maturation (Grote *et al.* 2005; Phillips *et al.* 2005). Ce modèle,

dont le phénotype est plus sévère que les R6/1, présente donc des défauts de neurogenèse plus précoces qui s'accroissent avec l'avancée des symptômes.

Les souris YAC128

Une neurogenèse altérée au niveau de la prolifération, de la différenciation et de la maturation est également observée dans les souris YAC128, qui expriment une HTT humaine pleine longueur avec 128 répétitions de CAG (Simpson *et al.* 2011). A 18 mois, la prolifération est réduite de 26%, le nombre de cellules doublecortine positives de 63%. La survie à 4 semaines des nouveaux neurones est également significativement réduite.

1.3.2. Mécanismes induisant l'altération de la neurogenèse

Le rôle de NeuroD

NeuroD est un facteur de transcription à hélice-boucle-hélice, essentiel au développement du gyrus denté (Liu *et al.* 2000). De plus la huntingtin normale stimule l'activité de NeuroD (Marcora *et al.* 2003). En effet, elle interagit avec HAP1 qui est associée à NeuroD. Le complexe HTT/HAP1 facilite l'activation de NeuroD par MLK2 (mixed-lineage kinase 2). Le nombre de cellules NeuroD positives est fortement réduit dans le gyrus denté des souris R6/2 et les YA128 (Fedele *et al.* 2011; Simpson *et al.* 2011). Ces résultats suggèrent un rôle de NeuroD dans l'altération de la neurogenèse hippocampique chez des souris modèles de la MH.

Le BDNF

La HTT normale stimule l'expression et le transport du BDNF (Zuccato *et al.* 2003; Gauthier *et al.* 2004). La mutation polyQ perturbe l'association de la HTT aux moteurs moléculaires et la régulation de l'expression du BDNF. En conséquence, le transport et l'expression du BDNF sont réduits (Zuccato *et al.* 2003; Gauthier *et al.* 2004). Le BDNF étant une neurotrophine qui stimule la neurogenèse, sa dérégulation pourrait donc contribuer aux défauts de neurogenèse de la MH. Ce point sera abordé plus loin dans le manuscrit.

Les récepteurs de la sérotonine

Chez les souris R6/1, l'expression des récepteurs de la sérotonine est fortement réduite. En effet, les récepteurs de la sérotonine 1A, 1B et 2A ont des quantités de mRNA diminuées (Pang *et al.* 2009). Les antidépresseurs SSRI (inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine) augmentent la disponibilité de la sérotonine à la synapse et stimule la neurogenèse (Petrik *et al.* 2012). Ainsi, les défauts d'expression des récepteurs de la sérotonine pourraient contribuer à déréguler la neurogenèse dans ce modèle.

L'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien

L'activation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HPA) conduit à la production de glucocorticoïdes qui induisent une réduction de la neurogenèse hippocampique (Krishnan and Nestler 2008). Les souris R6/2 ont une augmentation progressive du taux de glucocorticoïdes, due à une suractivation de l'axe HPA (Bjorkqvist *et al.* 2006). Ainsi, la dérégulation de l'axe HPA peut être également à l'origine de la réduction de la neurogenèse.

1.3.3. Les patients MH

Les patients HD présymptomatiques et symptomatiques ont un hippocampe réduit (van den Bogaard *et al.* 2011). Une étude récente a conclu à l'absence de défaut de neurogenèse dans l'hippocampe des patients MH. Par l'utilisation du marqueur de prolifération PCNA, cette équipe a montré que la neurogenèse dans le gyrus denté humain est très faible et est similaire entre patients MH et individus contrôles (Low *et al.* 2011). Cette étude n'a d'ailleurs pas retrouvé de cellules DCX positives dans le gyrus denté humain. Cependant, les précurseurs nerveux sont bien présents dans le gyrus denté de l'hippocampe.

2. Les troubles de l'humeur

2.1. Généralités

Dans les sociétés occidentales, les symptômes dépressifs représentent la première cause de maladie mentale. Les troubles dépressifs majeurs concernent 3 à 5% de la population générale sur une année, 15 % au cours de leur vie entière. Ceci

représentent environ 340 millions de personnes dans le monde (AFSSAPS 2006). La prévalence est deux fois plus élevée chez la femme par rapport aux hommes (Farvolden *et al.* 2003).

Le coût estimé de la dépression est de 83,1 milliards de dollars aux Etats-Unis. Ceci inclut les coûts engendrés par les journées de travail perdues et la baisse de productivité consécutive à la maladie (Knoth *et al.* 2010).

Cinq facteurs de risque ont été décrits pour la maladie (Fava and Kendler 2000). Parmi eux, le genre, les événements stressants dans la vie (perte de son travail, maladies, isolement social), les traumatismes de l'enfance (abus sexuels, relations avec les parents) et certains caractères de la personnalité (pessimisme, traits anxieux). Il n'y a pas de facteurs génétiques clairement identifiés. Cependant, l'étude de jumeaux a permis d'estimer la contribution génétique à 40%-50% (Fava and Kendler 2000; Belmaker and Agam 2008; Lee *et al.* 2010). Cette contribution ne serait pas le fait d'un seul gène mais plutôt la combinaison de multiples gènes prédisposant à la dépression (Belmaker and Agam 2008).

2.1.1. Signes cliniques

Il existe différents types de troubles dépressifs. Ceux-ci sont définis par un ensemble de symptômes dont la combinaison justifie le diagnostic (Belmaker and Agam 2008). La caractérisation des différents troubles est codifiée 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 (**Table 6**). De plus, l'épisode dépressif majeur requiert la présence de 5 des symptômes suivants : Humeur dépressive se maintenant toute la journée (signalée par le patient et remarquée par l'entourage) ; Réduction de l'intérêt /plaisir pour toutes les activités ; Modification du poids/appétit (gain/perte) ; Insomnie/hypersomnie ; Agitation/ralentissement psychomoteurs ; Fatigue/perte d'énergie ; Sentiment dévalorisant/culpabilité ; Capacité réduite de concentration/faculté à penser ; Pensées de mort récurrentes.

Lorsque l'épisode dépressif majeur est associé à des troubles obsessionnels/compulsifs, il s'agit d'une autre maladie : le trouble bipolaire (alternances

entre épisodes dépressifs majeurs et épisodes maniaques (type 1) ou hypomaniaques (type 2)).

-
- A. Five (or more) of the following symptoms have been present during the same 2-week period and represent a change from previous functioning; at least one of the symptoms is either i) depressive mood or ii) loss of interest or pleasure
1. Depressed mood most of the day or nearly every day
 2. Markedly diminished interest or pleasure in all activities most of the day or nearly every day
 3. Significant weight loss when not dieting or weight gain (e.g., a change of > 5% of body weight in a month), or decrease or increase of appetite nearly every day
 4. Insomnia or hypersomnia nearly every day
 5. Psychomotor agitation or retardation nearly every day (observable by others, not merely subjective feelings of restlessness or slowing down)
 6. Fatigue or loss of energy nearly every day
 7. Feelings of worthlessness or excessive or inappropriate guilt (which may be delusional) nearly every day
 8. Diminished ability to think or concentrate, or indecisiveness, nearly every day
 9. Recurrent thoughts of death (not just fear of dying), recurrent suicidal ideation without a specific plan, or a suicide attempt or a specific plan for committing suicide
- B. The symptoms cause clinically significant distress or impairment in social, occupational or other important areas of functioning
- C. The symptoms are not due to the direct physiological effects of a substance (e.g., a drug of abuse, a medication) or a general medical condition (e.g., hypothyroidism)
- D. The symptoms are not better accounted for by bereavement (i.e., after the loss of a loved one), the symptoms persist for > 2 months or are characterized by marked functional impairment, morbid preoccupation with worthlessness, suicidal ideation, psychotic symptoms or psychomotor retardation
-

DSM-IV-TR: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders-fourth edition text revision.

Table 6 : Critères définissant un épisode dépressif majeur (Chopra et al. 2011).

Ainsi, le diagnostique est subjectif et basé sur une combinaison de symptômes (Krishnan and Nestler 2008). Deux patients dépressifs peuvent n'avoir qu'un seul symptôme en commun. Le fait d'avoir un épisode maniaque en plus des symptômes modifie le diagnostique et est la caractéristique d'une autre maladie : les troubles bipolaires (Krishnan and Nestler 2008).

2.1.2. Les traitements disponibles

Les médicaments antidépresseurs sont composés de 5 classes : les imipraminiques (tricycliques ou non), les inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (SSRI), les inhibiteurs de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline, les inhibiteurs de la monoamine oxydase et les antidépresseurs atypiques (**Table 7**)(AFSSAPS 2006).

2.1.3. Efficacité des traitements actuels

Environ 8 semaines après un traitement antidépresseur, 33% des patients répondent au traitement (rémission des symptômes), 33% ont une réponse partielle et un dernier tiers ne répond pas au traitement (AFSSAPS 2006). L'amélioration des symptômes survient 1 mois après le début du traitement. Les taux de rechute à 6 et 12 mois pour les patients « répondants » est de 10% (50% pour les placebos) (AFSSAPS 2006). Ainsi, l'efficacité des antidépresseurs est relativement faible (Pigott et al. 2010).

Au final, 50 à 70% des patients ne remplissent pas les critères de rémission après traitement avec au moins un antidépresseur (Knoth *et al.* 2010).

Type of treatment	Mode of action	Examples
Medication*		
Tricyclics	Inhibition of mixed noradrenaline and serotonin reuptake	Imipramine, desipramine
Selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs)	Inhibition of serotonin-selective reuptake	Fluoxetine, citalopram
Noradrenaline reuptake inhibitors (NRIs)	Inhibition of noradrenaline-selective reuptake	Atomoxetine, reboxetine
Serotonin and noradrenaline reuptake inhibitors (SNRIs)	Inhibition of mixed noradrenaline and serotonin reuptake	Venlafaxine, duloxetine
Monoamine oxidase inhibitors (MAOIs)	Inhibition of monoamine oxidase A (MAO _A). Inhibition of MAO _B does not have antidepressant effects	Tranylcypromine, phenelzine
Lithium	Lithium has many molecular actions (for example, inhibition of phosphatidylinositol phosphatases, adenylyl cyclases, glycogen synthase kinase 3 β and G proteins) but which of its actions is responsible for its antimanic and antidepressant effects is unknown	
Atypical antidepressants	Unknown. Although these drugs have purported monoamine-based mechanisms (for example, bupropion inhibits dopamine reuptake, mirtazapine is an α_2 -adrenergic receptor antagonist and tianeptine an activator of monoamine reuptake), these actions are not necessarily the mechanisms that underlie the drugs' therapeutic benefit	Bupropion, mirtazapine, tianeptine
Non-medication		
Electroconvulsive therapy (ECT)	General brain stimulation	
Magnetic stimulation	General brain stimulation? A magnetic field is thought to affect the brain by inducing electric currents and neuronal depolarization	
Vagal nerve stimulation (VNS)	Unknown	
Psychotherapies	Exact mechanism is uncertain, but is thought to involve learning new ways of coping with problems	Cognitive-behavioural therapy, interpersonal therapy
Deep brain stimulation	In severely ill patients, stimulation of a region of the cingulate cortex found to function abnormally in brain imaging scans reportedly has antidepressant effects ³⁴	

*Many patients respond to several types of treatment, although it is not yet possible to predict which patient will respond optimally to a particular treatment. Although they elevate mood in patients with depression, antidepressants do not elevate mood in healthy individuals and are non-addictive.

Table 7 : Traitements antidépresseurs actuels (Berton and Nestler 2006).

Le défaut des traitements antidépresseurs actuels provient essentiellement du fait qu'ils reposent tous sur la même stratégie. En effet, ils visent tous à restaurer un éventuel défaut de neurotransmetteurs monoaminergiques. Les bases de cette stratégie seront décrites dans les prochaines sections, ainsi que quelques unes des autres hypothèses sur l'étiologie de la dépression.

2.2. Les causes physiologiques de la dépression

2.2.1. La théorie de monoamines

L'hypothèse des monoamines suggère qu'une déficience des neurotransmetteurs monoaminergiques (sérotonine, dopamine, norépinephrine) serait à l'origine des troubles dépressifs (**Figure 37**)(Chopra *et al.* 2011). Depuis les années 50, cette hypothèse a prédominé et a été le centre de toutes les recherches pharmacologiques. Les premières preuves sont venues de la découverte presque fortuite que la réserptine, un antihypertenseur qui déplete le pool présynaptique de monoamines, induit des syndromes ressemblant à la dépression (Krishnan and Nestler 2008). Elle a aussi été mise en avant avec la découverte des antidépresseurs tricycliques et des inhibiteurs des monoamines oxydases (Belmaker and Agam 2008)(Lee *et al.* 2010). Cette hypothèse a ensuite été renforcée avec les inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (SSRIs) qui ont été conçus à partir de cette hypothèse.

Cependant l'hypothèse d'un rôle central des monoamines est contredite aujourd'hui par de nombreuses observations. Tout d'abord, la latence entre la prise des antidépresseurs et leur efficacité thérapeutique n'est pas justifiée par cette hypothèse. En effet, les antidépresseurs, en agissant directement sur la disponibilité synaptique des neurotransmetteurs, permettent une augmentation très rapide de ceux-ci (David *et al.* 2003; Krishnan and Nestler 2008). Cela ne coïncide donc pas avec cette latence. De plus, si un défaut de monoamines était à l'origine de la dépression, l'efficacité des antidépresseurs serait élevée. Or, de nombreuses personnes ne répondent pas aux traitements. Enfin, la déplétion des monoamines n'induit pas de dépression chez les individus sains (Heninger *et al.* 1996; Belmaker and Agam 2008). En conclusion, bien que capables de corriger les symptômes chez certains patients, les monoamines ne sont pas directement à l'origine de la dépression.

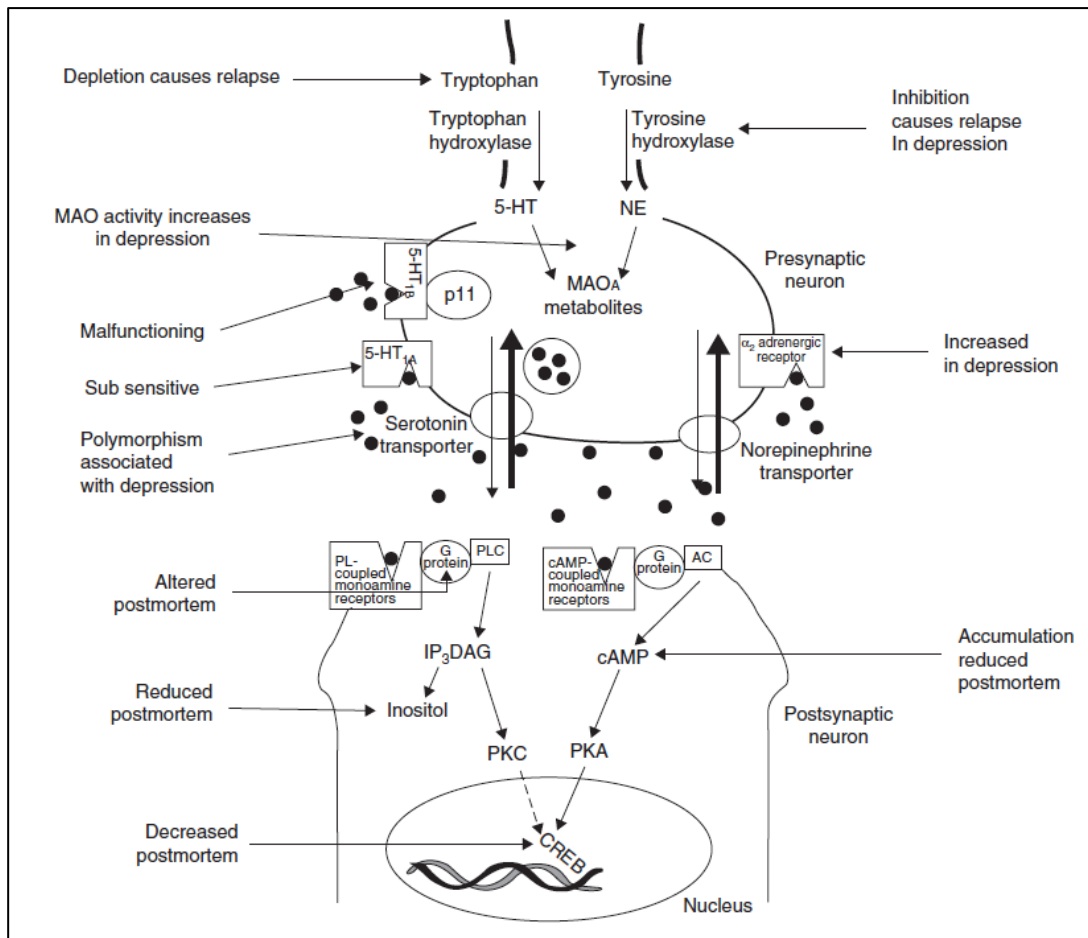


Figure 37: L'hypothèse des monoamines: les différents acteurs et les données expérimentales (Chopra et al. 2011). AC : Adénylate cyclase ; DAG : Diacylglycérol ; IP3 : Inositol triphosphate ; MAO : Monoamine oxydase ; NE : Norépinéphrine ; PKA : Protein kinase A ; PLC : Phospholipase C.

2.2.2. L'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien

L'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HPA) permet la réponse adaptative au stress (Matthews *et al.* 2005). La dysfonction de l'axe HPA est également proposée comme une cause de la dépression. En réponse à un stimulus stressant, l'hypothalamus libère la CRH (corticotropin-releasing hormone). La CRH 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), qui est l'hormone du stress. Le cortisol exerce un rétrocontrôle négatif sur l'axe hypothalamo-hypophysaire (Farvolden *et al.* 2003; Chopra *et al.* 2011). Cela permet la réponse adaptative aigue au stress. Les récepteurs du cortisol sont localisés dans différents organes dont le cerveau (hippocampe, amygdale, cortex préfrontal). Des excès de glucocorticoïdes dû à un stress prolongé peuvent induire de la dépression chez la souris (David *et al.* 2009). Ils réduisent aussi la neurogenèse et l'arborisation

dendritique de hippocampe. La mort des neurones hippocampaux peut également être induite (Farvolden *et al.* 2003; Chopra *et al.* 2011). Les patients déprimés ont des niveaux élevés de cortisol, le rétrocontrôle n'étant plus opérationnel (**Figure 38**)(Belmaker and Agam 2008).

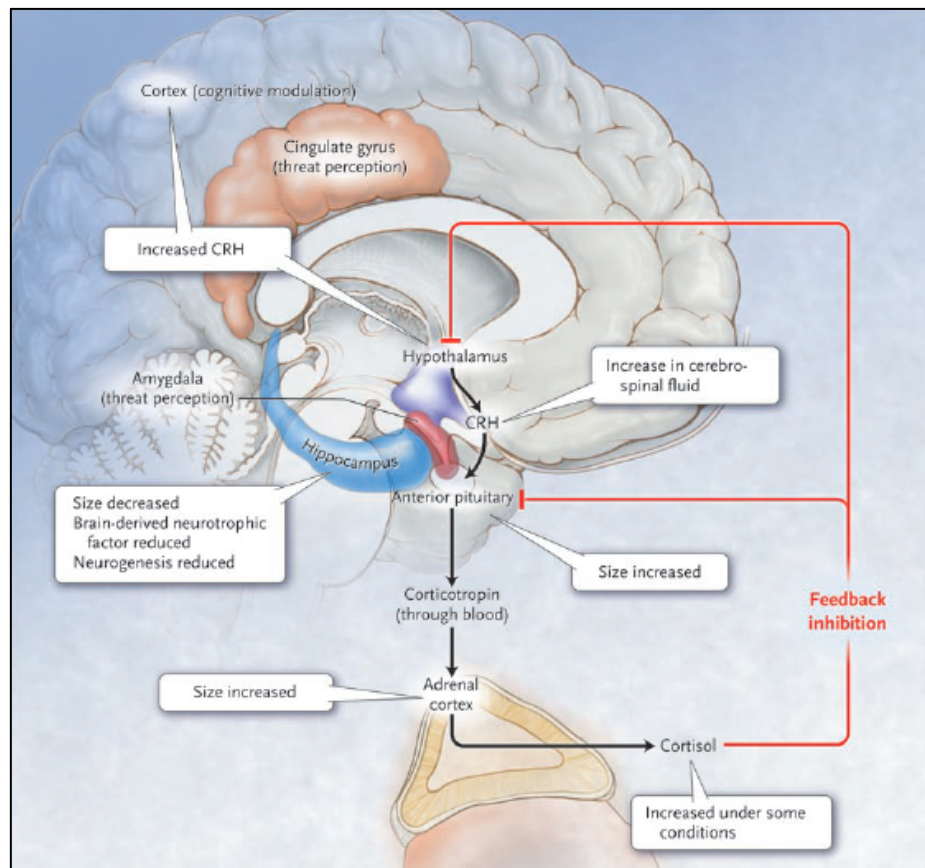


Figure 38 : L'axe HPA dans la dépression (Belmaker and Agam 2008). Les encadrés sur fond blanc indiquent les paramètres modulés dans la dépression.

2.2.3. L'hippocampe et le BDNF

Le volume hippocampique réduit observé chez les patients dépressifs a soulevé l'hypothèse aujourd'hui populaire de défauts de plasticité au sein de l'hippocampe à l'origine de la dépression (Sheline 2003; Krishnan and Nestler 2008).

Le BDNF

L'atrophie et la mort neuronale, liées à la dépression dans l'hippocampe semblent résulter d'un déficit en neurotrophines, dont le BDNF (Farvolden *et al.* 2003; Duman and Monteggia 2006; Castren and Rantamaki 2010). En effet, celui-ci apporte le support trophique nécessaire à la viabilité neuronale, mais en situation de stress, l'expression du

gène du BDNF est réprimée dans l'hippocampe des différents modèles animaux et chez les patients déprimés (Duman and Monteggia 2006; Calabrese *et al.* 2009). De plus, les patients déprimés ont des niveaux de BDNF dans le sérum plus faibles par rapport aux individus sains (Castren and Rantamaki 2010). Le niveau de BDNF est normalisé dans le sérum chez les patients répondant au traitement antidépresseur (Castren and Rantamaki 2010). Chez la souris, l'infusion de BDNF dans le gyrus denté de l'hippocampe produit des effets antidépresseurs (Duman and Monteggia 2006).

Le récepteur du BDNF est TrkB (Tyrosine-related kinase B)(Castren and Rantamaki 2010). Son activation induit les voies de signalisation MAPK (mitogen-activated protein kinase) et PI3K (phosphatidylinositol-3 kinase)/Akt (Duman *et al.* 2000; Coyle and Duman 2003). L'effecteur terminal de ces voies de signalisation est CREB (cAMP response element-binding). Celui-ci, activé par phosphorylation, produit une réponse pro-survie et active les gènes de la neuroplasticité et de la neurogenèse (**Figure 39**). Les gènes régulés par CREB ont une séquence CRE (cAMP response element) dans leurs régions régulatrices (par exemple BDNF ou Bcl2).

Les antidépresseurs pharmacologiques activent TrkB et CREB (Castren and Rantamaki 2010). De plus, la suppression de TrkB, dans les progéniteurs nerveux hippocampaux, perturbe la neurogenèse et altère la réponse aux antidépresseurs (Li *et al.* 2008). Les traitements antidépresseurs chroniques augmentent la voie AMP/CREB (**Figure 39**) et par conséquent le BDNF (Duman and Monteggia 2006; Castren and Rantamaki 2010). Ceci résulte de l'augmentation de la disponibilité des monoamines à la synapse, qui activent leurs récepteurs et la production de cAMP.

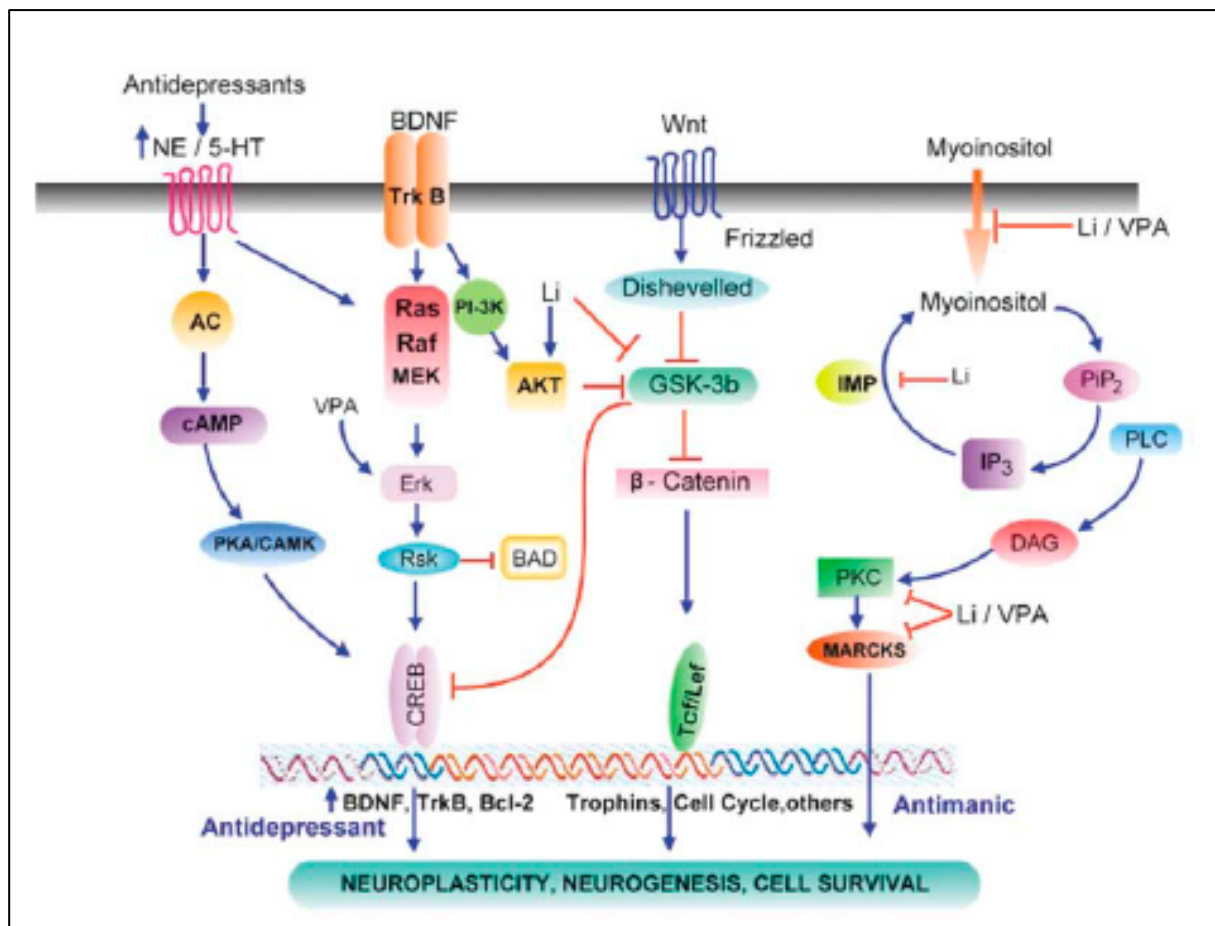


Figure 39 : Voies intracellulaires modulées par les antidépresseurs (Coyle and Duman 2003). Les antidépresseurs augmentent les neurotransmetteurs ciblés (tel que la sérotonine pour les SSRI) et conduisent à l'activation de leurs récepteurs spécifiques. Les voies intracellulaires qui en découlent sont la voie cAMP et la voie MAPkinase/CREB. Les gènes cibles de CREB régulent la neuroplasticité, la neurogenèse et la survie cellulaire. Le lithium active la voie Akt et inhibe la GSK-3β et la PKC.

La neurogenèse hippocampique

Dans les modèles murins de dépression, la neurogenèse hippocampique est altérée, de même que les niveaux de BDNF. L'hippocampe est sensible au stress et à l'activation de l'axe HPA. Cette structure possède des récepteurs aux glucocorticoïdes qui inhibent la neurogenèse (Krishnan and Nestler 2008). Ainsi, les modèles murins de dépression ont une neurogenèse hippocampique et des niveaux de BDNF altérés.

Les traitements antidépresseurs (les SSRI, les MAO inhibiteurs, les tricycliques, et le lithium) stimulent la neurogenèse dans l'hippocampe (Petrik *et al.* 2012). La seule exception est la stimulation magnétique transcraniale qui ne semble pas moduler la neurogenèse chez le rat et le singe (Sapolsky 2004). La suppression de la neurogenèse

hippocampique par irradiation focale supprime certains des effets des antidépresseurs (Santarelli *et al.* 2003; David *et al.* 2009). Cela indique que la neurogenèse est requise pour ces effets. Enfin, le délai de réponse aux antidépresseurs pourrait coïncider avec la période à laquelle les nouveaux neurones commencent à être fonctionnels (Petrik *et al.* 2012).

Cependant, l'inhibition sélective de la neurogenèse hippocampique n'induit pas de dépression (Sapolsky 2004; Petrik *et al.* 2012). Une étude récente a montré que la neurogenèse régule l'axe HPA en réponse au stress (Snyder *et al.* 2011). Lors de l'ablation de la neurogenèse, les glucocorticoïdes mettent plus de temps à retrouver leur niveau de base après induction d'un stress modéré. La régulation négative de l'axe HPA par la neurogenèse produit un effet tampon en situation de stress. De plus, un comportement de type dépressif est obtenu après l'induction d'un stress aigu chez les souris dont la neurogenèse a été abolie (Snyder *et al.* 2011). Ainsi, la neurogenèse ne suffit pas à induire les comportements dépressifs mais joue un rôle régulateur. La perte de cette régulation lors d'un stress prolongé, qui réduit la neurogenèse, peut contribuer à induire la dépression.

2.2.4. Le cortex

Les nouvelles techniques d'imagerie (imagerie par résonance magnétique nucléaire et tomographie) ont mis en évidence des anomalies dans le cortex préfrontal chez les patients dépressifs (Farvolden *et al.* 2003). En effet, le volume cortical est réduit (matière grise et glie)(Krishnan and Nestler 2008). Il semble que cette région est impliquée dans la réduction de la réponse endocrine et autonome au stress. Elle serait également impliquée dans l'inhibition de la réponse au stimulus de conditionnement de la peur (Farvolden *et al.* 2003). Les symptômes cognitifs de la dépression tels que la culpabilité et la dévalorisation seraient modulés par cette structure, en combinaison avec l'hippocampe. Il est difficile de déterminer une relation de causalité entre les défauts corticaux et l'occurrence de la dépression. Cependant, les études d'imagerie montrent clairement que l'activité neuronale dans l'amygdale et le cortex cingulaire sous-génual (Cg25, une région du cortex frontal) est fortement corrélée aux émotions dysphoriques (perturbations de l'humeur)(Krishnan and Nestler 2008). C'est ainsi que la stimulation de la Cg25 (stimulation profonde du cortex ou deep brain stimulation

DBS) permet d'obtenir une rémission chez les patients résistant aux traitements antidépresseurs classiques (Berton and Nestler 2006).

2.3. Modélisation chez la souris

Les modèles animaux de dépression doivent idéalement remplir un certain nombre de critères pour pouvoir être utilisés. En premier lieu, ceux-ci doivent présenter une validité phénoménologique (etiological validity), c'est-à-dire que ces modèles reproduisent l'étiologie de la dépression chez l'homme. C'est un vrai défi puisque les causes ne sont pas clairement identifiées chez l'homme. Les symptômes induits par le stress ressemblent à ceux de la dépression chez l'homme (face validity)(Anisman and Matheson 2005). Certains symptômes dépressifs sont bien sûr difficilement modélisables chez la souris comme les idées de suicide ou le sentiment de culpabilité (Cryan and Mombereau 2004). Ensuite, il faut que le test comportemental passe la barrière de la validé prédictive (predictive validity). En effet, il faut que le paramètre étudié soit modulé par un traitement antidépresseur connu pour être efficace chez l'homme. D'une certaine manière, cela limite la découverte de nouveaux antidépresseurs avec des mécanismes d'action différents.

En pratique, ces critères de validité ne sont pas remplis étant donné que la dépression fait l'objet d'un diagnostic construit et que certains des symptômes font appel à des aptitudes spécifiquement humaines.

Différents modèles comportementaux sont utilisés pour induire des phénotypes de type dépressif chez le rat et la souris. Ils sont basés pour la majorité sur la réponse à des stress aigus ou chroniques inévitables. Dans cette section, je vais décrire quelques uns des modèles animaux de dépression.

La nage forcée (force- swim test)

C'est le test le plus utilisé dans les stratégies de screening de composés antidépresseurs grâce à sa très forte valeur prédictive (Dulawa and Hen 2005). Le rongeur est placé dans un grand b cher d'eau avec des parois suffisamment hautes pour empêcher tout échappatoire. Dans un premier temps, l'animal cherche   escalader et est hyperactif (nage rapide). Puis il s'arrête et s'immobilise sur des temps plus ou moins

longs. L'animal semble abandonner et se résigne face à la situation, mimant une sorte de désespoir dans les symptômes dépressifs. Les antidépresseurs, en administration aigue, réduisent le temps d'immobilité.

La résignation apprise (learned helplessness)

Les animaux sont soumis à une série de chocs électriques inévitables (Krishnan and Nestler 2008). Par la suite, ils deviennent incapables d'apprendre à échapper à d'autres chocs, quand bien même, ils sont prévenus par un signal et peuvent s'enfuir. Les traitements antidépresseurs chroniques restaurent les capacités d'apprentissage. La souris devient défaitiste comme chez les individus déprimés, avec des déficits motivationnels (ne cherche plus à éviter les chocs), cognitifs (signal de danger n'est pas pris en compte) et émotionnels (passivité).

L'hypophagie induite par la nouveauté (novelty-suppressed feeding)

Après une nuit de jeun, le rongeur est placé dans une nouvelle cage très anxiogène (forte lumière). Une croquette au centre d'un cercle blanc fortement éclairé est placée au milieu de cette cage. La souris est en conflit entre deux comportements : aller manger cette nourriture désirable et le caractère anxiogène de s'engager au centre de la cage pour y accéder. Ce test a une très forte valeur prédictive pour les composés antidépresseurs puisque seulement un traitement chronique produit des effets sur ce test (Dulawa and Hen 2005). Ce test est dépendant de la neurogenèse hippocampique (Santarelli *et al.* 2003). En effet, l'ablation de la neurogenèse hippocampique supprime l'effet des antidépresseurs sur ce test.

Le modèle CORT

Un modèle de souris avec un phénotype dépressif a également été développé à partir de l'hypothèse d'une dérégulation de l'axe HPA (David *et al.* 2009). Ce modèle consiste à ajouter dans l'eau de boisson des souris la corticostérone pendant 4 semaines. A l'issu de ce traitement, les souris CORT présentent un phénotype anxio-dépressif révélé par différents tests comportementaux.

2.4. Le cas de la maladie de Huntington

Dans le cadre de la maladie de Huntington, les symptômes dépressifs sont présents très tôt au cours de la maladie (Duff *et al.* 2007; Julien *et al.* 2007). L'origine de ces symptômes n'est pas encore élucidée.

Les comportements de type anxio-dépressif dans les modèles murins de la MH

Les modèles murins de la maladie de Huntington développent des comportements de type dépressif, ce qui supporte l'idée d'une cause génétique à ces symptômes (Pang *et al.* 2009; Pouladi *et al.* 2009; Renoir *et al.* 2011; Orvoen *et al.* 2012). Les modèles transgéniques exprimant l'exon 1 polyQ, tout comme les modèles Knock In développent ces comportements. Les modèles transgéniques R6/1 et R6/2 présentent des troubles anxio-dépressifs liés au sexe (femelles atteintes) (Hickey *et al.* 2005; Pang *et al.* 2009). Les souris Knock In avec 111 glutamines présentent un dimorphisme sexuel par rapport à ces troubles. En effet, les femelles ont un phénotype de type dépressif et les males ont des niveaux d'anxiété élevés (Orvoen *et al.* 2012). Les souris Knock In avec 140Q présentent également ce dimorphisme sexuel (Dorner *et al.* 2007). Par contre, l'expression d'une HTT humaine pleine longueur de 128 glutamines dans le modèle transgénique YAC ne présente pas ce dimorphisme sexuel (Pouladi *et al.* 2009).

Mécanismes induisant les symptômes dépressifs

Parmi les causes possibles de ces symptômes, une dérégulation de l'axe HPA pourrait entrer en jeu (Bjorkqvist *et al.* 2006; Petersen and Bjorkqvist 2006). En effet, les souris R6/2 ont des taux élevés de glucocorticoïdes.

Les modèles MH étudiés pour leurs symptômes dépressifs présentent des défauts de neurogenèse hippocampique (dont de prolifération et d'arborisation dendritique) corrélés à ces comportements de type dépressif (Gil *et al.* 2004; Lazic *et al.* 2004; Gil *et al.* 2005; Grote *et al.* 2005; Phillips *et al.* 2005; Lazic *et al.* 2006; Peng *et al.* 2008; Gil-Mohapel *et al.* 2011; Simpson *et al.* 2011; Orvoen *et al.* 2012). La neurogenèse peut donc être impliquée dans ses symptômes.

La HTT est clivée par la caspase 6 en position 586. Le blocage génétique de ce clivage dans les souris YAC128 C6R retarde les symptômes dépressifs. Ceci indique que

le clivage de la HTT semble être une étape requise au développement des comportements dépressifs dans les souris YAC128 (Pouladi et al. 2009).

Enfin, l'expression de certains récepteurs de la sérotonine (1A, 1B et 2A) est réduite dans l'hippocampe des souris R6/1 (Pang et al. 2009).

La réponse aux antidépresseurs

La sertaline et la fluoxétine (des antidépresseurs de type SSRI) mais pas la désipramine (tricyclique) améliorent les troubles dépressifs des souris R6/1 (Pang et al. 2009; Grote *et al.* 2005). Cependant, les troubles dépressifs des souris YAC128 ne sont pas supprimés avec des traitements antidépresseurs (un SSRI : fluoxétine et un tricyclique : imipramide) (Pouladi et al. 2009). Le lithium et le valproate, en traitement combiné, améliorent le phénotype dépressif des YAC128 (Chiu *et al.* 2011).

7. Problématique

Le laboratoire a identifié deux sites de phosphorylation par Cdk5 sur la HTT (Anne *et al.* 2007). Ces sites sont localisés sur les sérines en position 1181 et 1201. Initialement, l'étude des fonctions de ces phosphorylations a été réalisée *in vitro* sur des cultures de neurones de rats transfectés avec des fragments N-terminaux de la HTT composés des acides aminés 1-1301 (N-ter 1-1301) où les sérines 1181 et 1201 sont mutées en acide aspartique (HTT-DD) ou en alanine (HTT-AA). L'alanine est un acide aminé non phosphorylable, l'acide aspartique mime une phosphorylation constitutive. Ceci a permis de mettre en évidence l'effet neuroprotecteur de la phosphorylation sur ces sites dans une situation de mort neuronale induite par les dommages à l'ADN. Par ailleurs, la HTT polyQ dont les sérines sont substituées par des acides aspartiques est moins toxique que la HTT polyQ dont les sérines sont intactes. A l'inverse, l'expression d'un fragment HTT-AA induit une toxicité neuronale et accroît la toxicité induite par le stress oxydatif (Anne *et al.* 2007).

A la suite de ces résultats, un modèle murin a été généré afin d'étudier les fonctions de ces phosphorylations *in vivo*. Les sérines en position 1181 et 1201 de la HTT endogène ont été substituées soit par des alanines (*Hdh*^{S1181A/S1201A}), soit par des acides aspartiques (*Hdh*^{S1181D/S1201D}). Les souris homozygotes pour ces mutations expriment une HTT sous le contrôle de son promoteur endogène, soit non phosphorylable sur les sérines 1181 et 1201 ou avec des substitutions mimant une phosphorylation sur ces sites. En analysant ces souris, j'ai montré que les souris *Hdh*^{S1181A/S1201A} ont un comportement anxio-dépressif réduit par rapport aux souris sauvages et *Hdh*^{S1181D/S1201D}. J'ai caractérisé les mécanismes moléculaires impliqués.

J'ai ensuite déterminé si le comportement anxiolytique/antidépresseur observé dans les souris *Hdh*^{S1181A/S1201A} était suffisant pour promouvoir un effet anxiolytique/antidépresseur dans un modèle murin de la MH, dans lequel ce comportement est affecté. Pour ce faire, j'ai croisé des souris modèles de la MH (la lignée R6/1) avec des souris *Hdh*^{S1181A/S1201A} et *Hdh*^{S1181D/S1201D} afin d'obtenir des lignées exprimant l'exon 1 polyQ et la HTT endogène avec des mutations sur les sites S1181 et S1201.

Enfin, la dernière partie de mon travail de thèse concerne l'étude du développement embryonnaire des souris *Hdh*^{S1181A/S1201A} et *Hdh*^{S1181D/S1201D}. En effet, la HTT est exprimée au cours du développement embryonnaire du cortex. Elle régule l'orientation du fuseau de division des progéniteurs corticaux *via* son interaction avec le complexe p150^{Glued}/dynéine (Godin *et al.* 2010). Par ailleurs, Cdk5, la kinase qui phosphoryle la HTT sur ces deux sites, est indispensable au développement cortical. Son inactivation conduit à des défauts sévères de formation du cortex embryonnaire (Dhavan and Tsai 2001). Ainsi, j'ai déterminé l'influence des phosphorylations sur le développement cortical, en me concentrant sur les fonctions connues de la HTT et de la kinase Cdk5 dans ces processus. J'ai évalué le rôle de la HTT au cours de la division des progéniteurs. J'ai également étudié l'influence de l'état de phosphorylation de la HTT sur les processus migratoires, mécanismes connus pour être modulés par Cdk5.

Chapitre 2 - Résultats

1. Modèle d'étude

Afin d'étudier l'impact physiologique des phosphorylations en position 1181 et 1201, des souris Knock In ont été générées. Les sérines ont été substituées soit par des alanines (modèle murin *Hdh*^{S1181A/S1201A}) soit par des acides aspartiques (modèle murin *Hdh*^{S1181D/S1201D}) (**Figure 40**). En exprimant de façon exogène Cdk5 ou en inhibant Cdk5 par interférence ARN ou par un composé chimique, nous avons montré que les mutations alanines sur la HTT miment effectivement des sérines non phosphorylables tandis que les mutations acides aspartiques sont phospho-mimétiques (Anne *et al.* 2007).

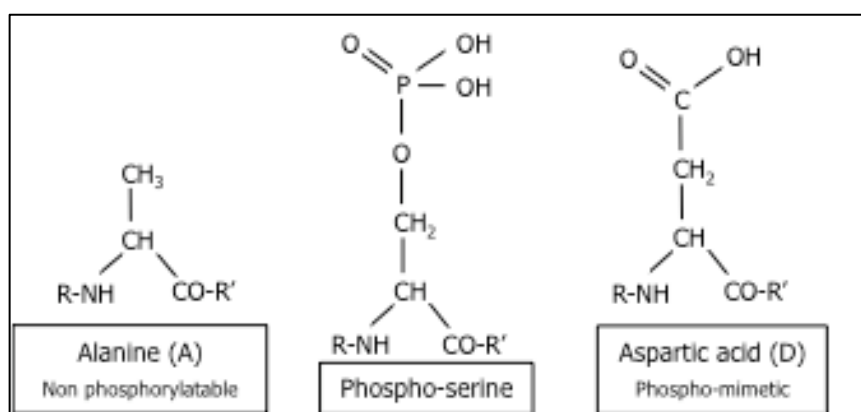


Figure 40 : Représentation schématique d'une alanine, d'une sérine phosphorylée et d'un acide aspartique.

Les souris générées sont viables et ne présentent aucune malformation majeure. Après sevrage de portées obtenues suite à des croisements hétérozygotes, on obtient une distribution mendélienne des génotypes de type 2-1-1 (hétérozygote-sauvage-homozygote), ce qui indique l'absence de létalité embryonnaire ou périnatale. A l'âge adulte, les souris *Hdh*^{S1181A/S1201A} et *Hdh*^{S1181D/S1201D} ne présentent pas de phénotypes moteurs.

2. La huntingtine régule les comportements de type anxio-dépressif en modulant le transport du BDNF et la neurogenèse

2.1. Introduction

Les troubles dépressifs représentent un problème de santé publique majeur dans le monde et en particulier dans les pays développés. Ils représentent la maladie mentale la plus fréquente (Berton and Nestler 2006; Krishnan and Nestler 2008). Les troubles dépressifs présentent une comorbidité importante avec des troubles anxieux et des maladies neurodégénératives (Teri and Wagner 1992; van Duijn *et al.* 2007). La prévalence des troubles dépressifs dans la MH est comprise entre 30 et 70% en fonction des études (van Duijn *et al.* 2007). Ces troubles apparaissent très tôt au cours de la pathologie et précèdent les symptômes moteurs de 10 ans ou plus (Duff *et al.* 2007; Halpin 2011). Cependant, l'étiologie de ces symptômes reste méconnue.

Au cours de la caractérisation de notre modèle murin, nous avons donc évalué le statut anxio-dépressif des souris *Hdh*^{S1181A/S1201A} et *Hdh*^{S1181D/S1201D}. Nous avons mis en évidence une réduction de l'anxiété et de la dépression dans les souris *Hdh*^{S1181A/S1201A}. Nous avons montré qu'une partie des phénotypes observés est directement liée à des anomalies de la neurogenèse adulte hippocampique et du transport axonal du BDNF dans cette structure.

2.2. Article

Ces résultats font l'objet d'un manuscrit en cours de révision à Neuron.

Huntingtin Mediates Anxiety/Depression-related Behaviors through BDNF Transport and 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 Mouthon⁶, François D. Boussin⁶, Alain Gardier⁴, Frédéric Saudou^{1,2,3}, Denis J. David⁴, 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 gamma-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, wildtype 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**). Wildtype, *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/1201D} 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/1201D} 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/1201D} 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/1201D} 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/1201D} 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/1201D}* 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/1201D}* animals. Thus, to further examine this latest effect, we performed a Sholl analysis to study dendritic arborization of DCXpositive 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 60-140µm from the soma (left graph) and dendritic length (right graph) were both higher in *Hdh^{S1181A/S1201A}* than wild-type and *Hdh^{S1181D/1201D}* 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 gamma-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 nonirradiated *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/1201D}* mice. We used immunoblotting to discriminate

between pro-BDNF and mature BDNF in hippocampal extracts of wild-type, *Hdh^{S1181A/S1201A}* and *Hdh^{S1181D/1201D}* 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/1201D}* 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/1201D} mice were electroporated with BDNF-mCherry and the dynamics of BDNFmCherry- 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 wildtype and *Hdh*^{S1181D/1201D} 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 gamma-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 β -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 nondiagnosed 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. 18 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 + 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 were 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 intra-peritoneal 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% H₂O₂ in 0.1M TBS. Slices were then permeabilized with 0.1% trypsin in 0.1M Tris HCl with 0.1% CaCl₂, 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: antihuntingtin (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; 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 (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/>). 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 CaCl_2 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% NaN_3 , 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 μ M 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- α -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*.

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.*

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.

Humbert, S., Bryson, E.A., Cordelieres, F.P., Connors, N.C., Datta, S.R., Finkbeiner, S., Greenberg, M.E., and Saudou, F. (2002). The IGF-1/Akt pathway is neuroprotective in Huntington's disease and involves Huntingtin phosphorylation by Akt. *Dev Cell* 2, 831-837.

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*.

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 extracts were 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 ± S.E.M.; NS, not significant; **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 number of neurons with quinary dendrite and the maturation index. The maturation index is a normalisation of the number of neuron 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 gamma-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 gamma-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 + 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*^{S1181A/S1201A} 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 + 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/S1201D}* mice electroporated with BDNF-mCherry (vesicles number: wild-type n=46; *Hdh^{S1181A/S1201A}* n=59; *Hdh^{S1181D/S1201D}* 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/S1201D}* mice electroporated with BDNF. Release is expressed as a K2/L ratio.

All graphs: Values plotted are mean + 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.

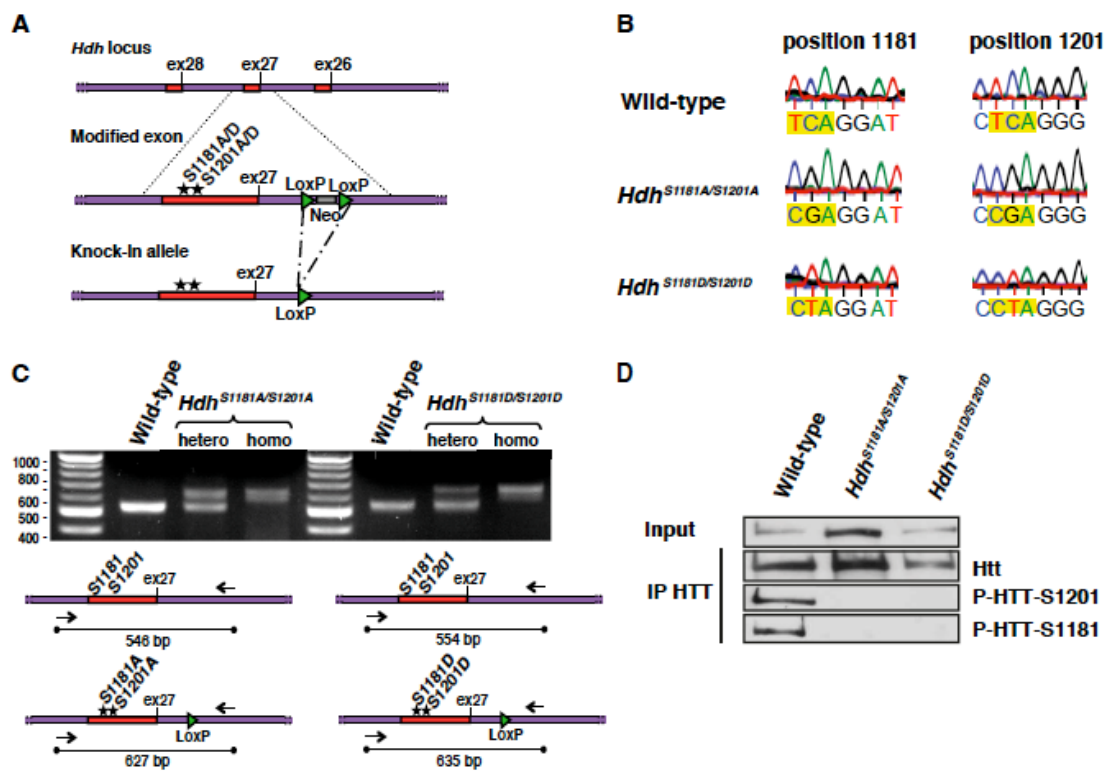


Figure 1

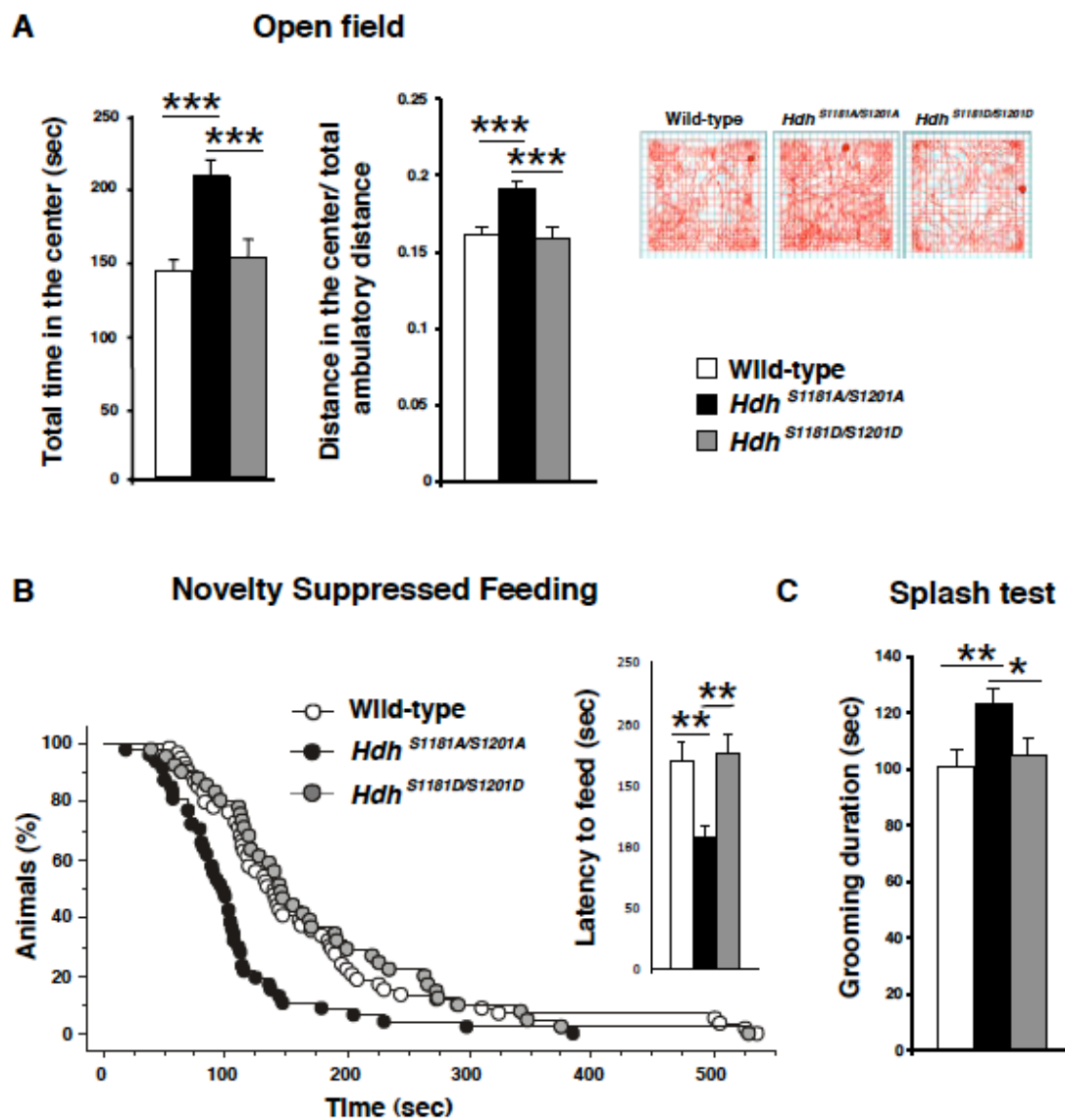


Figure 2

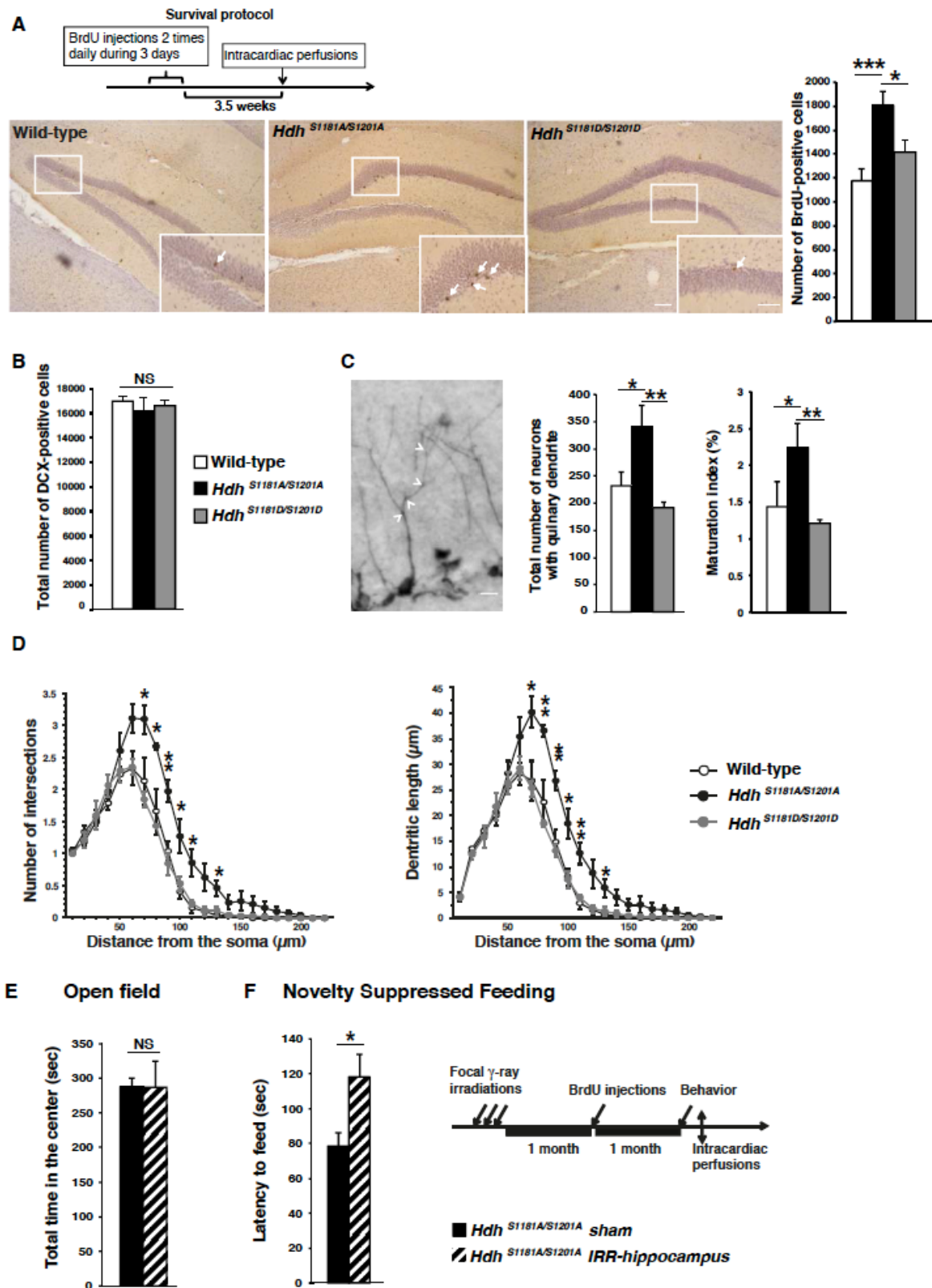


Figure 3

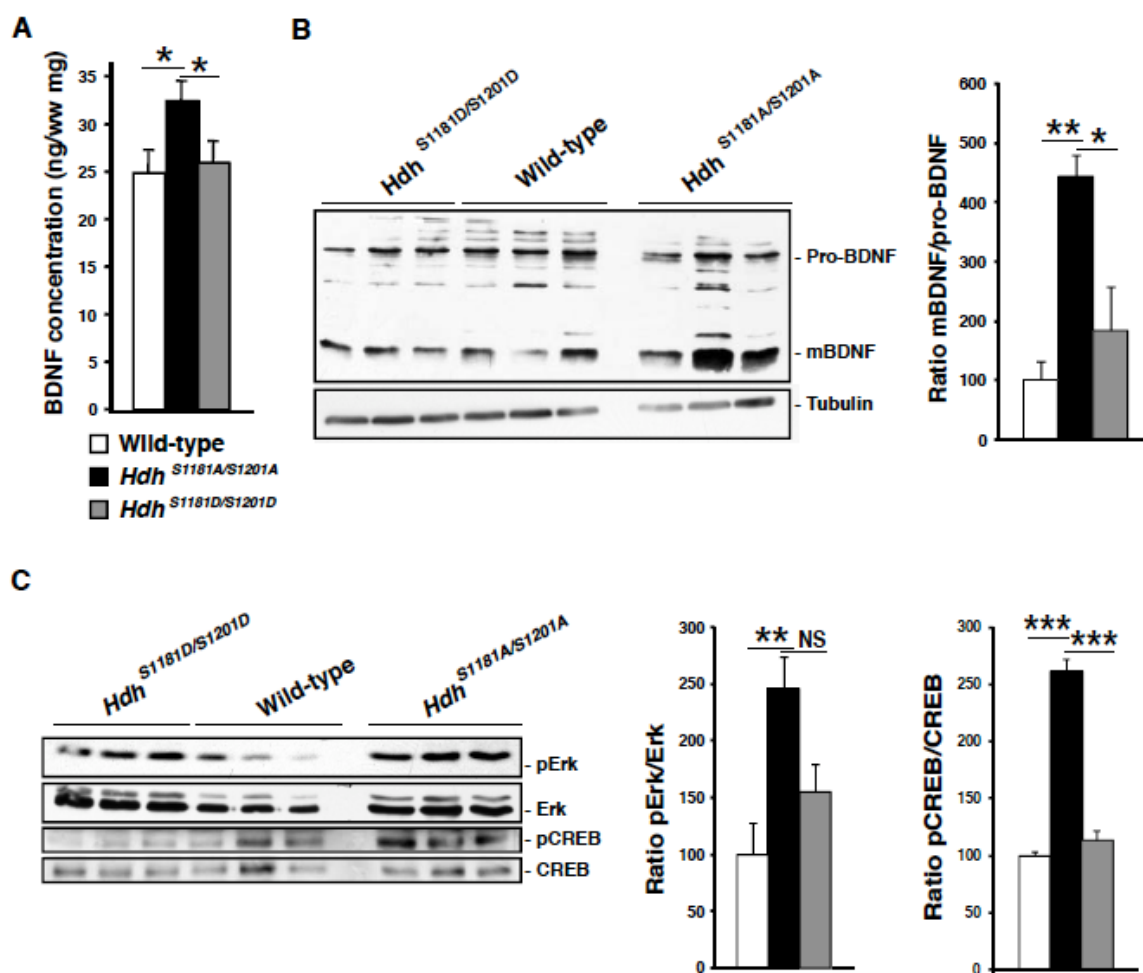


Figure 4

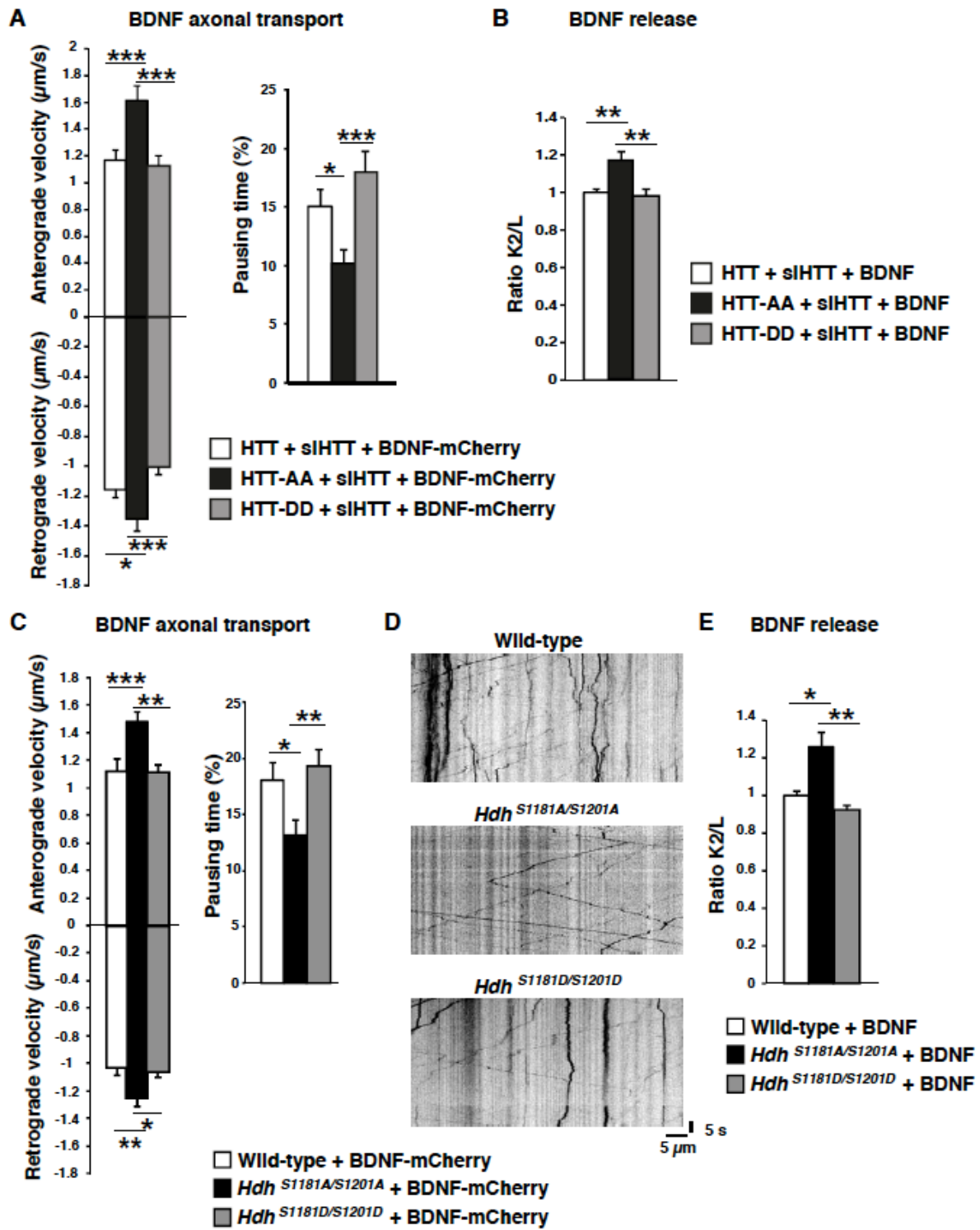


Figure 5

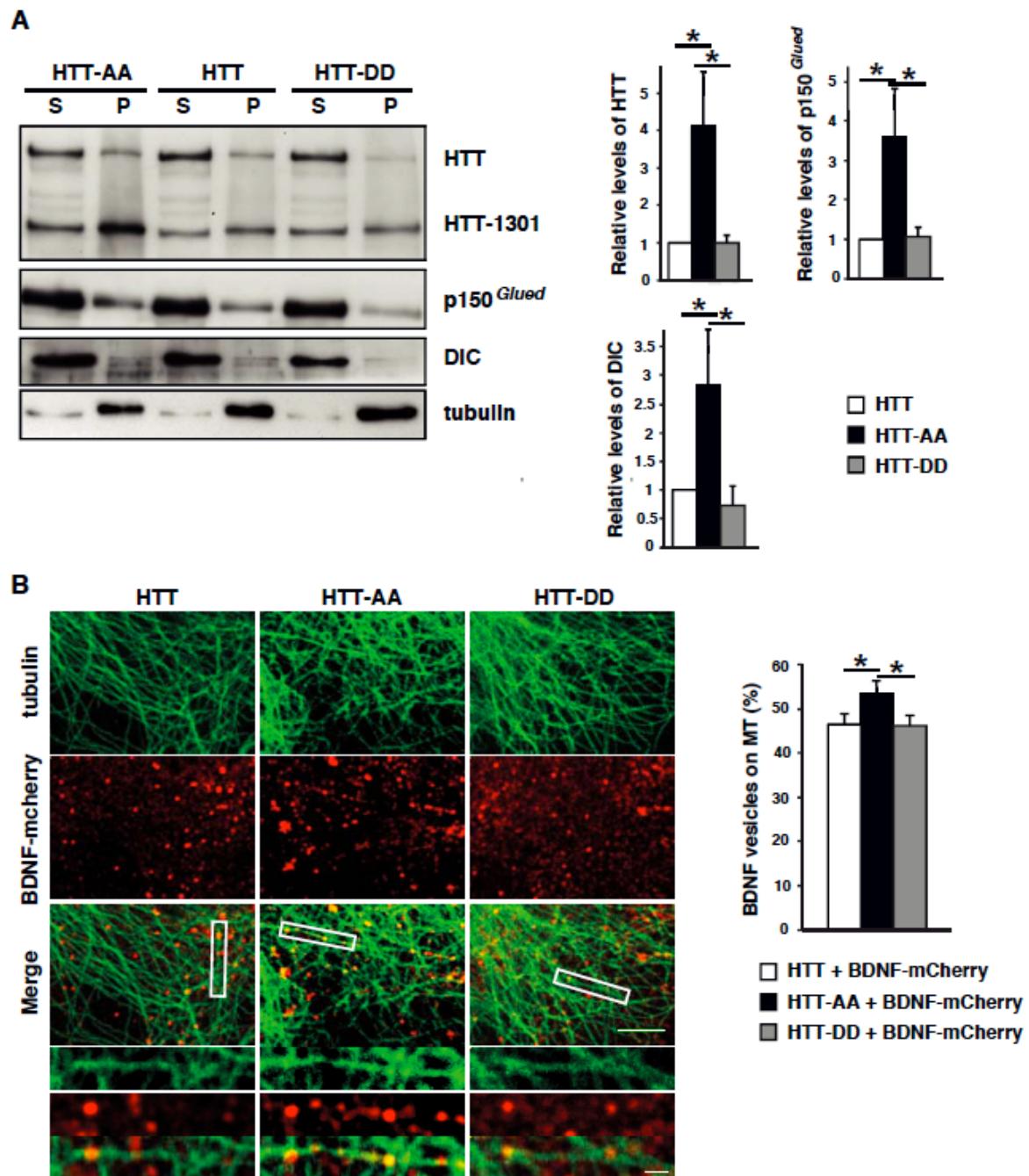
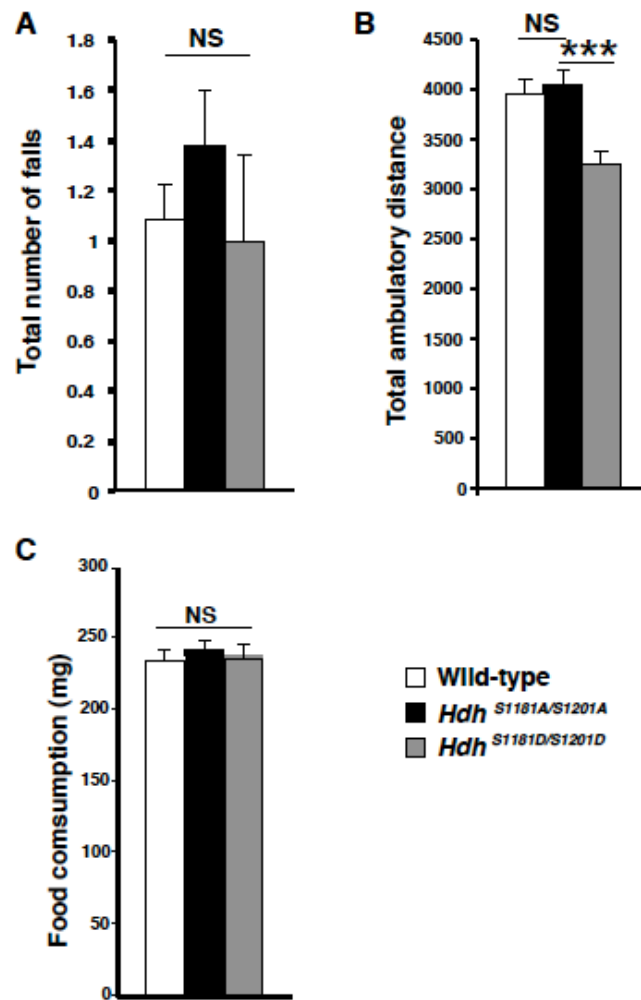


Figure 6

SUPPLEMENTAL INFORMATION



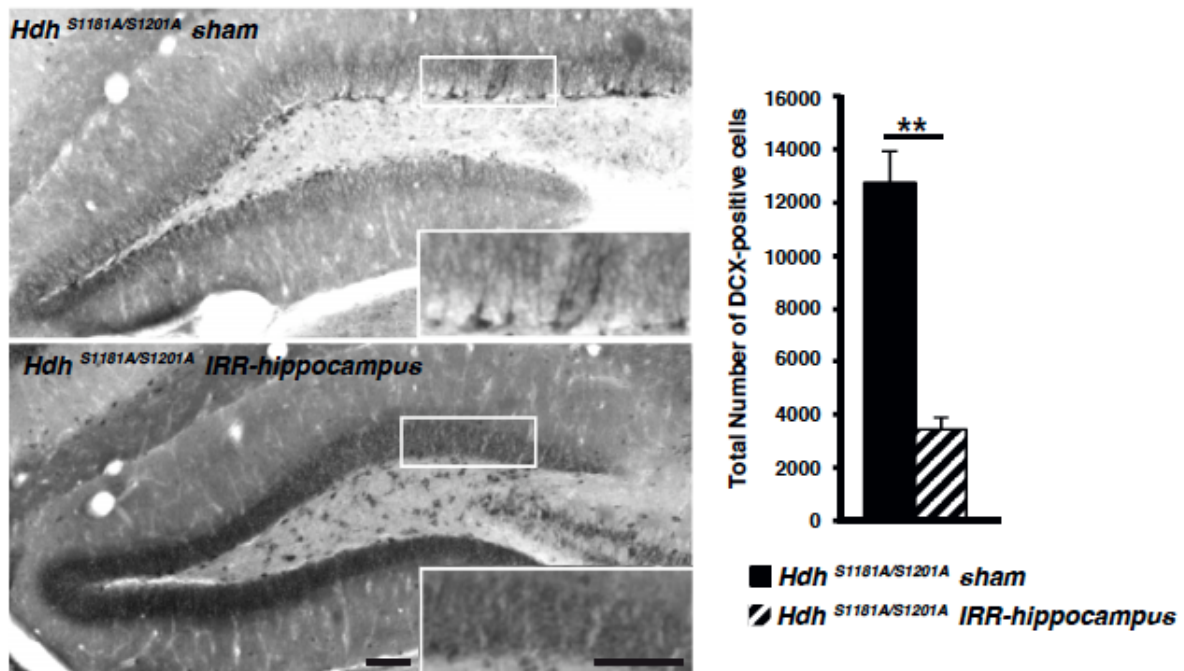
Supplemental Figure S1, related to Figure 2. *Hdh*^{S1181A/S1201A} and *Hdh*^{S1181A/S1201A} mice do not show motor phenotype in a non-accelerating rotarod.

(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 + S.E.M.; NS, not significant; ***P<0.001.



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

Representative DCX stainings of hippocampal sections from sham and irradiated *Hdh*^{S1181A/S1201A} mice. Scale bar: 50 μm. 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 + S.E.M.; **P<0.01.

SUPPLEMENTAL MOVIES RELATED TO FIGURE 5

Supplemental movie 1

BDNF-mCherry vesicles dynamics along axons in microchambers. Cortical neurons were prepared from wild-type mice.

Supplemental movie 2

BDNF-mCherry vesicles dynamics along axons in microchambers. Cortical neurons were prepared from *Hdh*^{S1181A/S1201A} mice.

Supplemental movie 3

BDNF-mCherry vesicles dynamics along axons in microchambers. Cortical neurons were prepared from *Hdh*^{S1181D/S1201D} mice.

STATISTICAL ANALYSES

Figure 2A

number of individuals WT=59; AA=47; DD=43

Total time in the center

ANOVA $F[2,146]=12.505$; $p^{***}<0.0001$

Fisher's PLSD:

	p-value
WT, AA	<0.0001
AA, DD	<0.001
WT, DD	0.4976

Distance centre / total ambulatory distance

ANOVA $F[2,146]=10.609$; $p^{***}<0.0001$

Fisher's PLSD:

	p-value
WT, AA	0.0001
AA, DD	<0.0001
WT, DD	0.6841

Figure 2B

number of individuals WT=59; AA=47; DD=41

Latency to feed

ANOVA $F[2,144]=7.448$; $p^{**}<0.001$

Fisher's PLSD:

	p-value
WT, AA	0.0010
AA, DD	0.0010
WT, DD	0.7615

Figure 2C

number of individuals WT=58; AA=47; DD=42

Grooming duration

ANOVA $F[2,144]=4.491$; $p^*<0.05$

Fisher's PLSD:

	p-value
WT, AA	0.0045
AA, DD	0.0324
WT, DD	0.5941

Figure 3A

Number of BrdU-positive cells

number of individuals WT=8; AA=6; DD=6

ANOVA $F[2,17]=7.700$; $p^{**}<0.01$

Fisher's PLSD:

	p-value
WT, AA	0.0012

AA, DD 0.1081

WT, DD 0.0525

Figure 3B

Number of DCX-positive neurons

number of individuals WT=4; AA=4; DD=4

ANOVA $F[2,9]=0.297$; $p=0.7498$

Figure 3C

Neurons with quinary dendrites

number of individuals WT=3; AA=4; DD=4

ANOVA $F[2,8]=8.848$; $p^{**}<0.01$

Fisher's PLSD:

	p-value
WT, AA	0.0241
AA, DD	0.0035
WT, DD	0.3425

Maturation index: neurons with quinary dendrites/ total DCX-positive neurons

number of individuals WT=3; AA=4; DD=4

ANOVA $F[2,8]=6.211$; $p^{*}<0.05$

Fisher's PLSD:

	p-value
WT, AA	0.0414
AA, DD	0.0095
WT, DD	0.4972

Figure 3D

WT=3; AA=3; DD=3

Number of intersections

Distance from soma:

10 μ m: ANOVA $F[2,6]=2.663$; $p=0.1487$

20 μ m: ANOVA $F[2,6]=0.672$; $p=0.5453$

30 μ m: ANOVA $F[2,6]=0.118$; $p=0.8905$

40 μ m: ANOVA $F[2,6]=1.138$; $p=0.3809$

50 μ m: ANOVA $F[2,6]=0.967$; $p=0.4325$

60 μ m: ANOVA $F[2,6]=4.228$; $p=0.0715$

70 μ m: ANOVA $F[2,6]=6.485$; $p=0.0316$

Fisher's PLSD:

	p-value
WT, AA	0.0383
AA, DD	0.0138
WT, DD	0.4571

80 μ m: ANOVA $F[2,6]=10.193$; $p=0.0118$

Fisher's PLSD:

	p-value
WT, AA	0.0133

AA, DD 0.0055
 WT, DD 0.4702
 90µm: ANOVA F[2,6]=13.231; p=0.0063

Fisher's PLSD:

	p-value
WT, AA	0.0073
AA, DD	0.0030
WT, DD	0.4356

100µm: ANOVA F[2,6]=7.158; p=0.0258

Fisher's PLSD:

	p-value
WT, AA	0.0128
AA, DD	0.0243
WT, DD	0.6284

110µm: ANOVA F[2,6]=7.966; p=0.0205

Fisher's PLSD:

	p-value
WT, AA	0.0110
AA, DD	0.0174
WT, DD	0.7194

120µm: ANOVA F[2,6]=4.958; p=0.0536

130µm: ANOVA F[2,6]=6.625; p=0.0303

Fisher's PLSD:

	p-value
WT, AA	0.0145
AA, DD	0.0300
WT, DD	0.5894

140µm: ANOVA F[2,6]=2.946; p=0.1284

150µm: ANOVA F[2,6]=2.315; p=0.1798

160µm: ANOVA F[2,6]=2.321; p=0.1792

170µm: ANOVA F[2,6]=2.244; p=0.1873

180µm: ANOVA F[2,6]=1.555; p=0.2858

190µm: ANOVA F[2,6]=1.861; p=0.2351

200µm: ANOVA F[2,6]=3.000; p=0.1250

Dendritic length

Distance from soma:

10µm: ANOVA F[2,6]=0.027; p=0.9735

20µm: ANOVA F[2,6]=0.679; p=0.5423

30µm: ANOVA F[2,6]=0.133; p=0.8781

40µm: ANOVA F[2,6]=0.225; p=0.8050

50µm: ANOVA F[2,6]=0.529; p=0.6143

60µm: ANOVA F[2,6]=1.943; p=0.2236

70µm: ANOVA F[2,6]=7.566; p=0.0229

Fisher's PLSD:

	p-value
WT, AA	0.0192
AA, DD	0.0123
WT, DD	0.7335

80µm: ANOVA F[2,6]=12.725; p=0.0069

Fisher's PLSD:

	p-value
WT, AA	0.0100
AA, DD	0.0030
WT, DD	0.3121

90µm: ANOVA F[2,6]=14.868 ; p=0.0047

Fisher's PLSD:

	p-value
WT, AA	0.0047
AA, DD	0.0024
WT, DD	0.5442

100µm: ANOVA F[2,6]=7.713; p=0.0220

Fisher's PLSD:

	p-value
WT, AA	0.0159
AA, DD	0.0133
WT, DD	0.8890

110µm: ANOVA F[2,6]=14.105; p=0.0054

Fisher's PLSD:

	p-value
WT, AA	0.0028
AA, DD	0.0053
WT, DD	0.5617

120µm: ANOVA F[2,6]=5.103; p=0.0508

130µm: ANOVA F[2,6]=5.348; p=0.0464

Fisher's PLSD:

	p-value
WT, AA	0.0247
AA, DD	0.0374
WT, DD	0.7631

140µm: ANOVA F[2,6]=4,766; p=0.0576

150µm: ANOVA F[2,6]=3,410; p=0.1025

160µm: ANOVA F[2,6]=2,105; p=0.2029

170µm: ANOVA F[2,6]=1,969; p=0.2201

180µm: ANOVA F[2,6]=2,335; p=0.1779

190µm: ANOVA F[2,6]=2,895; p=0.1318

200µm: ANOVA F[2,6]=2,416; p=0.1699

210 μ m: ANOVA $F[2,6]=3,692$; $p=0.0901$

220 μ m: ANOVA $F[2,6]=1,000$; $p=0.4219$

Figure 3E

Time in the center

Number of individuals AA-SHAM=8; AA-IRR=9

Student t-test $t[15]=0.009$; $p=0.9928$

Figure 3F

Latency to feed

Number of individuals AA-SHAM=8; AA-IRR=9

Student t-test $t[15]=-2.527$; $*p<0.0232$

Figure 4A

BDNF Immunoassay

Number of individuals WT=13; AA=14; DD=15

ANOVA $F[2,39]=3.242$; $p^*<0.05$

Fisher's PLSD:

	p-value
WT, AA	0.0257
AA, DD	0.0454
WT, DD	0.7427

Figure 4B

Mature-BDNF/pro-BDNF ratio

Number of individuals WT=3; AA=3; DD=3

ANOVA $F[2,6]=12.500$; $p^{**}<0.01$

Fisher's PLSD:

	p-value
WT, AA	0.0030
AA, DD	0.0109
WT, DD	0.2913

Figure 4C

pERK/ERK ratio

Number of individuals WT=3; AA=3; DD=3

ANOVA $F[2,6]=7.410$; $p^*<0.05$

Fisher's PLSD:

	p-value
WT, AA	0.0089
AA, DD	0.0551
WT, DD	0.2011

pCREB/CREB ratio

Number of individuals WT=3; AA=2; DD=3

ANOVA $F[2,5]=126.737$; $p^{***}<0.001$

Fisher's PLSD:

	p-value
WT, AA	>0.0001

AA, DD >0.0001
WT, DD 0.2332

Figure 5A

Data are from 3 independent experiments

Number of vesicles WT=48; AA=42; DD=45

Anterograde velocity

ANOVA $F[2,132]=9.376$; $p^{***}<0.001$

Fisher's PLSD:

	p-value
WT, AA	0.0004
AA, DD	0.0001
WT, DD	0.7175

Retrograde velocity

ANOVA $F[2,132]=7.613$; $p^{***}<0.001$

Fisher's PLSD:

	p-value
WT, AA	0.0252
AA, DD	0.0002
WT, DD	0.0875

Pausing time

ANOVA $F[2,132]=6.443$; $p^{**}<0.01$

Fisher's PLSD:

	p-value
WT, AA	0.0246
AA, DD	0.0005
WT, DD	0.1750

Figure 5B

K2/L

Data are from 3 independent experiments

ANOVA $F[2,6]=11,390$; $p^{**}<0.01$

Fisher's PLSD:

	p-value
WT, AA	0.0079
AA, DD	0.0049
WT, DD	0.6900

Figure 5C

Data are from 3 independent experiments

Number of vesicles WT=46; AA=59; DD=32

Anterograde velocity

ANOVA $F[2,134]=8.906$; $p^{***}<0.001$

Fisher's PLSD:

	p-value
WT, AA	0.0004

AA, DD 0.0010

WT, DD 0.9213

Retrograde velocity

ANOVA F[2,134]=4.735; $p^* < 0.05$

Fisher's PLSD:

p-value

WT, AA 0.0054

AA, DD 0.0276

WT, DD 0.7710

Pausing time

ANOVA F[2,134]=4,872; $p^{**} < 0.01$

Fisher's PLSD:

p-value

WT, AA 0.0161

AA, DD 0.0068

WT, DD 0.5911

Figure 5E

K2/L ratio

Data are from 3 independent experiments

ANOVA F[2,6]=10.311; $p^* < 0.05$

Fisher's PLSD:

p-value

WT, AA 0.0131

AA, DD 0.0053

WT, DD 0.4618

Figure 6A

Data are from 5 independent experiments

HTT on MT

ANOVA F[2,12]=4.335; $p^* < 0.05$

Fisher's PLSD:

p-value

WT, AA 0.0296

AA, DD 0.0222

WT, DD 0.8790

p150^{Glued} on MT

ANOVA F[2,12]=4.372; $p^* < 0.05$

Fisher's PLSD:

p-value

WT, AA 0.0235

AA, DD 0.0266

WT, DD 0.9459

DIC on MT

ANOVA F[2,12]=4.028; $p^* < 0.05$

Fisher's PLSD:

	p-value
WT, AA	0.0416
AA, DD	0.0231
WT, DD	0.7522

Figure 6B

Data are from 3 independent experiments

ANOVA $F[2,106]=3,234$; $p^*<0.05$

Fisher's PLSD:

	p-value
WT, AA	0,0270
AA, DD	0,0340
WT, DD	0,9737

Figure S1A

Number of falls in the Rotarod

number of individuals WT=48; AA=32; DD=13

ANOVA $F[2,90]=0.786$; $p=0.4589$

Figure S1B

Total ambulatory distance in the Open Field

number of individuals WT=59; AA=47; DD=43

ANOVA $F[2,146]=8.044$; $p^{***}<0.001$

Fisher's PLSD:

	p-value
WT, AA	0.5991
AA, DD	0.0003
WT, DD	0.0010

Figure S1C

Food consumption

number of individuals WT=59; AA=47; DD=41

ANOVA $F[2,144]=0.104$; $p=0.9009$

Figure S2

Total number of DCX-positive neurons in the dentate gyrus

number of individuals AA SHAM=3; AA IRR=3

Student t-test $t[4]=7,320$; $p^{**}=0.0019$

2.3. Discussion et résultats complémentaires

Au cours de cette étude, nous avons montré que l'état de phosphorylation de la HTT est impliqué dans la modulation des comportements de type anxio-dépressif chez la souris. En effet, l'ablation des phosphorylations de la HTT en sérines 1181 et 1201 réduit le phénotype anxieux et dépressif. Par ailleurs, certains de ces effets sont modulés par la neurogenèse hippocampique. L'augmentation de la neurogenèse hippocampique dans le modèle *Hdh*^{S1181A/S1201A} résulte d'une augmentation de l'expression du BDNF, de son transport le long des axones ainsi que de sa signalisation dans l'hippocampe. Enfin, la HTT non phosphorylée stimule le transport axonal dont celui du BDNF *via* une plus forte association aux moteurs moléculaires (dynéine et p150^{Glued}).

La neurogenèse hippocampique

Nous avons montré pour la première fois un rôle de la HTT non pathogène dans la neurogenèse hippocampique. Les publications précédentes avaient identifié des défauts de neurogenèse consécutifs à la mutation polyQ de la HTT (Lazic *et al.* 2004; Gil *et al.* 2005; Grote *et al.* 2005; Phillips *et al.* 2005; Lazic *et al.* 2006; Peng *et al.* 2008; Gil-Mohapel *et al.* 2011; Simpson *et al.* 2011). Il a été proposé que ces défauts résultent des dysfonctions induites par la formation d'agrégats et/ou la réduction de l'expression du BDNF dans l'hippocampe. A la lumière de nos résultats, nous proposons que dans la MH des pertes de fonctions de la HTT pourraient également contribuer aux défauts de neurogenèse observés. Par ailleurs, le BDNF pourrait être le lien entre ces différents symptômes. Il stimule l'arborisation dendritique et la survie des neurones (Krishnan and Nestler 2008), comme dans le cas de l'ablation des phosphorylations de la HTT. En situation pathologique, les nouveaux neurones présentent des défauts d'arborisation dendritique et de survie (Grote *et al.* 2005; Phillips *et al.* 2005; Lazic *et al.* 2006; Gil-Mohapel *et al.* 2011; Simpson *et al.* 2011; Orvoen *et al.* 2012), ce qui corrèle avec un déficit de la voie de signalisation du BDNF.

Le rôle de Cdk5 dans la maladie de Huntington

Les sérines en position 1181 et 1201 de la HTT sont phosphorylées par Cdk5 (Schilling *et al.* 2006; Anne *et al.* 2007). L'activité de la kinase Cdk5 est régulée par ses

phosphorylations dont celle activatrice en tyrosine 15, et par ses activateurs neuronaux p35 et p39 (Dhavan and Tsai 2001). Le clivage de p35 en p25 par la calpaine hyperactive Cdk5. La phosphorylation en Tyr-15, de même que le clivage de p35 et l'accumulation de p25 sont associés à une activité pro-apoptotique de Cdk5 (Kusakawa *et al.* 2000; Lee *et al.* 2000; Camins *et al.* 2006; Lin *et al.* 2007).

Le rôle de Cdk5 dans la MH n'est pas clair. Le laboratoire du Dr. Rubinsztein a montré que la HTT est phosphorylée à la S434 par Cdk5 ce qui prévient le clivage *in vitro* de la HTT, réduisant ainsi sa toxicité (Luo *et al.* 2005). De plus, les phosphorylations en position 1181 et 1201 inhibent la toxicité induite par la HTT polyQ ou par un stress oxydatif dans des modèles de surexpression en culture de neurones (Anne *et al.* 2007). Cette idée d'un effet protecteur de Cdk5 s'appuie également sur des données issues de patients atteints de la MH. En effet, les niveaux de Cdk5 ainsi que ceux de son activateur p35, sont diminués chez les patients (Anne *et al.* 2007). Au cours de la MH, l'effet protecteur de Cdk5 pourrait être diminué par une réduction de son expression ainsi que celle de son activateur.

Cependant, des résultats contradictoires ont été publiés par d'autres laboratoires. Tout d'abord, cette kinase est suractivée dans les modèles murins et dans des extraits post-mortem de cerveaux de patients MH (Paoletti *et al.* 2008). Cette augmentation de l'activité serait la conséquence d'une hausse du niveau de phosphorylation de Cdk5 et de la conversion de p35 en p25 (Paoletti *et al.* 2008). Ces modifications compensent la diminution des niveaux protéiques de Cdk5 et expliquent la réduction de p35. Ainsi, la sur-activation de Cdk5 obtenue sensibilise les cellules striatales exprimant la HTT mutante, à la toxicité induite par la dopamine et le glutamate (Paoletti *et al.* 2008). Très récemment, une autre étude a confirmé le rôle toxique de Cdk5 dans un modèle d'excitotoxicité *in vivo* induit par l'injection d'acide quinolinique (QA) (Park *et al.* 2012). La réduction du dosage de p35 dans les souris p35 (+/-) réduit la toxicité induite par l'acide quinolinique (QA) dans les neurones striataux. Dans les souris YAC128, l'injection dans le striatum de QA, conduit à une augmentation de p25 supérieure à l'augmentation de p25 observée chez des souris sauvages ayant subi le même traitement (Park *et al.* 2012).

Nos résultats sont en accord avec l'idée que la réduction de l'activité de Cdk5 pourrait se révéler bénéfique dans le cadre de la maladie de Huntington. En effet,

l'activation de Cdk5 en condition normale par p35 n'induit pas de symptômes dépressifs et est protectrice dans différents modèles (Luo *et al.* 2005; Anne *et al.* 2007). Cependant, dans le cadre de la maladie de Huntington, la dérégulation de Cdk5 par l'augmentation de sa phosphorylation et la conversion de p35 en p25 entraînent une activité aberrante de Cdk5, qui *in fine* sensibilise les neurones (Paoletti *et al.* 2008; Park *et al.* 2012). De plus, l'activateur p35, qui est myristoylé, est associé aux membranes tandis que p25 ne possède plus le site de myristoylation (Dhavan and Tsai 2001). L'activité de Cdk5 dépendant de son activateur, la conversion de p35 en p25 modifie la localisation de son activité et donc ses cibles protéiques. Ainsi, selon que Cdk5 soit activé par p35 ou p25, ses fonctions sont différentes.

Les symptômes dépressifs dans la maladie de Huntington

Notre étude nous permet de proposer que la perte de fonction de régulation de l'anxiété/dépression de la HTT contribue à l'anxiété/dépression observée dans la MH. En effet, la HTT mutante conduit à des phénotypes anxio-dépressifs dans les modèles murins, qui miment les symptômes retrouvés chez les patients atteints de la MH (Pang *et al.* 2009; Pouladi *et al.* 2009; Renoir *et al.* 2011; Orvoen *et al.* 2012). En particulier, l'expression de l'exon 1 polyQ de la HTT dans le modèle R6/1 suffit à déclencher les symptômes dépressifs (Pang *et al.* 2009). Bien que la HTT endogène de ce modèle ne soit pas mutée, la présence de la forme polyQ couplée à l'exon 1 agit de façon dominante, reflétant le caractère dominant de la mutation dans la MH. Le phénotype de type dépressif pourrait être lié à une augmentation de l'activité de Cdk5, comme cela a été observé dans des modèles murins et chez les patients (Paoletti *et al.* 2008). Une augmentation de l'activité de Cdk5 contribuerait ainsi aux symptômes dépressifs (Zhu *et al.* 2012). En effet, l'activité de Cdk5 est augmentée et est spécifiquement requise pour induire un phénotype de type dépressif après un traitement CMS (chronic mild stress) (Zhu *et al.* 2012).

La HTT est l'objet d'une protéolyse par différentes protéases dont la caspase 6 (Pouladi *et al.* 2009), la caspase 3 (Goldberg *et al.* 1996), la caspase 1 (Wellington *et al.* 1998) et la calpaïne (Qin and Gu 2004). De plus, la mutation polyQ active directement certaines caspases, induisant son propre clivage (Qin and Gu 2004). Ainsi au cours de la progression de la pathologie, la HTT polyQ est clivée et des fragments N-terminaux sont générés. Certains ne contiennent pas le domaine de régulation contenant entre autres

les sérines 1181 et 1201. Le clivage de la HTT conduit à la perte de certaines de ces fonctions. En particulier, il a été montré que lorsque la région N-terminale de la HTT est réduite à l'exon 1, cette dernière ne peut plus exercer sa fonction dans le transport axonal (Gauthier *et al.* 2004). De façon similaire, on peut proposer que la perte du domaine de régulation contenant les sérines 1181/1201 à la suite de clivage conduirait à altérer la fonction contrôlant l'humeur. Cette perte de fonction seule ou combinée à d'autres perturbations induites par la forme polyQ telles que les effets sur le transport ou la transcription pourraient participer aux symptômes dépressifs (**Figure 41**).

En support de cette hypothèse, la prévention du clivage de la HTT sur le site caspase 6 en position 586 dans le modèle YAC128 diminue les symptômes dépressifs (Pouladi *et al.* 2009). Ainsi dans ce modèle MH, la perte d'un fragment C-terminal qui contient les sérines 1181/1201, est une étape requise au développement des symptômes de type dépressif.

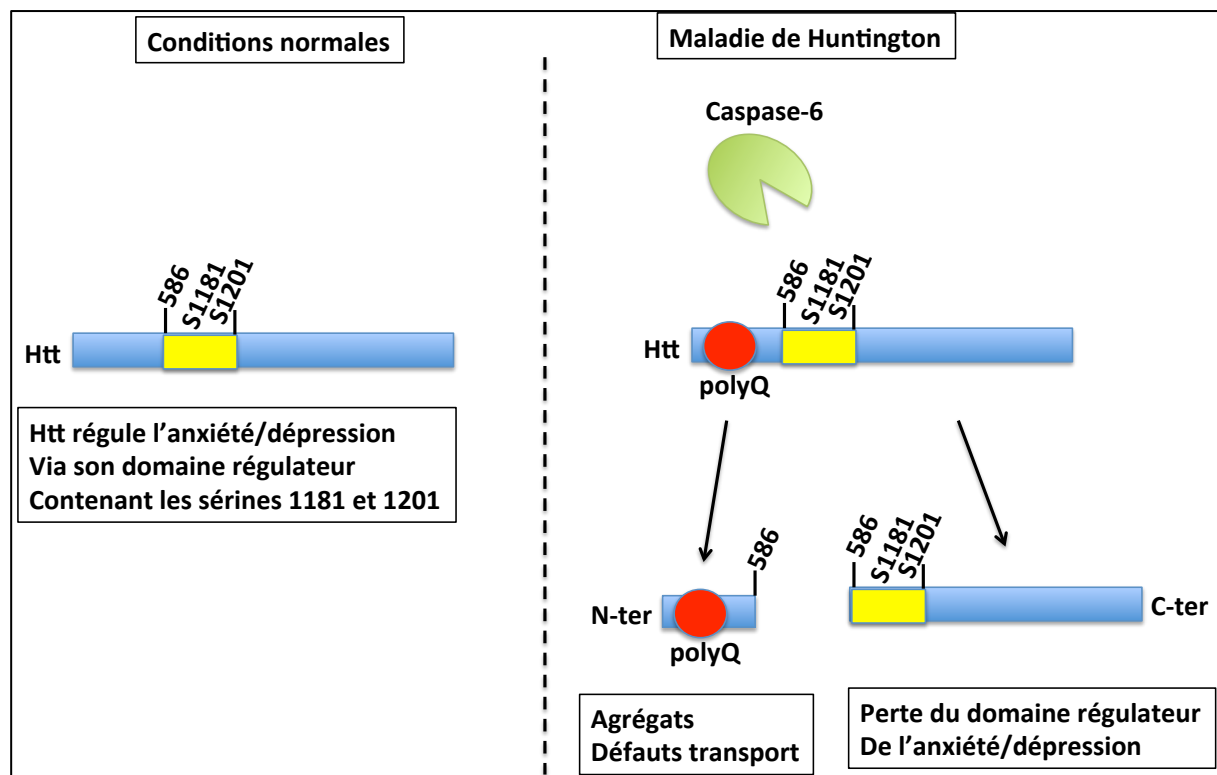


Figure 41 : Modèle proposé décrivant les mécanismes moléculaires induisant les symptômes dépressifs dans la maladie de Huntington. En conditions normales, la HTT module l'anxiété/dépression via le domaine contenant les sérines 1181 et 1201. Cette régulation fine est médiée par les phosphorylations par Cdk5. Dans la maladie de Huntington, la forme polyQ induit son clivage par la caspase 6 libérant ainsi le domaine régulateur. Les fragments courts N-terminaux provoquent un certain nombre de dysfonctions dont la perturbation du transport vésiculaire et la formation d'agrégats. La dépression dans la MH pourrait donc, pour partie, être la conséquence d'une perte de fonction de la protéine normale.

Le rôle de la huntingtine dans la dépression

Notre étude a permis de mettre en évidence le rôle de la HTT comme modulateur de l'anxiété/dépression. Nous avons analysé les niveaux de phosphorylations aux sérines 1181 et 1201 dans un modèle murin de dépression, le modèle CORT (David *et al.* 2009). La corticostérone (CORT) est l'hormone du stress induite par une activation de l'axe HPA. Le modèle CORT consiste à traiter des souris avec de la corticostérone fournie pendant 4 semaines dans l'eau du biberon (David *et al.* 2009). Les hippocampes de ces souris CORT présentent des niveaux de phosphorylations plus élevés en positions 1181 et 1201 de la HTT par rapport aux souris contrôles (**Figure 42**). En tenant aussi compte de mes résultats sur les modèles murins *Hdh*^{S1181A/S1201A} et *Hdh*^{S1181D/S1201D}, ceci renforce l'idée d'un rôle de la HTT dans l'étiologie de la dépression.

Bien que la forme constitutivement phosphorylée seule ne suffise pas à induire les comportements de type dépressif, les phosphorylations pourraient être requises en combinaison de stimuli stressants comme le traitement corticostérone, par exemple. Il serait intéressant de déterminer dans quelle mesure l'ablation des phosphorylations peut supprimer les symptômes dépressifs observés dans le modèle CORT et dans d'autres modèles de dépression. De plus, dans ce même modèle, répondant aux traitements antidépresseurs chroniques (David *et al.* 2009; Rainer *et al.* 2011), il faudrait déterminer si ces phosphorylations sont modulées par un traitement antidépresseur. Enfin, il serait intéressant de tester l'effet d'antidépresseurs sur les souris *Hdh*^{S1181D/S1201D}.

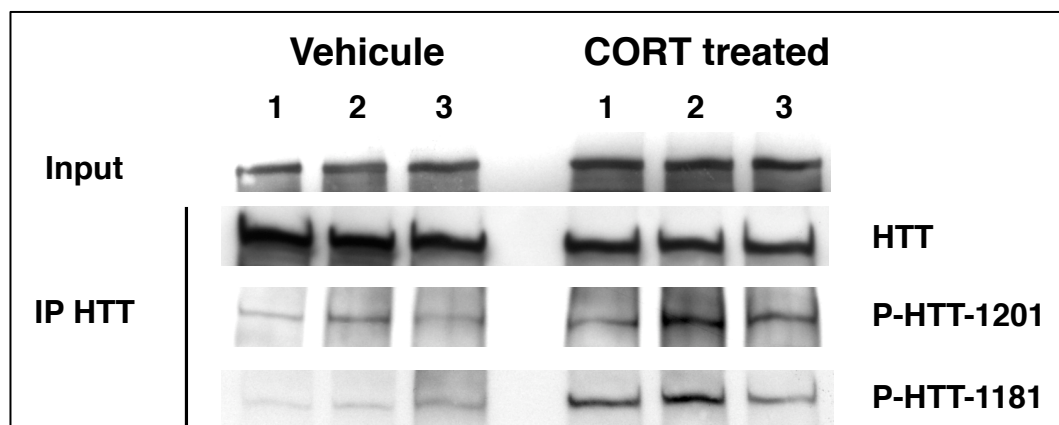


Figure 42 : Les phosphorylations de la HTT sont augmentées dans les souris CORT ayant des comportements de type dépressif. Immunoprécipitation de la HTT à partir d'extraits hippocampaux de souris traitées CORT et véhicule, et immunoblotting contre les phosphorylations sur les sérines 1181 et 1201 de la HTT.

La maladie de Huntington et la Dépression partagent des mécanismes communs

La dépression et la MH présentent des symptômes communs : perte de poids et élévation du niveau de cortisol (Heuser *et al.* 1991; Leblhuber *et al.* 1995; Krishnan and Nestler 2008). Les niveaux de BDNF sont également réduits dans la MH (Zajac *et al.* 2010) et la dépression (Duman and Monteggia 2006). De plus, on observe une diminution de la neurogenèse à la fois dans des modèles murins de la MH (Lazic *et al.* 2004; Gil *et al.* 2005; Grote *et al.* 2005; Phillips *et al.* 2005; Lazic *et al.* 2006; Peng *et al.* 2008; Gil-Mohapel *et al.* 2011; Simpson *et al.* 2011) mais également dans la dépression (Krishnan and Nestler 2008). Bien que la réduction de la neurogenèse ne conduise pas à la dépression, les traitements antidépresseurs stimulent la neurogenèse et certains de leurs effets en découlent directement (Drew and Hen 2007; Eisch *et al.* 2008; Perera *et al.* 2011; Samuels and Hen 2011). De la même manière, les traitements antidépresseurs stimulent la neurogenèse et retardent l'apparition des symptômes (Grote *et al.* 2005; Peng *et al.* 2008). L'enrichissement de l'environnement est bénéfique pour les deux maladies en retardant l'âge d'apparition des symptômes dans la MH (Lazic *et al.* 2006) et en améliorant les symptômes dépressifs (Brenes *et al.* 2008). Ainsi, la HTT pourrait être impliquée dans la pathophysiologie de la dépression. Cdk5 pourrait moduler cette fonction en phosphorylant la HTT. Une étude récente, basée sur le modèle CMS (chronic mild stress, induisant un phénotype dépressif chez le rat), a montré que l'activité de Cdk5 est induite par cette procédure (Zhu *et al.* 2012). De plus, l'activité de Cdk5 est spécifiquement requise dans le gyrus denté de l'hippocampe pour induire le phénotype dépressif après le CMS (Zhu *et al.* 2012). Enfin, les antidépresseurs réduisent l'activité de Cdk5, illustrant un rôle de cette kinase au cours de la dépression. Nos résultats supportent cette notion et identifient une nouvelle voie impliquant la HTT dans la dépression.

3. L'ablation des phosphorylations de la huntingtine améliore les symptômes de type dépressif d'un modèle murin de la maladie de Huntington

3.1. Introduction

Le potentiel anxiolytique/antidépresseur du blocage des phosphorylations de la HTT sur les sérines 1181 et 1201 est-il suffisant pour bloquer les symptômes anxio-dépressifs observés dans le contexte de la MH? Plusieurs modèles murins de la maladie développent des symptômes de type dépressif bien caractérisés (Pang et al. 2009; Pouladi et al. 2009; Renoir et al. 2011; Orvoen et al. 2012). Nous avons choisi d'analyser l'effet d'un contexte *Hdh*^{S1181A/S1201A} sur la dépression induite par l'expression de l'exon 1 mutant. Le modèle R6/1 développe des symptômes dépressifs précoces (Pang et al. 2009).

Pour réaliser cette étude, des souris homozygotes *Hdh*^{S1181A/S1201A} et *Hdh*^{S1181D/S1201D} ont été croisées avec les souris R6/1 (**Figure 43**). Nous avons obtenu une première génération hétérozygotes pour les mutations sur les phosphorylations et dont 50% expriment le transgène (exon 1 mutant). Cette ségrégation du transgène est permise par la localisation de celui-ci sur un chromosome différent de celui de la HTT. Ces souris ont été croisées avec des souris homozygotes *Hdh*^{S1181A/S1201A} et *Hdh*^{S1181D/S1201D}. A l'issue de ces croisements, nous avons obtenu des souris homozygotes *Hdh*^{S1181A/S1201A} et *Hdh*^{S1181D/S1201D} exprimant également le transgène R6/1.

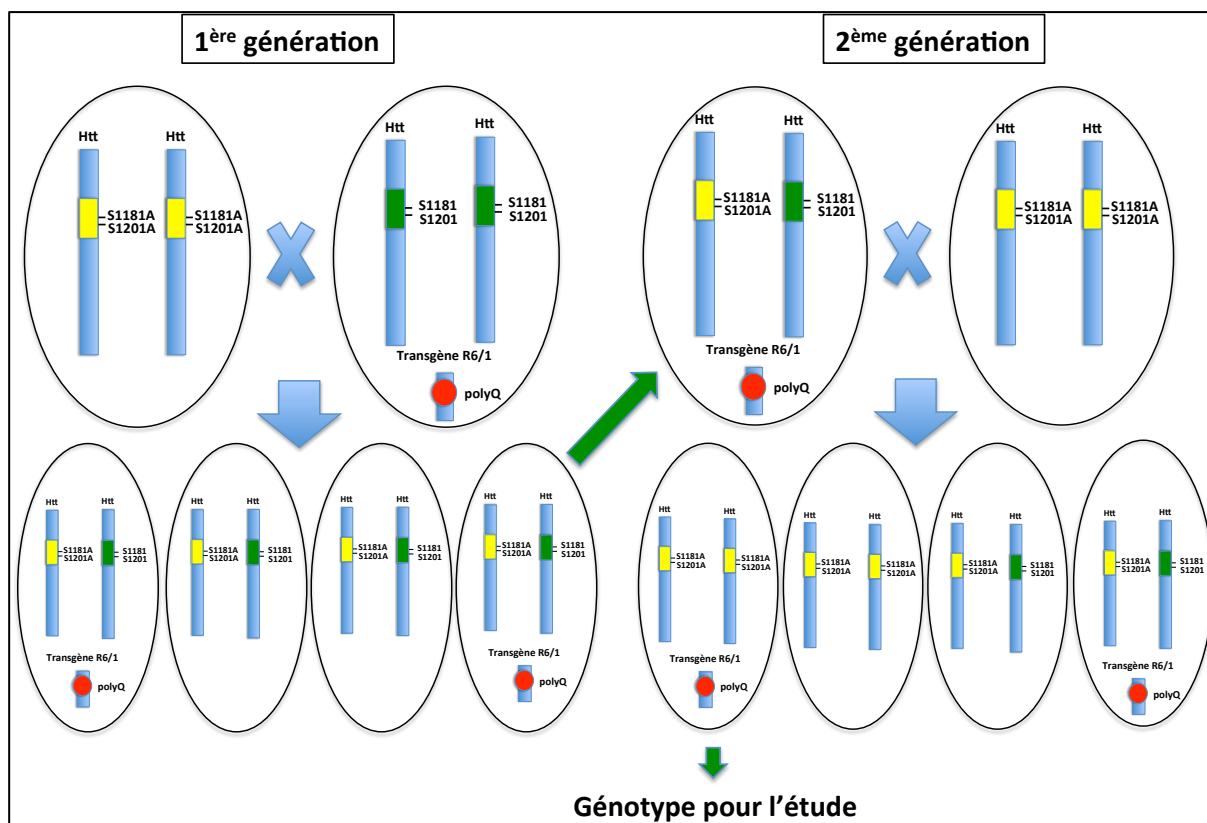


Figure 43: Stratégie de croisement pour obtenir des souris homozygotes pour l'absence de phosphorylations et qui expriment le transgène R6/1.

3.2. Résultats

Ablation of Huntingtin phosphorylation at serines 1181 and 1201 improves depression-related behavior and neurogenesis in the R6/1 mouse model of Huntington Disease.

Karim Ben M'Barek^{1,2,3}, Sophie Orvoen⁴, Alain M. Gardier⁴, Denis J. David⁴, 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

*Correspondence: sandrine.humbert@curie.fr

Results

R6/1 Mouse Model of Huntington Disease Displays an Anxio-Depressive-Related Behavior, a Reduced Body Weight and Motor Defects

We used the R6/1 HD mouse model expressing exon 1 with a 116 polyQ expansion (DiFiglia *et al.* 1997). Expression of this polyQ-fragment leads to an acute HD model with animals developing rapidly typical symptoms including an anxio-depressive-related behavior, as shown in the NSF test (Pang *et al.* 2009)(**Figure 1A**). In contrast to a previous report, we did not observe a sex difference in the behavioral phenotypes assayed in the NSF paradigm (data not shown).

Beside the anxious and depressive-like behaviors observed in R6/1 mice, other phenotypes are described. Among them, male R6/1 mice fail to gain body weight until 22 weeks when they begin to lose weight (Brooks *et al.* 2012). In our experimental conditions, we observed that R6/1 males failed significantly to gain body weight as early as 11 weeks compared to wild-type males (**Figure 1B**). Female R6/1 mice also failed to gain weight by 14 weeks in our conditions (**Figure 1B**).

Another hallmark of the R6/1 model is the appearance of early motor defects. We assessed the motor coordination on a nonaccelerating rotarod and found that R6/1 mice fell an increased number of time during the rotarod session when compared to wild-type (**Figure 1C**). We also quantify the locomotor activity on an open field and found that R6/1 mice displayed a reduced total ambulatory distance as compared to wild-type (**Figure 1D**).

Phosphorylation Ablation on HTT at S1181/1201 does not Ameliorate Motor Phenotype and Body Weight of R6/1 Mice

We then crossed *Hdh*^{S1181A/S1201A}, *Hdh*^{S1181D/S1201D} and R6/1 mice to express polyQ exon 1 in a context where HTT is either unphosphorylatable or constitutively phosphorylated at S1181/1201. We measured body weight of the three different genotypes and found no clear improvement of weight gain neither in *Hdh*^{S1181A/S1201A}-R6/1 or *Hdh*^{S1181D/S1201D}-R6/1 when compared to R6/1 mice (**Figure 2A**). Another phenotype associated with this transgenic strain is the impairment of motor skills (Brooks *et al.* 2012). We assessed the motor phenotype using a nonaccelerating rotarod

at 12 weeks of age. We found no significant difference between the 3 genotypes (**Figure 2B**).

These results indicate that modulating phosphorylations of endogenous HTT, does not improve the motor defects induced by the ectopic expression of a HD mutant exon 1 transgene.

Unphosphorylated HTT at S1181/1201 Engenders an Anxiolytic and Anti-depressant-like Effect in HD

We then asked whether ablation of HTT phosphorylations would be sufficient to provide a beneficial effect on anxiety and depression-like behavior in R6/1. We analysed the anxious/depressed behavior using the Open Field (OF) and the novelty-suppressed feeding (NSF) test, as we previously showed that they are modulated by ablation of huntingtin phosphorylations (Ben M'Barek *et al.* article 1). *Hdh*^{S1181A/S1201A}-R6/1 mice were significantly less anxious in the OF test than *Hdh*^{S1181D/S1201D}-R6/1 and R6/1 mice, as revealed by an increased time spent in the center and a higher ratio of total distance in center divided by the total ambulatory distance (**Figure 3A**). The decreased anxiety was confirmed in the NSF test. Indeed, in this assay, the latency to feed was reduced in *Hdh*^{S1181A/S1201A}-R6/1 animals compared to the other groups (**Figure 3B**), with similar global food consumption in all groups (data not shown).

Together, these results show that the presence of endogenous unphosphorylatable HTT is sufficient to counteract the anxious and depressive-like behaviors induced by the expression of a polyQ-exon 1 fragment in R6/1 mice.

Phosphorylation Ablation on HTT at S1181/1201 Increases Hippocampal Neurogenesis and BDNF levels

As absence of S1181/1201 phosphorylation achieves antidepressant effects through an increased neurogenesis (Ben M'Barek *et al.* article 1), we evaluated neurogenesis in the dentate gyrus of the hippocampus of *Hdh*^{S1181A/S1201A}-R6/1, *Hdh*^{S1181D/S1201D}-R6/1 and R6/1 mice. We determined the survival of newborn cells three weeks after BrdU administration and found an increased number of BrdU+ cells in *Hdh*^{S1181A/S1201A}-R6/1 compared to the other groups (**Figure 4A**).

The brain-derived neurotrophic factor (BDNF) regulates neurogenesis and its upregulation is associated to the antidepressant effect of phospho-ablation on HTT (Ben m'Barek *et al.* article 1). We then quantified the levels of BDNF on hippocampal extracts of the 3 genotypes. We found that ablation of HTT phosphorylations in the context of the expression of a polyQ-exon 1 transgene induce a increase of mature BDNF when compared to R6/1 and *Hdh*^{S1181D/S1201D}-R6/1 hippocampi.

Collectively, these results indicate that ablation of HTT phosphorylation on the R6/1 mouse model of HD stimulates both hippocampal neurogenesis and BDNF levels.

Experimental procedures

Animals

Knock-In mice *Hdh*^{S1181A/S1201A} and *Hdh*^{S1181D/1201D} were described in Ben M'Barek *et al.* (article 1). R6/1 mice were obtained from The Jackson Laboratory (reference of the strain: B6.Cg-Tg(HDexon1)61Gpb/J) (DiFiglia *et al.* 1997). Mice were transgenic for the 5' end of the human HD gene encompassing exon 1 with originally 116 CAG repeat. R6/1 mice were crossed for two generations with *Hdh*^{S1181A/S1201A} and *Hdh*^{S1181D/1201D} mice to obtain wild-type, *Hdh*^{S1181A/S1201A} and *Hdh*^{S1181D/1201D} mice expressing human HD exon 1 transgene. Mice were kept in 12/12 hours of light/dark cycle on plastic cages, and allowed to eat and drink *ad libitum*.

Behavioral Testing.

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

BrdU injection

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.

Immunohistochemistry

Mice were anesthetized with ketamine (250mg/mL; 100µM/10g body weight) by intra-peritoneal injections. Then, mice were perfused with a saline solution and, after complete blood clearing, by paraformaldehyde 4%. Brains were removed and kept in PFA 4% at least overnight. They were then cryoprotected in 30% sucrose. Frozen blocks were sectioned at 35 µm and slices were kept free-floating in PBS with 0.1% azide. Serial sections were made, each one covering the whole hippocampus, and placed on 6 wells of a plate.

For BrdU immunostaining, twelve slices per brain were treated for antigen retrieval using 0.01M citric acid. Peroxydase was quenched by 0.3% H₂O₂ in 0.1M TBS. Then, slices were permeabilized with 0.1% trypsin in 0.1M Tris HCl with 0.1% CaCl₂, and transferred in 2N HCl solution. Slices were blocked with 10% normal donkey serum (NDS) in PBS 0.5% tween20. They were incubated in rat anti-BrdU Antibody (AbD Serotec) in blocking solution overnight. Secondary biotinylated donkey anti-rat was used and revelation was next performed using Vector ABC Elit kit and Vectastain DAB kit, according to manufacturer instructions. Sections were then counterstained with hematoxylin, dehydrated in ethanol, delipidated in xylene and mounted with entellan.

Statistical Analyses

Statview 4.5 software (SAS Institute Inc., Cary, NC) was used for statistical analysis. Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M.

Complete statistical analyses:

Figure 1A: number of individuals WT=23 ; R6/1 =13

Student t-test $t[34]=2.112$; $p= 0.0421$

Figure 1B:

Male body weight

number of individuals WT=10 ; R6/1 =7

40 days: Student t-test $t[15]=-2.538$; $p= 0.0227$

63 days: Student t-test $t[15]=-1.827$; $p= 0.0877$

75 days: Student t-test $t[15]=-3.388$; $p= 0.0041$

84 days: Student t-test $t[15]=-3.006$; $p= 0.0089$

96 days: Student t-test $t[15]=-4.408$; $p= 0.0005$

110 days: Student t-test $t[15]=-4.647$; $p= 0.0003$

Female body weight

number of individuals WT=13 ; R6/1 =8

40 days: Student t-test $t[19]=2.515$; $p= 0.0211$

63 days: Student t-test $t[19]=0.538$; $p= 0.5970$

75 days: Student t-test $t[19]=-2.244$; $p= 0.0369$

84 days: Student t-test $t[19]=-1.388$; $p= 0.1812$

96 days: Student t-test $t[19]=-2.912$; $p= 0.0089$

110 days: Student t-test $t[19]=-3.455$; $p= 0.0027$

Figure 1C: number of individuals WT=22 ; R6/1 =15

Student t-test $t[35]=2.981$; $p= 0.0052$

Figure 1D: number of individuals WT=23 ; R6/1 =15

Student t-test $t[36]=-7.502$; $p<0.0001$

Figure 2A:

Male body weight

number of individuals R6/1=7 ; R6/1-AA=16 ; R6/1-DD=11

40 days: ANOVA $F[2,31]=0.293$; $p=0.7483$

63 days: ANOVA $F[2,31]=2.187$; $p=0.1292$

75 days: ANOVA $F[2,31]=1.191$; $p=0.3173$

84 days: ANOVA $F[2,31]=0.643$; $p=0.5326$

96 days: ANOVA $F[2,31]=4.113$; $p=0.0260$

Fisher's PLSD:

	p-value
R6/1, R6/1-AA	0.0079
R6/1-AA, R6/1-DD	0.1777
R6/1, R6/1-DD	0.1328

110 days: ANOVA $F[2,31]=1.053$; $p=0.3610$

Female body weight

number of individuals R6/1=8 ; R6/1-AA=10 ; R6/1-DD=6

40 days: ANOVA $F[2,21] = 9.914$; $p=0.0009$

Fisher's PLSD:

	p-value
R6/1, R6/1-AA	0.0003
R6/1-AA, R6/1-DD	0.4290
R6/1, R6/1-DD	0.0064

63 days: ANOVA $F[2,21] = 3.570$; $p=0.0463$

Fisher's PLSD:

	p-value
R6/1, R6/1-AA	0.0212
R6/1-AA, R6/1-DD	0.8958
R6/1, R6/1-DD	0.0519

75 days: ANOVA $F[2,21] = 0.858$; $p=0.4385$

84 days: ANOVA $F[2,21] = 2.736$; $p=0.0879$

96 days: ANOVA $F[2,21] = 0.524$; $p=0.5995$

110 days: ANOVA $F[2,21] = 0.069$; $p=0.9334$

Figure 2B: number of individuals R6/1=15 ; R6/1-AA=25 ; R6/1-DD=16

ANOVA $F[2,53] = 1.101$; $p=0.3399$

Figure 3A: number of individuals R6/1=15 ; R6/1-AA=24 ; R6/1-DD=18

Total time in the center

ANOVA $F[2,54] = 5.812$; $p^{**}<0.01$

Fisher's PLSD:

	p-value
R6/1, R6/1-AA	0.0043
R6/1-AA, R6/1-DD	0.0086
R6/1, R6/1-DD	0.7104

Distance centre / total ambulatory distance

ANOVA $F[2,54] = 3.705$; $p^{*}<0.05$

Fisher's PLSD:

	p-value
R6/1, R6/1-AA	0.0089
R6/1-AA, R6/1-DD	0.1973
R6/1, R6/1-DD	0.1702

Figure 3B: number of individuals R6/1=15 ; R6/1-AA=24 ; R6/1-DD=16

ANOVA $F[2,52] = 6.439$; $p^{**}<0.01$

Fisher's PLSD:

	p-value
R6/1, R6/1-AA	0.0008
R6/1-AA, R6/1-DD	0.0758

R6/1, R6/1-DD 0.1085

Figure 4A: 4 mice per conditions

ANOVA $F[2,9] = 7.166$; $p^* < 0.05$

Fisher's PLSD:

	p-value
R6/1, R6/1-AA	0.0382
R6/1-AA, R6/1-DD	0.0047
R6/1, R6/1-DD	0.2250

Figure 4B: number of individuals R6/1=6 ; R6/1-AA=6 ; R6/1-DD=5

ANOVA $F[2,14] = 9.476$; $p^{**} < 0.01$

Fisher's PLSD:

	p-value
R6/1, R6/1-AA	0.0008
R6/1-AA, R6/1-DD	0.0114
R6/1, R6/1-DD	0.2787

ACKNOWLEDGMENTS

We greatly acknowledge the staff from Institut Curie Imaging and Animal Facilities for help; members of the Saudou and Humbert's laboratories for helpful comments. This work was supported by grants from Agence Nationale pour la Recherche (ANR-09-BLAN-0080, S.H.), ARC, CNRS, INSERM and the Curie Institute (S.H.). K.B. was supported by fellowships from the Fondation pour la Recherche Médicale and by the French Minister of Research; S.H. is an INSERM/AP-HP investigator.

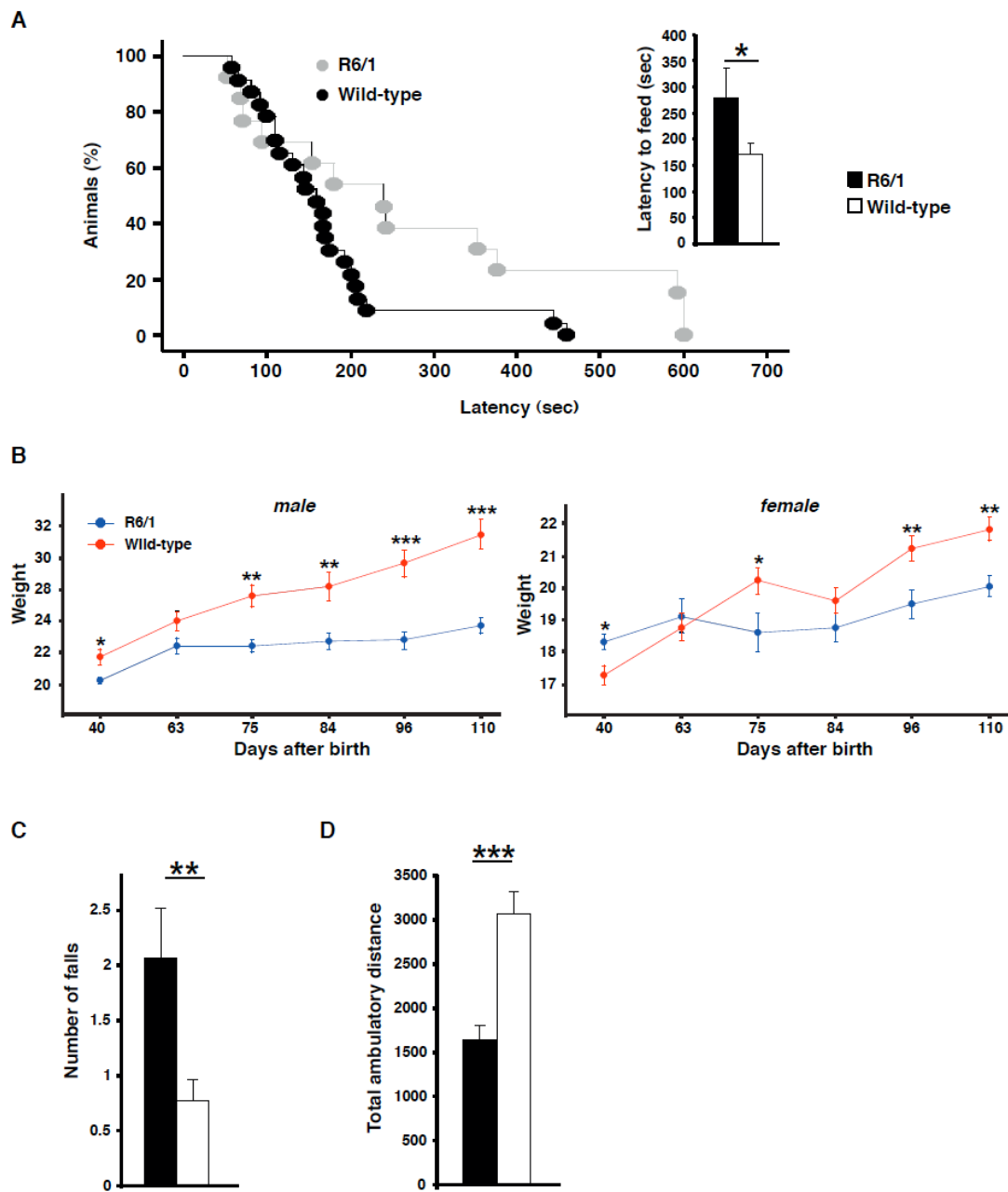


Figure 1. R6/1 mice display an anxious/depressive-like behavior, a reduced body weight and motor defects. (A) Novelty Suppressed Feeding paradigm. The anxious/depressed-like phenotype of each group of mice is measured as the latency to feed. (B) Body weight measurements of wild-type and R6/1 mice. Measurements for males and females are shown. (C) Number of falls in the rotarod during a 3 min session. (D) Open Field test. The locomotor activity is measured as the total ambulatory distance during a 30 minutes session. All graphs NS = not significant, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$.

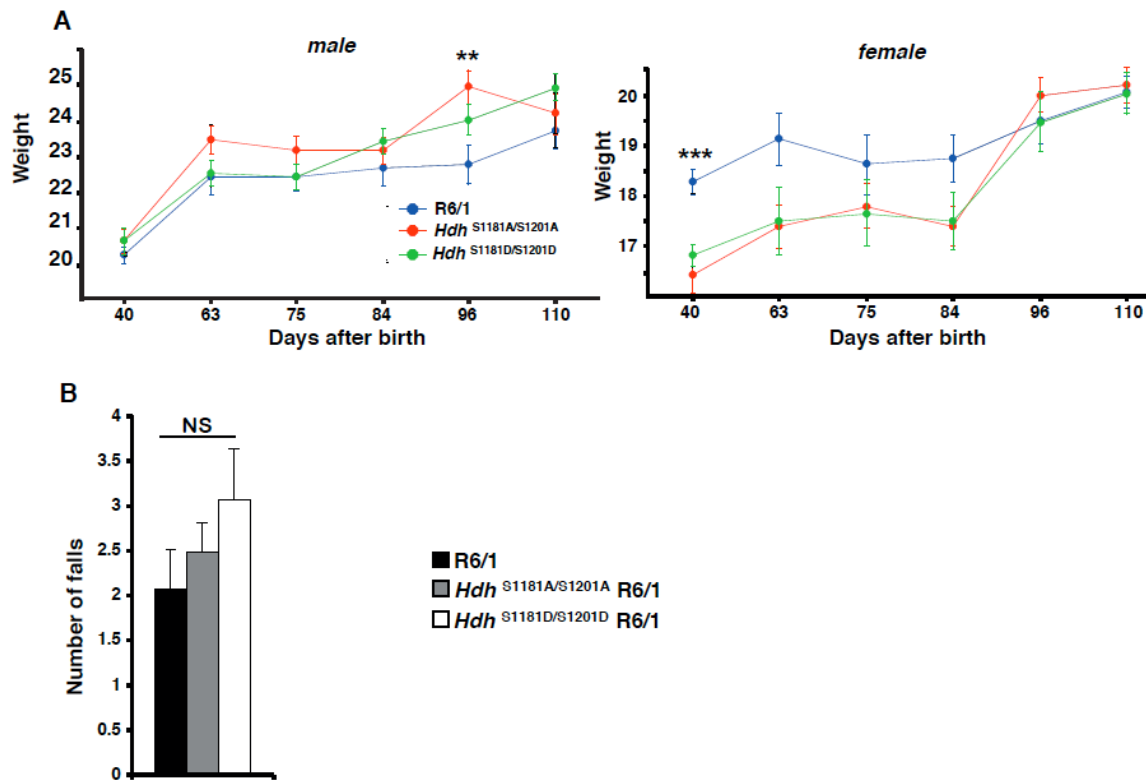


Figure 2. Ablating or mimicking phosphorylation at S1181/1201 does not ameliorate neither motor phenotype nor body weight of R6/1 Mice. (A) Body weight measurements of R6/1, *Hdh*^{S1181A/S1201A}-R6/1 and *Hdh*^{S1181D/1201D}-R6/1 mice. Measurements for males and females are shown. (B) Number of falls in a nonaccelerating rotarod during a 3 min session. All graphs NS = not significant, **P<0.01 and ***P<0.001.

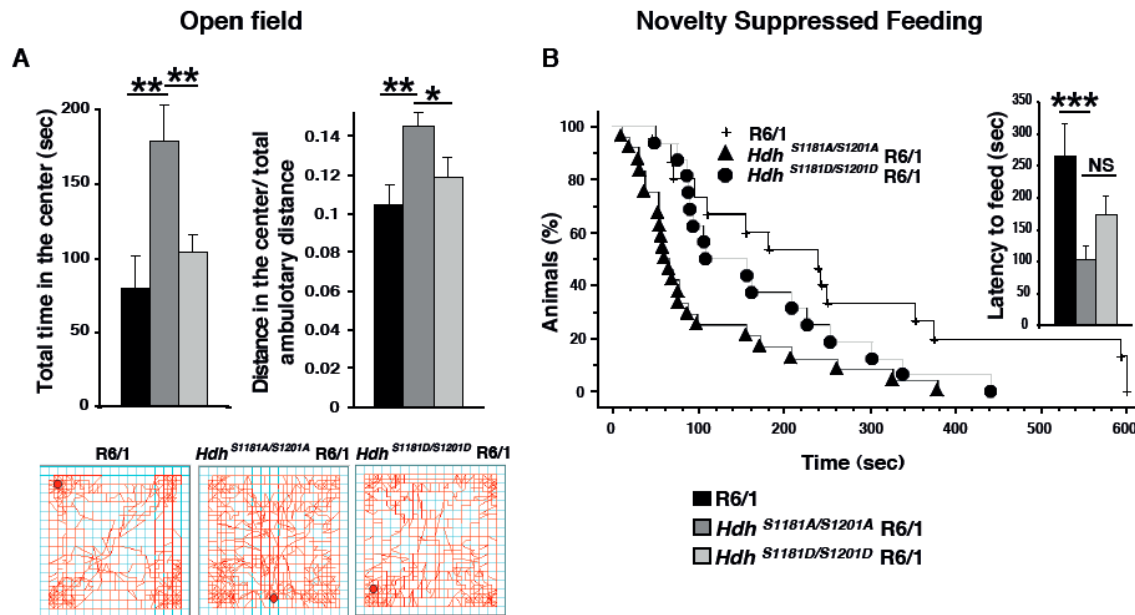


Figure 3. Phosphorylation ablation on HTT at S1181/1201 engenders an anxiolytic/antidepressant-like effect in the R6/1 mouse model of HD. (A) Anxiety is measured in the Open Field test as the mean of the total time spent in the center and the distance in the center over the total ambulatory distance. Red lines in the three squares are the representative trajectories followed by a mouse of each genotype during the session. (B) The Novelty Suppressed Feeding test, assessing the anxious/depressed-like phenotype, is measured as the latency to feed. All graphs NS = not significant, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$.

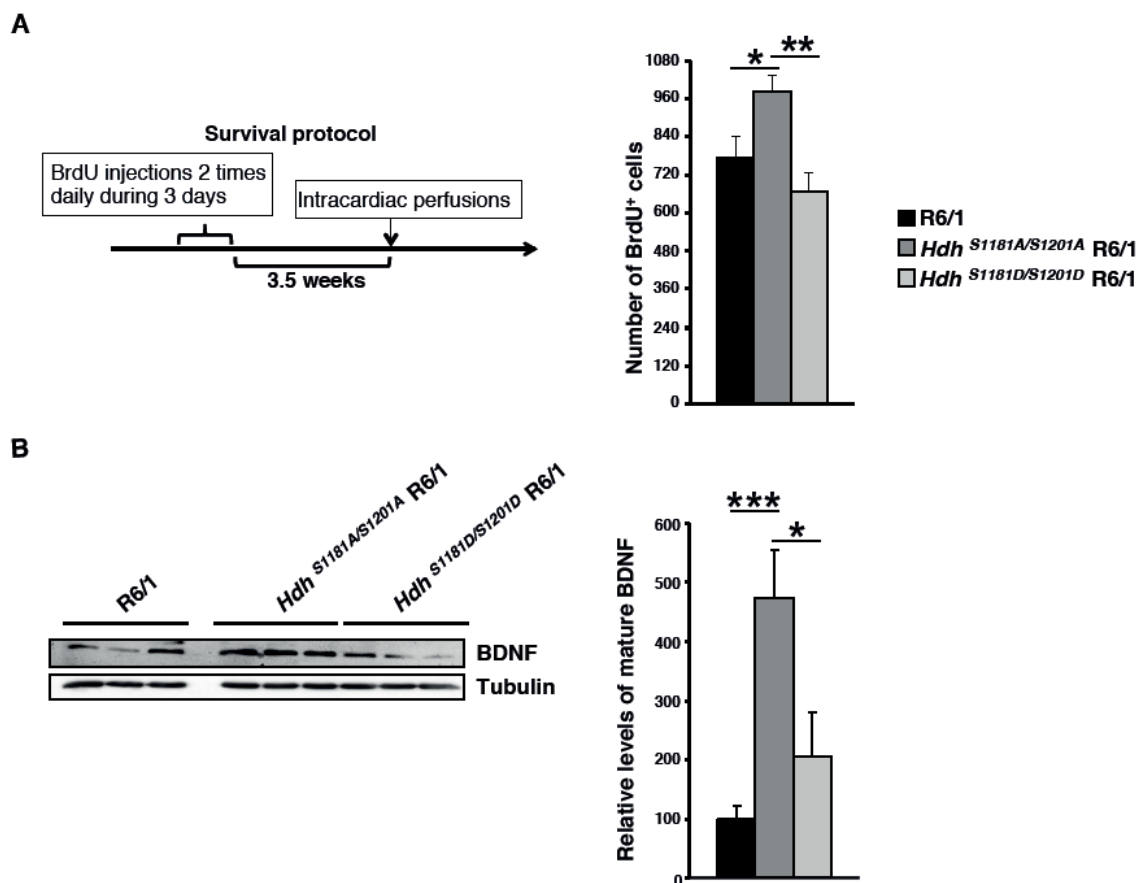


Figure 4. Ablation of phosphorylation on HTT at S1181/1201 increases the survival of newly generated cells in the dentate gyrus of the hippocampus and BDNF protein levels in hippocampal extracts of the R6/1 mice. (A) Protocol used to measure neuronal survival and quantification. BrdU was injected twice daily during three days and the mice were sacrificed three weeks later to assess the survival of newly generated cells in the dentate gyrus of the hippocampus. Results are presented as the mean number of BrdU positive cells in the dentate gyrus. (B) Immunoblots to analyse the presence of BDNF. The graph represents the ratio of mature BDNF to tubulin. Values refer to band densities. All graphs * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

3.3. Discussion

Dans cette étude, nous avons montré que l'ablation génétique des phosphorylations de la HTT améliore le phénotype anxio-dépressif des souris R6/1 modélisant la maladie de Huntington. L'analyse de la survie des nouveaux neurones dans le gyrus denté de l'hippocampe indique que cet effet anxiolytique/antidépresseur est corrélé à une amélioration de la neurogenèse dans les souris *Hdh*^{S1181A/S1201A}-R6/1. L'élévation des niveaux protéiques de BDNF est également associée à cet effet de type anxiolytique/antidépresseur.

Les males et femelles R6/1 ont le même phénotype anxio-dépressif dans les tests du NSF et de l'OF. Ces résultats sont différents d'une publication précédente qui avait identifié une réponse dépressive dans le NSF uniquement chez les femelles (Pang et al. 2009). Cette divergence pourrait s'expliquer par des différences dans la méthodologie employée pour le NSF et la nature du fond génétique des souris utilisées. Dans notre protocole de NSF (David *et al.* 2009), la période de déprivation de nourriture avant le test dure 24 heures, tandis qu'elle est de 48 heures, intercalée de 2 heures d'alimentation au milieu de la période, dans le protocole de Pang *et al.* (2009). Le paramètre mesuré dans le NSF dépendant de la faim et du caractère anxiogène de la cage de test, la réponse comportementale peut différer si la période de déprivation varie de façon importante. La nature du fond génétique pourrait également contribuer à expliquer ces résultats différents. En effet, dans notre étude, les souris sont sur un fond génétique C57/Bl6 tandis que dans l'étude de Pang *et al.* (2009), elles sont maintenues sur un mélange de première génération entre C57/Bl6 et CBA. La nature du fond génétique influe considérablement sur le phénotype comportemental (Griebel *et al.* 2000; Voikar *et al.* 2001; Rodgers *et al.* 2002; Tang and Sanford 2005; An *et al.* 2011). Par ailleurs, le fond génétique peut influencer le comportement induit par une mutation génétique (Pietropaolo *et al.* 2011; Zambello *et al.* 2011).

Chez les patients HD, aucune étude n'a mis en évidence de différences liées au sexe pour la prévalence de la dépression. Les modèles murins de la MH ont des phénotypes dépressifs qui sont dépendants du sexe pour les R6/1, les R6/2 et les souris Knock-In avec 111 ou 140 glutamines (Hickey *et al.* 2005; Dorner *et al.* 2007; Pang *et al.* 2009) Orvoen et al. 2012) tandis que les souris modèles YAC128 présentent le même

phénotype dépressif quel que soit le genre (Pouladi et al. 2009). A nouveau, le fond génétique pourrait contribuer aux différences observées. Des études complémentaires sont requises pour déterminer si les différences de phénotypes dépressifs liées au sexe dans ces modèles murins relèvent d'une caractéristique de la maladie de Huntington.

Nous avons montré que l'ablation des phosphorylations de la HTT sur les S1181/1201 produit un effet de type anxiolytique/antidépresseur sur le comportement murin (Ben M'Barek *et al.* article 1). En particulier, l'effet observé dans le NSF dépend spécifiquement de la neurogenèse hippocampique. Cet effet anxiolytique/antidépresseur est suffisant pour améliorer le phénotype dépressif des souris R6/1, la survie des nouveaux neurones dans l'hippocampe et les niveaux de BDNF dans cette même structure. L'effet anxiolytique/antidépresseur sur le modèle R6/1 est également retrouvé avec des traitements antidépresseurs tels que les inhibiteurs spécifiques de la recapture de la sérotonine (SSRI : fluoxétine ou sertaline) mais pas avec des antidépresseurs de type tricyclique (désipramine) (Pang et al. 2009; Grote *et al.* 2005). Les antidépresseurs SSRI augmentent la disponibilité de la sérotonine à la synapse mais stimulent également efficacement la neurogenèse (Peng *et al.* 2008; David *et al.* 2009; Samuels and Hen 2011). De plus, la neurogenèse est requise dans certains tests comme le NSF pour assurer une réponse antidépresseur efficace (Santarelli *et al.* 2003; David *et al.* 2009). En bon accord, chez les souris *Hdh*^{S1181A/S1201A}-R6/1 l'amélioration du phénotype dépressif est corrélée à une augmentation de la neurogenèse. Des études complémentaires permettront de déterminer si les mécanismes moléculaires mis en jeu dans la réponse aux SSRI et à l'ablation génétique des phosphorylations de la HTT présentent des similitudes.

L'expression de l'exon 1 polyQ induit des dérégulations sévères telles que la formation d'agrégats intra-nucléaires, une perte neuronale dans le cortex et le striatum, des dérégulations transcriptionnelles et des déficits cognitifs (Mangiarini *et al.* 1996; Cha 2000; Luthi-Carter *et al.* 2000; Milnerwood *et al.* 2006; Nithianantharajah *et al.* 2008; Brooks *et al.* 2012). Dans notre étude, nous avons analysé d'autres paramètres affectés dans les R6/1 comme la perte de poids et les problèmes moteurs. Ces paramètres sont observés chez les patients atteints de la MH et sont représentatifs de l'état général de la souris (Aziz *et al.* 2008; Brooks *et al.* 2012). Nous montrons que l'ablation des phosphorylations de la HTT ne suffit pas à améliorer ces symptômes. De façon

comparable, la fluoxétine n'améliore pas le poids et les problèmes moteurs des R6/1 (Grote *et al.* 2005). Par contre, la sertaline améliore la survie, les défauts moteurs, le volume du striatum, la neurogenèse et les niveaux de BDNF dans les souris R6/2 (Peng *et al.* 2008). Cependant, cet antidépresseur ne réduit pas les agrégats dans ce modèle. Des études complémentaires sont nécessaires pour déterminer si l'ablation des phosphorylations module d'autres aspects de la MH comme la clairance des agrégats et l'atrophie striatale dans le modèle R6/1.

4. Les phosphorylations de la huntingtine sur les sérines 1181 et 1201 sont impliquées dans la neurogenèse corticale embryonnaire

4.1. Introduction

Bien que des niches de neurogenèse subsistent dans le cerveau adulte, l'essentiel de la neurogenèse se produit au cours du développement embryonnaire. Au début de la neurogenèse corticale, les cellules neuroépithéliales (NESCs) prolifèrent en se divisant symétriquement, amplifiant le pool de cellules souches et progéniteurs nerveux (NSPCs) (Kosodo and Huttner 2009). Avec le début de la neurogenèse, les NESCs se convertissent en cellules de la glie radiaire CGRs en exprimant des marqueurs gliaux. Les CGRs, ayant des propriétés de NSPCs, sont localisées au bord des ventricules latéraux du cortex en développement (Malatesta *et al.* 2008). Ces cellules se divisent asymétriquement pour produire des neurones et des progéniteurs intermédiaires et symétriquement pour amplifier le pool de NSPCs.

La HTT, exprimée au cours du développement (Bhide *et al.* 1996), joue un rôle crucial dans la formation du cortex. En effet, des souris chimères ont été générées par l'injection de cellules souches embryonnaires dépourvues de HTT dans des blastocytes normaux. L'analyse de leurs cerveaux a révélé que l'inactivation de la HTT ne permet pas de former suffisamment de neurones matures dans le télencéphale et le thalamus (Reiner *et al.* 2001). Nous avons également montré que la HTT est impliquée dans l'orientation du plan de clivage des cellules progénitrices qui se divisent au bord des ventricules latéraux au cours de la formation du cortex embryonnaire (Godin *et al.* 2010). L'inactivation de la HTT dans les NSPCs entraîne une production anormale de neurones due à une augmentation des divisions asymétriques (Godin *et al.* 2010). Enfin, la HTT est impliquée dans la survie et la migration radiaire dans le cortex en développement (Tong *et al.* 2011). En effet, l'inactivation de la HTT par une approche shRNA perturbe la migration des neuroblastes et affecte la survie par une apoptose dépendante des caspases (Tong *et al.* 2011).

Les fonctions de la HTT sont modulées par de nombreuses modifications post-traductionnelles dont les phosphorylations (Ehrnhoefer *et al.* 2011). Par exemple, la

phosphorylation en sérine 421 module la toxicité de la mutation polyQ et le transport axonal du brain-derived neurotrophic factor (BDNF) (Humbert *et al.* 2002; Zala *et al.* 2008; Colin *et al.* 2008). La phosphorylation de la sérine 434 interfère avec le clivage de la HTT (Luo *et al.* 2005) et celles des sérines 13 et 16 modulent la dégradation de la HTT (Thompson *et al.* 2009).

La HTT est également phosphorylée par la cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) sur les sérines 1181 et 1201 (Anne *et al.* 2007). Nous avons précédemment montré l'implication de la HTT non pathogène dans la neurogenèse post-natale hippocampique et mis en lumière le rôle de ces phosphorylations dans la maturation et la survie des neurones nouvellement générés dans le gyrus denté de l'hippocampe (Ben M'Barek *et al.* article 1). Dans la continuité de ce travail, nous avons exploré ici le rôle de ces phosphorylations au cours de la formation du cortex embryonnaire. Nous avons utilisé le modèle de souris Knock In où les sérines en position 1181 et 1201 de la HTT sont mutées en alanines (HTT non phosphorylable; *Hdh*^{S1181A/S1201A}) ou en acide aspartique (HTT phospho-mimétique; *Hdh*^{S1181D/S1201D}). Au stade embryonnaire E14.5, dans les souris *Hdh*^{S1181A/S1201A}, nous avons observé une élévation du nombre de divisions asymétriques des cellules progénitrices se divisant au bord des ventricules latéraux du cortex embryonnaire. Ces divisions asymétriques sont corrélées à une altération du nombre de neurones produits à E14.5 qui survivent jusqu'au stade E18.5. Enfin, la migration radiaire des neuroblastes est ralentie par l'absence de phosphorylations de la HTT. Collectivement, ces résultats indiquent que la HTT est impliquée dans plusieurs étapes du développement cortical embryonnaire.

4.2. Résultats

Huntingtin Phosphorylations at serines 1181 and 1201 regulates mammalian embryonic neurogenesis.

Huntingtin is phosphorylated during embryonic neurogenesis *in vivo* at serines 1181 and 1201

We evaluated the levels of HTT phosphorylations at serines 1181 and 1201 in whole brain hemisphere lysates collected from wild-type embryos at E14.5 and E16.5, and in cortical lysates at E18.5. We immunoprecipitated HTT and assessed HTT phosphorylation status by immunoblotting. We used two phosphorylation state-specific polyclonal antibodies, which specifically recognize phosphorylated serines 1181 and 1201, respectively anti-P-HTT-S1181 and anti-P-HTT-S1201 antibodies (Anne *et al.* 2007). HTT was phosphorylated at serines 1181 and 1201 at all embryonic stages analysed (**Figure 1**).

The cortical neuronal population is decreased at E14.5 in *Hdh*^{S1181A/S1201A} embryos

As huntingtin is phosphorylated during embryonic neurogenesis, we investigated the physiological importance of these phosphorylations by analyzing knock-in mice with point mutations at serines 1181 and 1201 on endogenous HTT. In these models, serines were mutated into alanines mimicking an unphosphorylatable HTT (*Hdh*^{S1181A/S1201A}) or into aspartic acids mimicking constitutive phosphorylations at these sites (*Hdh*^{S1181D/S1201D}) (Anne *et al.* 2007; Ben M'Barek *et al.* article 1).

Hemisphere volumes of E14.5 embryos were estimated using the Cavalieri's principle on brain slices (Gulacsi and Anderson 2008; Murray *et al.* 2008; Peng *et al.* 2008). *Hdh*^{S1181A/S1201A} mice displayed a reduced rostro-caudal length (*p < 0.05) and hemisphere volume (*p < 0.05) compared to wild-type embryos (**Figure 2A, 2B**). We also measured the cortical thickness from the ventricular zone to the pial surface on brain slices stained with DAPI counterstaining. We identified a decreased cortical thickness, when comparing *Hdh*^{S1181A/S1201A} to wild-type mice (**Figure 2C**; * p < 0.05).

We next labeled neurons expressing the microtubule-associated protein 2 (MAP2) in order to identify whether the neuronal population was affected at this stage

(Dave *et al.* 2011). We found that *Hdh*^{S1181A/S1201A} mice had a reduced number of MAP2 positive neurons (**Figure 2D, 2E**; **p < 0.01).

These results indicate that ablation of HTT phosphorylations interfere with normal cortical development, reducing the number of neurons at E14.5.

Increased number of asymmetric divisions at E14.5 stage of cortical NSPCs in *Hdh*^{S1181A/S1201A} brains

We previously described a role for HTT during mitosis and fate determination of cortical NSPCs *in vivo* (Godin *et al.* 2010). We thus wondered whether phosphorylations at serines 1181 and 1201 could modulate these functions. We analyzed the mitotic cleavage plan of dividing cortical NSPCs from E14.5 mouse embryos by measuring the angle between a line segregating the daughter chromosomes and the surface of the VZ, also named apical surface (**Figure 3B**) (Godin *et al.* 2010). We classified the dividing progenitors into three groups according to the orientation of the cleavage plane to the apical surface: vertical (60°-90°), horizontal (0°-30°) and intermediate (30°-60°) (Feng and Walsh 2004; Silver *et al.* 2010). As expected most of the progenitors divided with vertical cleavage planes. In E14.5 *Hdh*^{S1181A/S1201A} embryos, we observed an increased in the number of NSPCs undergoing asymmetric divisions as compared to wild-type conditions (**Figure 3A**; **p < 0.01). Symmetric and intermediate divisions of NSPCs were not significantly altered by the ablation of phosphorylations in HTT.

This defect in asymmetric cell division was not associated to a defect in the proliferation of NSCPs. Indeed, we labeled S-phase E14.5 cycling progenitors with the 5-bromo-deoxyuridine (BrdU) analogue of thymidine (Gulacsi and Anderson 2008). The number of BrdU positive cells in *Hdh*^{S1181A/S1201A} cortices was similar to that of wild-type cortices, indicating that ablation of HTT phosphorylations did not affect the proliferation of NSPCs (**Figure 4A, 4B**; p = 0.6773).

Cell fate alteration induced by ablation of HTT phosphorylation

Orientation of the NSPC mitotic cleavage plan was associated with fate determination of daughter cells for several proteins including HTT (Feng and Walsh 2004; Yingling *et al.* 2008; Godin *et al.* 2010; Silver *et al.* 2010). According to this model, asymmetric divisions lead to the production of a neuron or an intermediate progenitor and an NSPC (**Figure 3C**), while symmetric divisions of apical progenitors amplify the

pool of NSPCs. In order to investigate cell fate of the cortical NSPCs, we performed BrdU birth dating experiments (Fan *et al.* 2008). We performed intraperitoneal injections of BrdU at E14.5. Brains were analyzed by immunohistochemistry using antibodies against BrdU and T-box brain 1 protein, Tbr1 at E18.5. Tbr1 is specifically expressed in glutamatergic neurons of the first cortical layer generated in the neocortex (layer VI) (Hevner *et al.* 2001; Tuoc *et al.* 2009). We found an increased number of BrdU- and Tbr1-positive neurons in the total population of Tbr1-positive neurons at E18.5 when comparing *Hdh*^{S1181A/S1201A} to wild-type (**p < 0.01; **Figure 5A, 5B**).

We also analyzed the number of intermediate progenitors labeled with Tbr2 (also known as Eomes)(Kawaguchi *et al.* 2008; Sessa *et al.* 2008) and found no differences between genotypes (p=0.8811; **Figure 5C**).

These results indicate that the presence of an unphosphorylatable HTT in NSPCs at E14.5, induces a specific increased production of Tbr1-positive neurons as compared to wild-type situation.

Migration defects of *Hdh*^{S1181A/S1201A} neuroblasts

Huntingtin was recently described to be involved in the radial migration of neuroblasts (Tong *et al.* 2011). We performed intraperitoneal injections of BrdU at E14.5 and analyzed brains at E18.5 by immunohistochemistry using an anti-BrdU antibody at E18.5. To analyse specifically the migration behavior of BrdU labeled cells, we quantified the distribution of these cells on the cortical plate (CP). We divided the CP in 10 equal bins (**Figure 6A**)(Feng and Walsh 2004; McCarthy *et al.* 2011) and counted the number of BrdU-positive cells in each bin. We expressed the results as a ratio over the total number of BrdU cells to avoid the bias induced by a different number of BrdU positive cells between genotype. BrdU-positive cells produced at E14.5 and reaching the cortical plate at E18.5 were differentially distributed according to the mouse lines (**Figure 6B**). Indeed, there was less BrdU-positive cells in superficial layers of *Hdh*^{S1181A/S1201A} cortices as shown in bin 9 when compared to wild-type cortices (* p < 0.05). In contrast, the proportion of in BrdU-positive cells in deeper layers of the *Hdh*^{S1181A/S1201A} CP was higher than in the CP of wild-type mice (see for instance bin 5, ** p < 0.01).

Thus, the presence of an unphosphorylatable HTT at S1181/1201 reduces the migration properties of neuroblasts *in vivo*.

Experimental procedures

Animals

Knock-In mice *Hdh*^{S1181A/S1201A} and *Hdh*^{S1181D/1201D} were described in Ben M'Barek *et al.* (article 1). Mice were kept in 12/12 hours of light/dark cycle on plastic cages, and allowed to eat and drink *ad libitum*. Embryos were generated from heterozygous crosses. Mice were crossed overnight and the day after at noon was considered as E0.5. Wild-type and homozygous mutant mice were used for this study.

BrdU injection

BrdU (100mg/kg) was injected at E14.5 intra-peritoneally. Mice were sacrificed and embryos collected either 1-hour after the injection to assess the proliferation or at E18.5 to analyze the cell fate of labeled cells.

Immunoblotting, immunoprecipitation

Mice were sacrificed by cervical dislocation. Embryos were collected and washed with PBS. Hemispheres or cortices were removed and lysed in 50mM Tris HCl, 2mM EGTA, 10mM Beta-mercaptoethanol 0.1% (v/v), 10 µg/mL aprotinine, 10 µg/mL leupeptine, 1mM sodium orthovanadate. Protein G-Sepharose beads (Sigma) were incubated overnight with huntingtin antibodies (4C8, Trottier *et al.* 1995). Then, beads conjugated to 4C8 were incubated during 5-hours with hemispheres or cortices lysates. Immunoblots were done after washing. Primary antibodies used were anti-huntingtin (4C8, Trottier *et al.* 1995 ; D7F7 (Cell Signaling), P-HTT-S1201 and P-HTT-S1181, described in Anne *et al.* 2007); Cdk5 (Santa Cruz biotechnology); anti-alpha-tubulin (clone DM1A, Sigma). HRP-conjugated goat anti-mouse and anti-rabbit secondary antibodies were purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratories.

Immunohistochemistry

At the embryonic stage of interest, embryos were collected from pregnant mice, decapitated and heads were placed overnight at 4°C in 4% paraformaldehyde. Heads were then dehydrated through a series of increasing ethanol concentrations. Heads

were placed 1-hour on a solution of paraffin and ethanol (1:1) then overnight at 61°C. Paraffin blocks were sectioned at 5µm. Serial sections were made, each one covering the whole telencephalons. Slices were treated for antigen retrieval with 10 mM citrate buffer (pH6) in a microwave at 800W. Immunofluorescence was carried out by blocking in PBS-0.1% Triton X100-10% goat serum. Primary antibodies used in this study were against MAP2, BrdU (AbD Serotec), Tbr1 (Abcam), Tbr2 (Abcam) and huntingtin (4C8, Trottier *et al.* 1995). Secondary antibodies were anti-rabbit AlexaFluor-488 and AlexaFluor-555, anti-rat AlexaFluor-647 and anti-mouse AlexaFluor-488 and AlexaFluor-555 (Molecular Probes). Cells were counterstained with DAPI. Acquisition of images was performed with a confocal Leica SP5 microscope.

For volumetric analysis, 1 section was taken every 30 µm. On average, 60 sections were analysed per brain. Volumetric analysis was performed according to the Cavalieri's principle as already described (Gulacsi and Anderson 2008; Murray *et al.* 2008; Peng *et al.* 2008).

Statistical Analyses. Statview 4.5 software (SAS Institute Inc., Cary, NC) was used for statistical analysis. Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M.

Complete statistical analyses:

Figure 2A

Number of individuals: WT= 6 and *Hdh*^{S1181A/S1201A} = 6.
Student t-test $t[10]=2.564$; * $p < 0.05$.

Figure 2B

Number of individuals: WT= 6 and *Hdh*^{S1181A/S1201A} = 6.
Student t-test $t[10]=2.576$; * $p < 0.05$.

Figure 2C

Number of individuals: WT= 6 and *Hdh*^{S1181A/S1201A} = 6.
Student t-test $t[10]=2.303$; * $p < 0.05$.

Figure 2D

Number of individuals: WT= 6 and *Hdh*^{S1181A/S1201A} = 6.
Student t-test $t[10]=2.278$; * $p < 0.05$.

Figure 3A

Number of individuals: WT= 3 and *Hdh*^{S1181A/S1201A} = 4. Between 38 and 133 mitotic progenitors analyzed per brain.

Angle 0/30° : Student t-test $t[5]=-4.453$; ** $p < 0.01$.

Angle 30/60° : Student t-test $t[5]=-0.345$; $p=0.7439$.

Angle 60/90° : Student t-test $t[5]=1.286$; $p=0.2547$.

Figure 4A

Number of individuals: WT= 3 and $Hdh^{S1181A/S1201A} = 4$.

Student t-test $t[5]=0.441$; $p= 0.6773$.

Figure 5B

Number of individuals: WT= 8 and $Hdh^{S1181A/S1201A} = 4$.

Student t-test $t[10]=3.267$; $p= 0.0085$; $**p<0.01$.

Figure 5C

Number of individuals: WT= 3 and $Hdh^{S1181A/S1201A} = 4$.

Student t-test $t[5]=-0.157$; $p=0.8811$.

Figure 6B

Number of individuals: WT= 8 and $Hdh^{S1181A/S1201A} = 4$.

Bin 1: Student t-test $t[10]=0.713$; $p=0.4921$.

Bin 2: Student t-test $t[10]=-2.181$; $p=0.0542$.

Bin 3: Student t-test $t[10]=0.257$; $p=0.8026$.

Bin 4: Student t-test $t[10]=-0.336$; $p=0.7442$.

Bin 5, Student t-test $t[10]=-3.627$; $p=0.0046$; $** p < 0.01$.

Bin 6: Student t-test $t[10]=-0.866$; $p=0.4069$.

Bin 7: Student t-test $t[10]=-1.273$; $p=0.2317$.

Bin 8: Student t-test $t[10]=0.094$; $p=0.9266$.

Bin 9: Student t-test $t[10]=2.901$; $p=0.0158$; $* p < 0.05$.

Bin 10: Student t-test $t[10]=1.051$; $p=0.3180$.

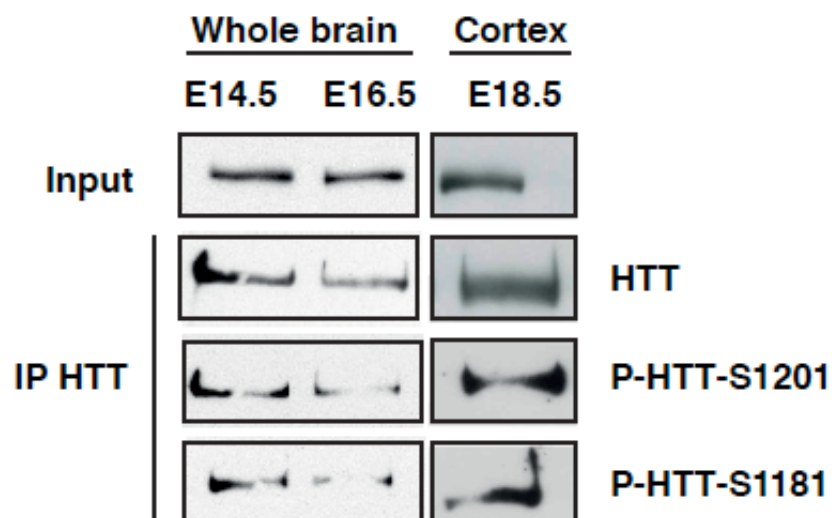


Figure 1. Huntingtin is phosphorylated at serines 1181 and 1201 *in vivo* in the telencephalon of E14.5 and E16.5 embryos and in the cortex of E18.5 embryos. HTT immunoprecipitates (IP) of whole brain (E14.5 and E16.5) and cortical extracts were immunoblotted with antibodies directed against HTT (4C8) and its phosphorylations at serines 1181 and 1201, respectively P-HTT-S1181 and P-HTT-S1201.

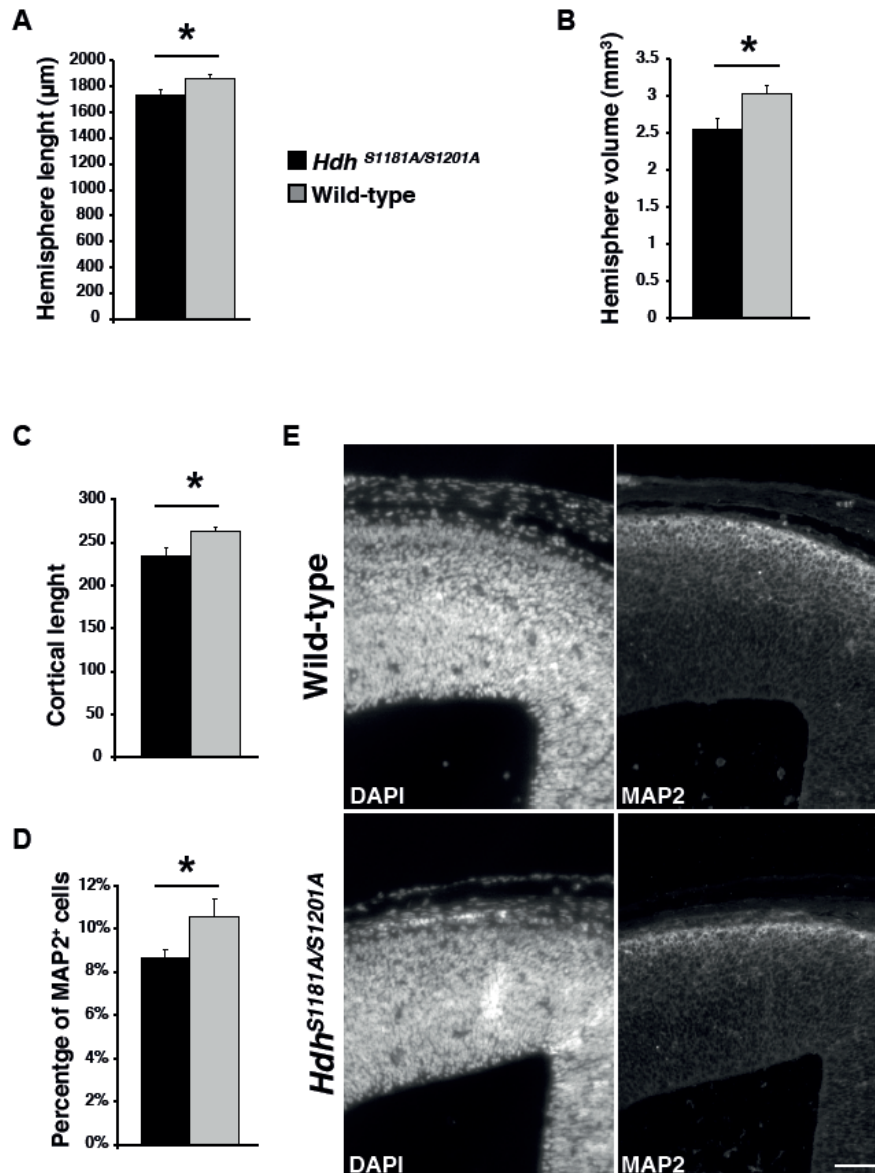


Figure 2. Loss of phosphorylation in huntingtin reduces the telencephalon size and the cortical length at E14.5 stage. (A) The hemisphere length and (B) volume was smaller in *Hdh*^{S1181A/S1201A} compared to wild-type. Approximately 60 sections per embryo were used for this analysis. (C) The cortical length was calculated from the mean of three slices per embryo and is expressed in μm . (D) The percentage of MAP2 positive neurons was calculated by counting the number of MAP2 positive cells and normalized to the total number DAPI positive cells on a delimited cortical area. Six embryos per genotype from 4 different litters of heterozygous crosses were analysed. (E) Images of the neocortical wall of wild-type and *Hdh*^{S1181A/S1201A} embryos stained for MAP2. Scale bar= 50 μm . All graphs * $P < 0.05$.

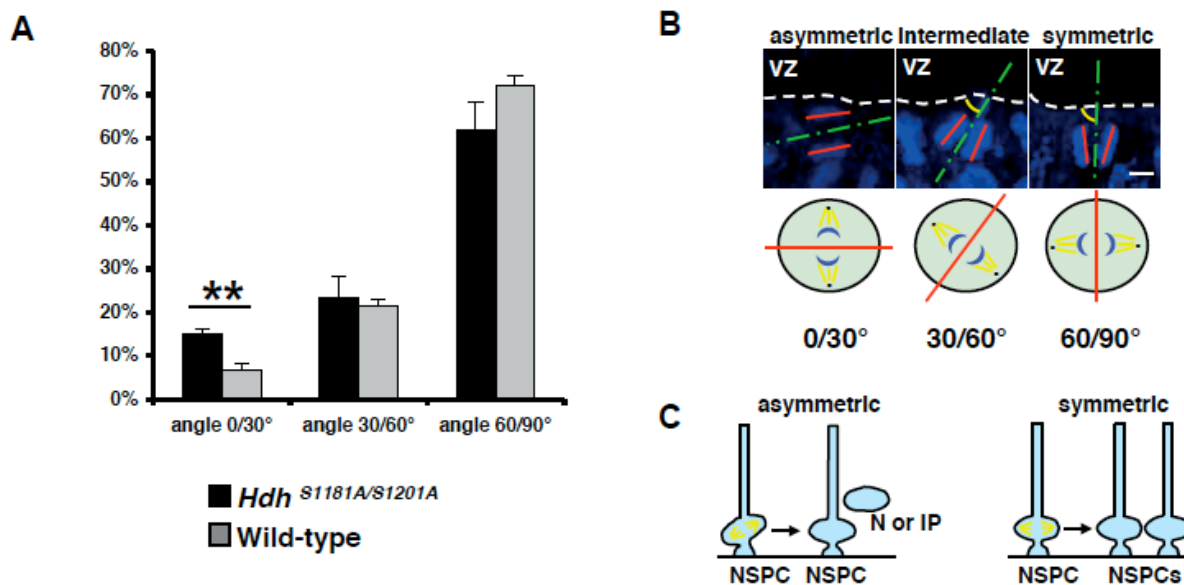


Figure 3. The orientation of the cleavage plan of mitotic cells near the ventricular lumen is altered by the genetic phospho-ablation of huntingtin. (A) Quantification of the angle of the cleavage plane of NSPCs in wild-type and *Hdh*^{S1181A/S1201A} embryos. (B) Illustration of the method used to measure the angle of the cleavage plane. The cleavage plane is predicted by a dashed green line segregating the sister chromosomes. The angle of this line formed with the surface of the ventricular zone is measured. Angles were classified into 3 groups: 0/30°, 30/60° and 60/90°. (C) Scheme illustrating the model of symmetric and asymmetric division. An asymmetric division produces another NSPC and a neuron or an intermediate progenitor. A symmetric division leads to the generation of 2 NSPCs. Scale bar= 5µm. VZ= ventricular zone; N= neuron; IP= intermediate progenitor; NSPC= neural stem and progenitor cells. All graphs **P<0.01.

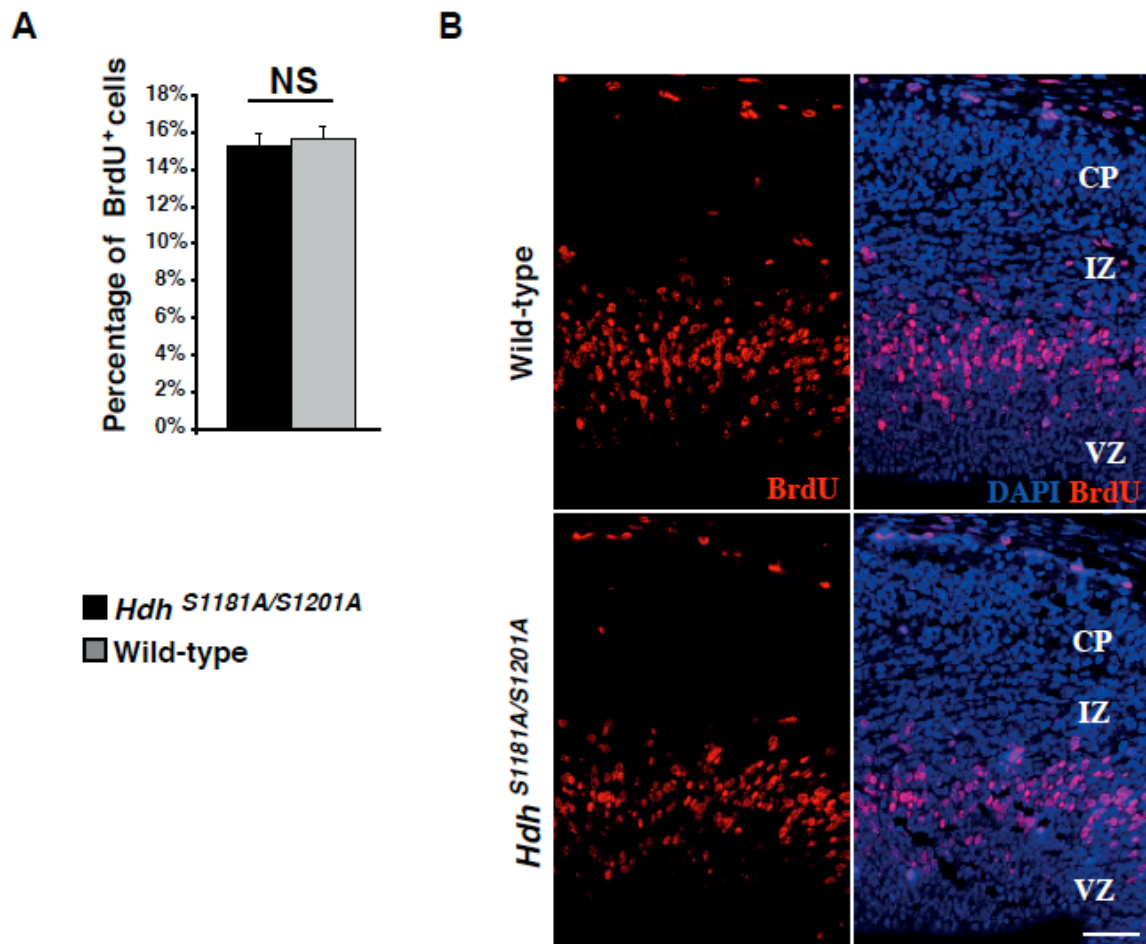


Figure 4. The proliferative population, labelled with 1h BrdU uptake before fixation, is not affected by the loss of phosphorylations on huntingtin. (A) Quantification of the percentage of BrdU positive cells after 1h BrdU pulse. (B) Illustration of the BrdU staining on the neocortical wall of wild-type and *Hdh*^{S1181A/S1201A}. Scale bar= 50µm. CP=cortical plate; IZ=intermediate zone and VZ=ventricular zone. NS = not significant.

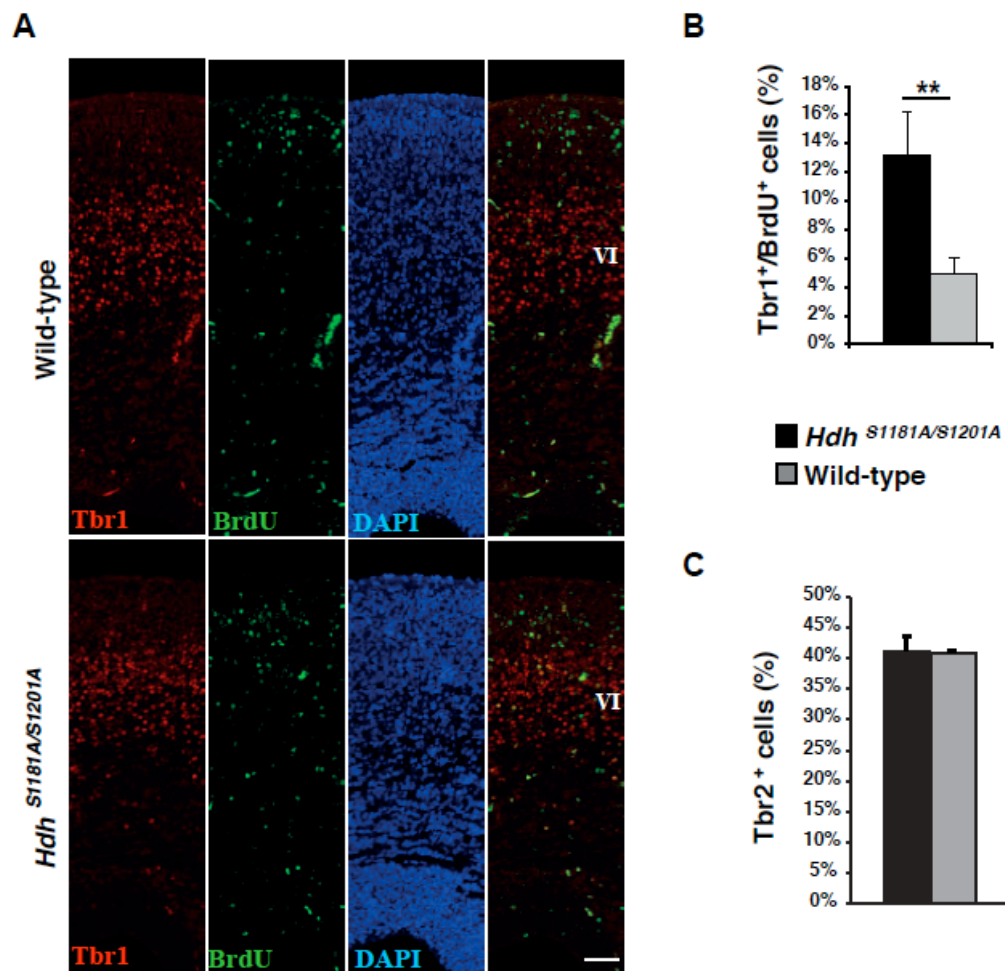


Figure 5. The layering of the neocortex is perturbed in *Hdh*^{S1181A/S1201A} brains. (A) The neocortical wall at E14.5 is stained for Tbr1 (red), BrdU (green) and counterstained for DAPI (blue). BrdU positive neurons were labeled at E14.5. The number of BrdU positive cells is counted in the layer VI of the neocortex, identified by the Tbr1 labeling. (B) The graph illustrates the percentage of BrdU and Tbr1 double-positive cells in the Tbr1 cell population. The number of *Hdh*^{S1181A/S1201A} double-positive neurons is increased compared to wild-type. (C) Intermediate progenitors were identified by a Tbr2 staining in the neocortical wall of E14.5 embryos. The graph represents the percentage of Tbr2 positive cells among the total number of cells counterstained with DAPI. The percentage of Tbr2 positive cells is similar in wild-type and *Hdh*^{S1181A/S1201A}. Scale bar= 50μm. All graphs **P<0.01.

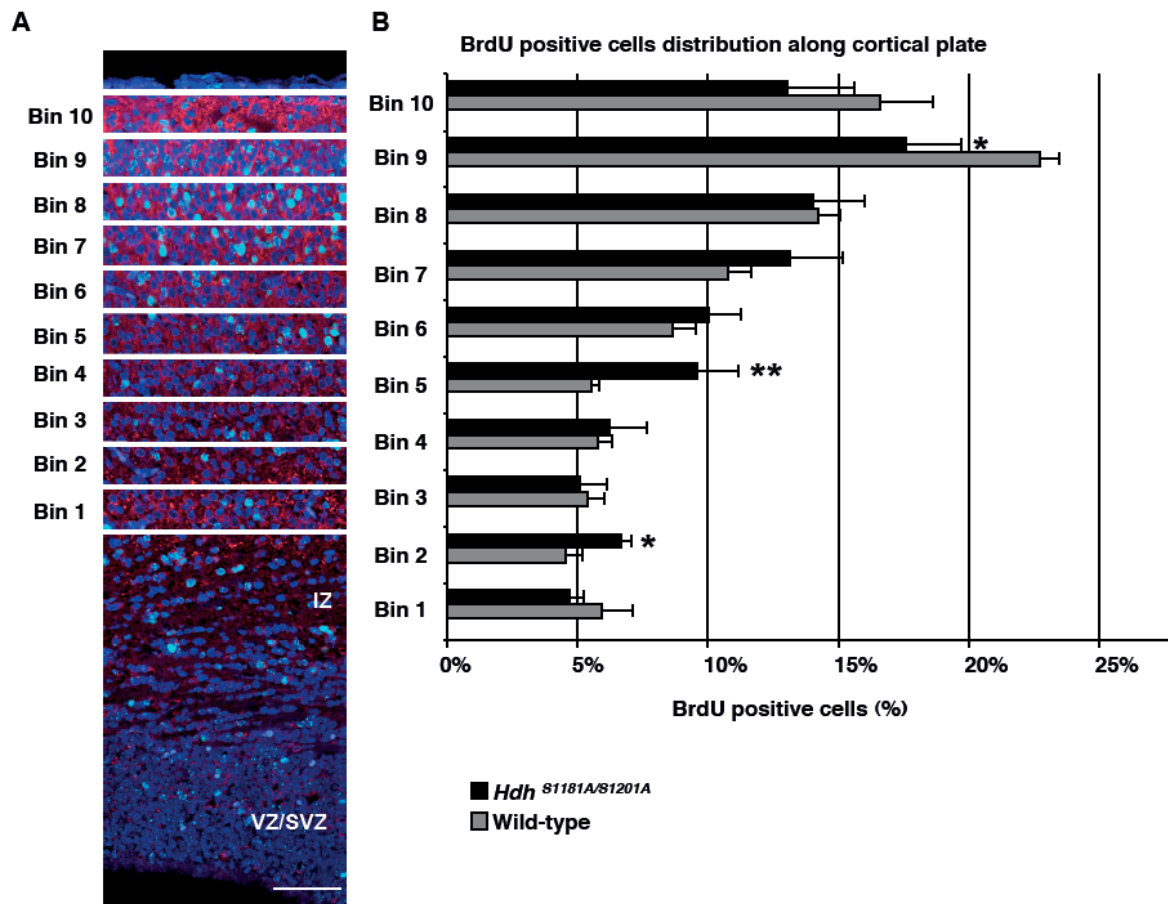


Figure 6. Slower neuronal migration of E14.5 generated post-mitotic neurons in *Hdh*^{S1181A/S1201A} brains. BrdU was injected in E14.5 timed pregnant mice to label S-phase neuronal progenitors. Embryos were collected at E18.5 and neurons labeled with BrdU were analyzed for their radial position in the cortical plate. (A) Representative image of the neocortical wall. The cortical plate is stained with MAP2 (red). A grid with 10 equal bins is adjusted to each MAP2 positive cortical wall. BrdU positive neurons (green) are counted in each one of the 10 bins. (B) The graph represents the distribution of the BrdU positive neurons in each bin. Slower migration of *Hdh*^{S1181A/S1201A} neurons is observed when compared to wild-type. Scale bar= 50μm. IZ= intermediate zone ; VZ/SVZ= ventricular zone/ sub-ventricular zone. All graphs *P<0.05; **P<0.01.

4.3. Discussion

Au cours de cette étude, nous avons montré que l'ablation génétique des phosphorylations de la HTT perturbe le développement normal du cortex embryonnaire. L'absence de phosphorylations sur la HTT réduit le volume du cortex, modifie l'orientation du plan de clivage des NSPCs en division et la production de neurones. Les processus migratoires sont également perturbés par l'ablation des phosphorylations. Cette étude doit être complétée par l'analyse des embryons *Hdh*^{S1181D/S1201D} qui expriment une forme phospho-mimétique de la HTT. Il reste également différents points à éclaircir pour comprendre le rôle des phosphorylations de la HTT sur le développement du cortex embryonnaire.

Statut des cellules neuroépithéliales

J'ai observé un effet de l'ablation de la HTT sur le volume des hémisphères et l'épaisseur du cortex dès le stade E14.5. Ceci indique que les fonctions des phosphorylations de la HTT sont également importantes avant ce stade. Quand les phosphorylations sont bloquées, nous observons une réduction du nombre de neurones qui expriment MAP2 et qui sont produits avant le stade E14.5. A l'inverse, au stade E14.5, les NSPCs produisent plus de neurones, colonisant la couche VI du néocortex. Ces résultats pourraient s'expliquer par une apoptose des cellules générées avant le stade E14.5 et/ou une altération du nombre de progéniteurs nerveux. Une situation comparable a été décrite quand le gène *LIS1* est inactivé (Yingling *et al.* 2008). Ce gène est responsable de l'orientation du fuseau de division en permettant l'ancrage des microtubules astraux au cortex cellulaire. En conséquence, le plan de clivage au cours de la division des NSPCs des embryons mutants pour *Lis1* est altéré, conduisant à une augmentation des divisions asymétriques et de la production de neurones des cellules de la glie radiaire. Pendant la phase d'expansion des cellules neuroépithéliales, l'augmentation du nombre de divisions asymétriques conduit à l'apoptose de la cellule fille (Yingling *et al.* 2008). Cette mort cellulaire entraîne une déplétion des cellules progénitrices avant la phase neurogénique. Il faudrait étudier l'impact des phosphorylations de la HTT dans les cellules neuroépithéliales au stade E9.5, analyser l'orientation du plan de clivage de ces cellules et déterminer la proportion de cellules apoptotiques.

Fonctions de la huntingtine phosphorylée au cours de la mitose

Au cours de cette étude, nous avons déterminé le rôle des phosphorylations dans l'orientation du plan de clivage des cellules progénitrices. Nous avons observé une augmentation du nombre de divisions asymétriques des NSCPs de souris *Hdh^{S1181A/S1201A}* (angle 0/30°). De façon intéressante, l'inactivation de la HTT conduit au même effet (Godin *et al.* 2010).

La HTT est localisée aux pôles du fuseau de division. Lorsque les niveaux protéiques de HTT sont diminués, la distribution des moteurs moléculaires (dynéine et p150^{Glued}) aux pôles du fuseau de division est perturbée (Godin *et al.* 2010). Nous avons montré que l'ablation des phosphorylations de la HTT conduit dans les neurones, à une plus forte association aux moteurs moléculaires (dynéine et p150^{Glued}). Ceci entraîne une augmentation du transport le long des microtubules. Si la HTT est plus fortement associée aux moteurs moléculaires et est également plus dynamique sur les microtubules, ceci peut également conduire à perturber la localisation de ce complexe dynéine et p150^{Glued} au cours de la mitose. Il nous faudra donc déterminer sur des modèles cellulaires si cette plus forte association aux moteurs moléculaires est généralisable aux cellules en division. Nous pourrions étudier la localisation intracellulaire de ces différentes protéines et déterminer l'influence de l'état de phosphorylation de la HTT sur les sérines 1181 et 1201.

Le rôle de la HTT dans la mitose n'est pas restreint aux NSPCs. En effet, la HTT est présente dans toutes les cellules. Ainsi, cette fonction de régulation de la mitose pourrait s'étendre au delà du contexte de la mise en place du cerveau. Il sera intéressant d'étudier le rôle de la HTT et de ses phosphorylations dans d'autres contextes cellulaires et développementaux.

La huntingtine phosphorylée et la migration radiaire

La HTT a été récemment impliquée dans la migration radiaire corticale (Tong *et al.* 2011). En effet, l'inactivation de la HTT par shRNA conduit à une diminution de la migration dans le cortex en développement. Notre étude montre que la HTT, requise pour ces processus migratoires, doit être également phosphorylée sur les sérines 1181 et 1201 pour remplir complètement cette fonction.

Quelle est la kinase impliquée ? Dans des cultures primaires de neurones, la diminution des niveaux de Cdk5 par interférence ARN ou son inhibition par approche pharmacologique, conduit à une diminution des phosphorylations aux sérines en positions 1181/1201. Cdk5 est essentielle aux processus migratoires dans le cerveau en développement. Son inactivation chez la souris conduit à des défauts sévères de migration conduisant à une inversion des couches corticales (Dhavan and Tsai 2001). La HTT pourrait ainsi contribuer au phénotype observé lors de l'inactivation de Cdk5. Pour étudier cette hypothèse, nous analyserons *in vitro*, par vidéomicroscopie en temps réel, les propriétés migratoires des NSPCs, issues des souris sauvages, *Hdh*^{S1181A/S1201A} et *Hdh*^{S1181D/S1201D}, cultivées en neurosphère et déposées sur des lamelles recouvertes de laminine. Nous étudierons en particulier l'effet de l'inactivation de Cdk5 en condition *Hdh*^{S1181D/S1201D} afin de déterminer la contribution de la HTT au phénotype migratoire dépendant de l'activité de Cdk5 (Nishimura *et al.* 2010). Les mêmes expériences pourront également être réalisées *in vivo* par électroporation *in utero* des différentes constructions de HTT et de Cdk5. Les cerveaux ainsi électroporés pourront ensuite être cultivés en coupes organotypiques pour analyser les dynamiques migratoires. Nous déterminerons ainsi si les défauts migratoires observés dépendent des propriétés propres de la cellule (intrinsèques) et/ou de défauts du microenvironnement ou de la réponse aux stimuli migratoires extérieurs.

La huntingtine phosphorylée influence le volume du cerveau

L'ablation des phosphorylations de la HTT entraîne une réduction du volume des hémisphères du cerveau des embryons au stade E14.5, des retards de migration et des anomalies du nombre de neurones. Nous déterminerons si ces défauts sont retrouvés à l'âge adulte. En effet, il faudra déterminer si les couches corticales sont correctement formées et si certaines sont plus affectées que d'autres en combinant différents marqueurs de couches et analysant la densité cellulaire dans celles-ci. L'accent sera mis en particulier sur les couches corticales affectées par la maladie de Huntington (couches III, V et VI) (Hedreen *et al.* 1991; Rosas *et al.* 2008; Thu *et al.* 2010).

Chapitre 3 – Discussion générale et Perspectives

Au cours de mon travail de thèse, l'étude des phosphorylations de la HTT en situation physiologique m'a permis de mettre en lumière de nouvelles fonctions pour cette protéine. J'ai apporté de nouveaux arguments en faveur de l'hypothèse d'anomalies neuro-développementales dans la MH. J'ai déterminé les aspects fonctionnels de ces phosphorylations à l'échelle d'une structure (l'hippocampe) et de l'individu (comportements en lien avec l'humeur). J'ai également pu émettre de nouvelles hypothèses éclaircissant l'étiologie des symptômes dépressifs des patients prodromaux. Enfin, ces résultats peuvent être utiles pour mieux comprendre la dépression en dehors du contexte de la MH, et pour la recherche de nouveaux composés antidépresseurs.

1. La huntingtine au cours du développement du cerveau

Au cours de la neurogenèse embryonnaire, la HTT régule les divisions symétriques et asymétriques et module la production de neurones. La diminution de niveaux protéiques de la HTT conduit à une orientation aléatoire du plan de clivage des cellules en division (Godin *et al.* 2010). Au cours de ma thèse, j'ai montré que la HTT pouvait moduler cette fonction par l'intermédiaire des phosphorylations en sérines 1181 et 1201 par Cdk5.

Quel est l'effet de la HTT mutante sur ces processus de neurogenèse corticale? Les résultats obtenus au laboratoire (Molina-Calavita *et al.* en préparation) indiquent que la forme polyQ de la HTT perturbe également l'orientation du plan de clivage des cellules progénitrices au bord des ventricules latéraux chez des souris knock in modélisant la MH (Wheeler *et al.* 1999). Ainsi, la HTT polyQ, qui conduit à une délocalisation des moteurs moléculaires hors des pôles du fuseau de division, produit les mêmes effets que l'inactivation de la HTT. Nous pourrions donc étudier l'effet des phosphorylations de la HTT sur les défauts d'orientation du plan de clivage en présence de HTT mutante. Ceci pourrait être réalisé avec la technique d'électroporation *in utero*. Nous pourrions exprimer des fragments de HTT mutées en alanine sur les sites 1181 et 1201, dans des embryons wild-type et des modèles murins de la maladie. Il faudrait également étudier les autres aspects de la neurogenèse tels que la migration, la survie et la maturation des neurones par cette approche.

Dans leur ensemble, mes résultats et ceux précédemment obtenus au laboratoire indiquent que la HTT est essentielle au développement du cortex embryonnaire et que sa perturbation par son inactivation ou la modification de ces phosphorylations, de même que par sa mutation pathologique, altèrent ce processus.

Une étude récente sur des patients prodromaux a montré une réduction du volume intracrânien, ce qui est révélateur d'une perturbation du développement du cerveau (Nopoulos *et al.* 2011). Une autre étude de cas d'un patient juvénile de 18 mois (entre 210 et 250 répétitions de glutamines) a également révélé une réduction du volume cérébral (Nicolas *et al.* 2011). Enfin, une dernière étude réalisée sur des enfants prodromaux (forme non juvénile de la MH) a mis en évidence une différence de taille, d'index de masse corporelle et de circonférence de la tête (qui prédit le volume du cerveau) par rapport à une population contrôle (Lee *et al.* 2012). De façon intéressante, lorsque la circonférence de la tête est normalisée à la taille, les valeurs restent significativement différentes entre enfants MH et contrôles. Ceci indique que les défauts de développement sont plus marqués dans le cerveau que dans le reste du corps (Lee *et al.* 2012). D'autres études devront être menées pour déterminer si des régions particulières sont atteintes avec des techniques d'imageries sur des enfants porteurs du gène de la MH.

Une perturbation du développement du cerveau chez les patients MH pourrait contribuer aux symptômes de la maladie à l'âge adulte. En effet, des défauts de développement et de maturation pourraient rendre plus vulnérables les neurones. En comparaison, dans la maladie d'Alzheimer, des sous-populations neuronales pourraient être sensibilisées par des défauts de développement subtiles, et celles-ci deviendraient susceptibles de dégénérer à la suite de stress environnementaux qui n'induiraient pas la mort en conditions normales (Mehler and Gokhan 2000). De même, l'ataxie spino-cérébelleuse de type 1, qui est une autre maladie à expansion polyQ et qui est causée par le gène ATXN1, conduit à la dégénérescence du cervelet, du tronc cérébral et de la moelle épinière. Lorsque le gène ATXN1 mutant est exprimé après le développement du cervelet, les symptômes sont moins sévères que lorsqu'il est exprimé au cours du développement de celui-ci (Serra *et al.* 2006). Ceci indique que dans cette maladie, les défauts neurodéveloppementaux participent à la sévérité des symptômes (Serra *et al.* 2006). Nous pourrions réaliser une étude similaire avec un modèle HD qui n'exprimerait

la HTT mutée qu'à l'âge adulte et que l'on comparerait à un modèle similaire exprimant la même forme mutée de la HTT dès le stade embryonnaire. Nous déterminerions ainsi l'influence de problèmes neurodéveloppementaux dans l'âge d'apparition et la sévérité des symptômes.

2. La huntingtine et le transport du BDNF

Nous avons observé une augmentation du transport vésiculaire de BDNF le long des microtubules consécutive à l'ablation génétique des phosphorylations aux sites 1181/1201. Cet effet sur le transport axonal est présent à la fois dans le sens antérograde, qui dépend des kinésines et dirige les vésicules à la synapse, et dans le sens rétrograde, contrôlé par la dynéine et en direction du soma. A l'inverse, notre équipe a montré que la phosphorylation en sérine 421 favorise spécifiquement le transport vésiculaire antérograde (Colin *et al.* 2008).

La déphosphorylation de la HTT sur les sérines 1181 et 1201 potentialise le transport dans le sens antérograde et rétrograde, en recrutant de façon non différenciée kinésine et dynéine aux vésicules sur les microtubules. La phosphorylation en sérine 421 confère une direction au transport. Au niveau moléculaire, cette phosphorylation permet le recrutement de la kinésine aux vésicules sur les microtubules, favorisant le transport antérograde. Ainsi, les phosphorylations de la HTT ont des effets différents sur les dynamiques de BDNF en modulant spécifiquement la formation des complexes moléculaires moteurs nécessaires au transport.

Des défauts de transport du BDNF dans le cortex contribuent à la dégénérescence du striatum observée au cours de la MH (Gunawardena *et al.* 2003; Gauthier *et al.* 2004). Au niveau moléculaire, la HTT polyQ s'associe de façon plus étroite avec HAP1 et p150^{Glued}, des éléments des complexes protéiques moteurs. Ceci conduit à inhiber leurs accrochages aux microtubules (Gauthier *et al.* 2004). De plus, la HTT mutée induit la phosphorylation de la kinésine en activant JNK3 (Morfini *et al.* 2009). Cette phosphorylation réduit l'association de la kinésine aux microtubules. La réduction de l'association des moteurs moléculaires aux microtubules par ces différents mécanismes conduit *in fine* à la réduction du transport des vésicules de BDNF le long des axones.

Notre équipe a précédemment montré que l'induction de la phosphorylation de la HTT sur la sérine 421 en stimulant sa kinase par la voie IGF1/Akt ou en inhibant sa phosphatase, la calcineurine, améliorait les défauts de transport dans un contexte MH (Zala *et al.* 2008; Pineda *et al.* 2009).

A la lumière des résultats obtenus au cours de la thèse, nous pouvons donc envisager des stratégies visant à stimuler le transport du BDNF pour compenser ces défauts. Ainsi, nous pourrions combiner l'activation de la phosphorylation de la HTT en sérine 421 pour favoriser le transport antérograde du BDNF et dé-phosphoryler la HTT en sérine 1181 et 1201 pour potentialiser les dynamiques des vésicules de BDNF. Nous pourrions tester *in vitro* sur des cultures de neurones si la transfection d'un fragment de la HTT mutée aux positions 1181 et 1201 en alanines et en position 421 en acide aspartique stimule le transport des vésicules de BDNF de façon plus forte qu'en agissant seulement sur les phosphorylations en sérines 1181 et 1201 ou sur la sérine 421. Nous pourrions également tester l'effet de ces phosphorylations dans un contexte MH.

Enfin, des inhibiteurs pharmacologiques de Cdk5 pourraient être testés dans des modèles murins de la MH, afin d'évaluer le potentiel thérapeutique de la déphosphorylation de la HTT sur les sérines 1181 et 1201. L'inhibition pharmacologique de Cdk5 pourra être combinée à l'inhibition de la calcineurine (Zala *et al.* 2008; Pineda *et al.* 2009), de façon à favoriser également la phosphorylation de la HTT en position 421.

3. La fonction de la huntingtine dans l'hippocampe

Mes travaux de thèse montrent que la HTT module les aspects fonctionnels de l'hippocampe, liés à l'humeur. Pour cela, la HTT régule la neurogenèse hippocampique au niveau de la maturation et de la survie des nouveaux neurones. Par comparaison aux mécanismes décrits pour la neurogenèse embryonnaire, nous pourrions explorer le rôle de la HTT et de ces phosphorylations dans la division des cellules souches et progéniteurs nerveux du gyrus denté. En effet, la HTT pourrait moduler la neurogenèse en amont des étapes de maturation et de survie des nouveaux neurones en influençant par exemple le choix du type de division et le devenir cellulaire. Nous pourrions analyser l'orientation du plan de clivage des progéniteurs en division dans le gyrus

denté de l'hippocampe et déterminer la proportion des différents sous-types de progéniteurs. Nous pourrions également analyser la position des neurones doublecortine-positifs dans le gyrus denté pour étudier leur migration.

L'hippocampe est impliqué dans d'autres processus comme les processus de mémoire et d'apprentissage. Ces fonctions impliquent plus particulièrement la région dorsale de l'hippocampe tandis que les fonctions en lien avec l'humeur impliquent la région ventrale (Sahay and Hen 2007). De plus, la neurogenèse hippocampique est impliquée dans les processus mnésiques (Aasebo *et al.* 2011). De façon intéressante, nous avons observé une hausse globale de la neurogenèse sans distinction dorso-ventrale ce qui pourrait avoir également des conséquences sur la mémoire. Un test comportemental permettant chez la souris d'évaluer la mémoire est celui de la piscine de Morris (Kempermann *et al.* 1997; Ma *et al.* 2009; Vukovic *et al.* 2011). Dans ce test, une plateforme est dissimulée dans une piscine. L'animal est disposé à différents endroits de la piscine et doit retrouver la plateforme. La motivation de la souris à trouver la plateforme est due à son aversion pour l'eau. L'environnement enrichi et l'activité physique, qui stimule la neurogenèse, améliorent les performances dans la piscine de Morris (Kempermann *et al.* 1997; Ma *et al.* 2009; Vukovic *et al.* 2011). Nous pourrions déterminer l'influence de l'ablation des phosphorylations sur cette autre fonction de l'hippocampe.

4. La huntingtine et le traitement de la dépression

Les symptômes dépressifs de la MH sont reproduits dans plusieurs modèles murins (Pang *et al.* 2009; Pouladi *et al.* 2009; Renoir *et al.* 2011; Orvoen *et al.* 2012). Nous avons identifié un effet de type anxiolytique/antidépresseur de la HTT sur le comportement murin. De façon intéressante, cet effet est suffisant pour réduire les symptômes dépressifs induit par l'expression d'un fragment de HTT mutante (les souris R6/1).

Nos premières observations indiquent également que le modèle de souris traitées avec de la corticostérone, qui développe un phénotype dépressif, a des niveaux de phosphorylations sur la HTT en position 1181 et 1201 beaucoup plus élevés que les souris contrôles. Ce modèle de stress *in vivo* est à rapprocher d'une autre situation de

stress où ces phosphorylations ont été étudiées. En effet, un stress oxydatif ou génotoxique dans des cultures de neurones conduit également à une augmentation du taux de phosphorylation de la HTT sur ces sites (Anne *et al.* 2007). Ainsi, ces différents stress conduisent à stimuler les niveaux de phosphorylations.

Un fragment N-terminal de HTT mutante ou la HTT mutante pleine longueur, induit un phénotype de type anxio-dépressif qui précède souvent les symptômes moteurs. Est-ce que les mécanismes mis en jeu impliquent les phosphorylations de la HTT ? Nous n'avons pas de données concernant le niveau de phosphorylation de la HTT sur ces sites. Nous pourrions étudier par immunoblot leurs niveaux dans différents modèles murins de la MH et les comparer à la situation wild-type.

Les données générées au cours de ma thèse suggèrent que le niveau de phosphorylations de la HTT serait important pour moduler les comportements dépressifs. Pour tester cette hypothèse, différentes expériences seront réalisées :

- Nous pourrions tester directement l'effet des phosphorylations de la HTT dans un modèle murin de la maladie de Huntington. Les YAC128 présentent des troubles dépressifs (Pouladi *et al.* 2009). Il faudrait générer des souris dont les sérines 1181 et 1201 sont mutées en alanine ou en acide aspartique à partir de YAC128 qui expriment un transgène avec une HTT pleine longueur.

- Il serait également intéressant d'étudier la réponse des souris *Hdh*^{S1181A/S1201A} et *Hdh*^{S1181D/S1201D} au traitement à la corticostérone (David *et al.* 2009). Nous pourrions également tester d'autres modèles d'induction de comportements dépressifs, comme la résignation apprise (Krishnan and Nestler 2008), ou le UCMS (unpredictable chronic mild stress; (Farooq *et al.* 2012). L'analyse du comportements des souris *Hdh*^{S1181A/S1201A} et *Hdh*^{S1181D/S1201D} dans ces modèles devrait permettre une meilleure compréhension de l'effet anxiolytique/antidépresseur de ces phosphorylations.

- Nous pourrions également étudier l'influence du niveau de phosphorylations de la HTT sur les symptômes dépressifs. Pour cela, nous pourrions déterminer si des hétérozygotes *Hdh*^{S1181A/S1201A} dans un contexte R6/1 peuvent également présenter une amélioration des symptômes dépressifs. En effet, il serait intéressant de déterminer si 50% au moins de HTT non phosphorylée suffit à améliorer les symptômes.

- Nous pourrions préciser le rôle de la kinase impliquée dans les phosphorylations de la HTT sur les sérines 1181/1201. Est-ce la kinase Cdk5 ? Notre laboratoire a précédemment démontré que celle-ci était responsable de ces phosphorylations en réponse à un stress oxydatif. Nous pourrions donc inhiber Cdk5 par une approche pharmacologique (la roscovitine) ou par RNA interférence dans les modèles knock-in *Hdh*^{S1181A/S1201A} et *Hdh*^{S1181D/S1201D} de cette étude. Plus précisément, nous réaliserons des injections stéréotaxiques de virus si-Cdk5 dans le gyrus denté de l'hippocampe et étudierons la réponse comportementale dans les différents contextes génétiques.

- Nous pourrions également étudier l'effet de l'inhibition de Cdk5 dans différents modèles murins de la MH ou de dépression. Nous déterminerions l'influence de cette inhibition sur le niveau des phosphorylations de la HTT et l'impact comportemental en terme d'anxiété/ dépression.

5. Le rôle de Cdk5 dans les maladies neurodégénératives

Cdk5 est une kinase dont l'activité doit être finement régulée. En effet, une activité trop forte ou trop faible est néfaste pour la survie neuronale (Cheung and Ip 2012). L'activité de Cdk5 dépend de ses activateurs neuronaux p35 et p39 (Dhavan and Tsai 2001). Le clivage de p35 en p25 par la calpaine hyperactive Cdk5. La phosphorylation de Cdk5, le clivage de p35 et l'accumulation de p25 sont associés à une activité pro-apoptotique de Cdk5 (Kusakawa *et al.* 2000; Lee *et al.* 2000; Camins *et al.* 2006; Lin *et al.* 2007).

Comme dans le cas de la maladie de Huntington, la kinase Cdk5 est impliquée dans d'autres maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer ou de Parkinson. La HTT étant une cible de Cdk5, celle-ci pourrait jouer un rôle dans les voies de signalisation dépendantes de cette kinase clé.

Maladie d'Alzheimer

Une activité aberrante de Cdk5 a été associée à la maladie d'Alzheimer (Cruz and Tsai 2004; Cheung and Ip 2012). Cette maladie est caractérisée par la dégénérescence du cortex du lobe temporal interne et de l'hippocampe, puis celle-ci s'étend aux cortex

associatifs frontaux et temporo-pariétaux. Au niveau histopathologique, il y a formation de plaques amyloïdes extracellulaires et d'agrégats de protéines tau intracellulaires. Cdk5 est impliqué dans la formation de ces plaques et agrégats caractéristiques.

Accumulation de l'amyloïde beta

La voie amyloïde conduit à la génération de l'amyloïde beta (A β), à partir de la protéine précurseur APP. La β -sécrétase 1 (BACE1) et une gamma-sécrétase clivent l'APP en A β . L'inhibition spécifique du couple Cdk5/p25 réduit la perte neuronale induite par A β dans le cortex (Zheng *et al.* 2010). L'activation de Cdk5 stimule la production de A β et son accumulation dans le soma et les neurites (Cruz *et al.* 2006). Des souris qui surexpriment p25 ont des taux de protéines A β plus élevés et l'inhibition pharmacologique de Cdk5 chez ces souris réduit les niveaux de A β (Wen *et al.* 2008). Au niveau moléculaire, Cdk5 participe au clivage d'APP car elle stimule STAT3, un facteur de transcription qui active l'expression de la β -sécrétase 1 (Wen *et al.* 2008).

Accumulation de tau

La protéine tau (tubule-associated unit) est associée aux microtubules et les stabilise. L'hyper-phosphorylation de tau, caractéristique de la maladie d'Alzheimer (Cheung and Ip 2012), réduit son affinité avec les microtubules, ce qui déstabilise ces derniers. L'activité de Cdk5 module la phosphorylation de tau. Cdk5 phosphoryle directement tau et facilite les phosphorylations de tau en inhibant la phosphatase PP1 par phosphorylation (Lu *et al.* 2011; Cheung and Ip 2012). L'inactivation de Cdk5 par RNA interférence réduit les phosphorylations de tau et les agrégats de neurofibrilles dans les modèles murins triple-transgéniques de la maladie d'Alzheimer (Piedrahita *et al.* 2010). Cdk5 contribue donc à la dysfonction de tau en modulant sa phosphorylation.

Autres mécanismes

Parmi les autres mécanismes mettant en jeu Cdk5, la dérégulation de son activité est également impliquée dans les défauts de neurogenèse de la maladie d'Alzheimer. En effet, la surexpression de p35 dans les progéniteurs nerveux *in vitro* exposés à A β , qui modélise la dérégulation de l'activité de Cdk5 dans la maladie d'Alzheimer, perturbe la maturation et la croissance neuritique (Crews *et al.* 2011). Ces défauts sont compensés par l'inhibition pharmacologique ou génétique de Cdk5.

De façon similaire, la neurogenèse hippocampique est altérée, avec une diminution du nombre de cellules DCX positives et de la survie à un mois dans le gyrus denté, dans le modèle d'Alzheimer qui exprime un transgène APP (Crews *et al.* 2011). Lorsqu'elles sont traitées avec un inhibiteur pharmacologique de Cdk5 (la roscovitine) ou qu'elles sont croisées avec des souris Cdk5^{+/-}, les défauts sont restaurés (Crews *et al.* 2011).

Maladie de Parkinson

Cdk5 participe également à la progression pathologique de la maladie de Parkinson. Cette maladie peut être modélisée chimiquement par injection de MPTP (1-méthyl 4-Phényl 1,2,3,6-tétrahydropyridine). Le MPTP, métabolisé en MPP⁺, est transporté par le transporteur de la dopamine dans les neurones dopaminergiques où il interfère avec le complexe 1 de la chaîne respiratoire (Przedborski *et al.* 2000). Ceci conduit à la dégénérescence des neurones dopaminergiques, à l'augmentation des niveaux de p25 et par conséquent à l'activité de Cdk5 (Smith *et al.* 2003). Dans ce modèle, l'inhibition de l'activité de Cdk5 confère une protection neuronale (Smith *et al.* 2003).

Le stress oxydatif est un des mécanismes participant à la maladie de Parkinson (Cheung and Ip 2012). Dans le modèle MPTP, il y a production de radicaux libres (oxyde nitrique, anion superoxyde)(Przedborski *et al.* 2000). Dans ce modèle, Cdk5 phosphoryle la peroxydase peroxyredoxine (Prx2) sur la thréonine 89 et inhibe son activité en réponse au MPTP (Qu *et al.* 2007). Ceci est confirmé par la diminution de l'effet neuroprotecteur de Prx2 lorsque l'on surexprime un mutant phospho-mimétique à la thréonine 89 de Prx2 (Qu *et al.* 2007). Cdk5 phosphoryle également Ape1, une enzyme de la réparation de l'ADN, en thréonine 232. L'activité de Ape1 est réduite par cette phosphorylation et elle perd son effet neuroprotecteur en réponse au MPTP (Huang *et al.* 2010).

Enfin, Cdk5 est impliqué dans d'autres aspects de la maladie de Parkinson tels que les défauts mitochondriaux et la dérégulation de l'autophagie (Cheung and Ip 2012).

L'ensemble de ces données indique que l'inhibition de Cdk5 peut avoir un potentiel thérapeutique dans les maladies neurodégénératives. Il serait intéressant de croiser les souris *Hdh*^{S1181A/S1201A} et les souris *Hdh*^{S1181D/S1201D} avec des modèles murins de ces pathologies ou bien encore induire des lésions chimiques modélisant ces maladies dans ces souris. Nous pourrions ainsi déterminer si la HTT intervient dans les voies médiées par Cdk5 et si l'ablation des phosphorylations de la HTT peut améliorer certains des symptômes de ces maladies.

Chapitre 4 - Bibliographie

- Aasebo, I. E., S. Blankvoort and A. Tashiro (2011). "Critical maturational period of new neurons in adult dentate gyrus for their involvement in memory formation." *Eur J Neurosci* **33**(6): 1094-1100.
- AFSSAPS (2006). "Médicaments antidépresseurs dans le traitement des troubles dépressifs et des troubles anxieux de l'adulte."
- Alexi, T., C. V. Borlongan, R. L. Faull, C. E. Williams, R. G. Clark, P. D. Gluckman and P. E. Hughes (2000). "Neuroprotective strategies for basal ganglia degeneration: Parkinson's and Huntington's diseases." *Prog Neurobiol* **60**(5): 409-470.
- Altar, C. A., N. Cai, T. Bliven, M. Juhasz, J. M. Conner, A. L. Acheson, R. M. Lindsay and S. J. Wiegand (1997). "Anterograde transport of brain-derived neurotrophic factor and its role in the brain." *Nature* **389**(6653): 856-860.
- Alvarez-Buylla, A., J. M. Garcia-Verdugo and A. D. Tramontin (2001). "A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells." *Nat Rev Neurosci* **2**(4): 287-293.
- An, X. L., J. X. Zou, R. Y. Wu, Y. Yang, F. D. Tai, S. Y. Zeng, R. Jia, X. Zhang, E. Q. Liu and H. Broders (2011). "Strain and sex differences in anxiety-like and social behaviors in C57BL/6J and BALB/cJ mice." *Exp Anim* **60**(2): 111-123.
- Anisman, H. and K. Matheson (2005). "Stress, depression, and anhedonia: caveats concerning animal models." *Neurosci Biobehav Rev* **29**(4-5): 525-546.
- Anne, S. L., F. Saudou and S. Humbert (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**(27): 7318-7328.
- Aronin, N., M. Kim, G. Laforet and M. DiFiglia (1999). "Are there multiple pathways in the pathogenesis of Huntington's disease?" *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **354**(1386): 995-1003.
- Arzberger, T., K. Krampfl, S. Leimgruber and A. Weindl (1997). "Changes of NMDA receptor subunit (NR1, NR2B) and glutamate transporter (GLT1) mRNA expression in Huntington's disease--an in situ hybridization study." *J Neuropathol Exp Neurol* **56**(4): 440-454.
- Ayala, R., T. Shu and L. H. Tsai (2007). "Trekking across the brain: the journey of neuronal migration." *Cell* **128**(1): 29-43.
- Aziz, N. A., J. M. van der Burg, G. B. Landwehrmeyer, P. Brundin, T. Stijnen and R. A. Roos (2008). "Weight loss in Huntington disease increases with higher CAG repeat number." *Neurology* **71**(19): 1506-1513.
- Aziz, N. A., M. A. van der Marck, H. Pijl, M. G. Olde Rikkert, B. R. Bloem and R. A. Roos (2008). "Weight loss in neurodegenerative disorders." *J Neurol* **255**(12): 1872-1880.
- Bae, B. I., M. R. Hara, M. B. Cascio, C. L. Wellington, M. R. Hayden, C. A. Ross, H. C. Ha, X. J. Li, S. H. Snyder and A. Sawa (2006). "Mutant huntingtin: nuclear translocation and cytotoxicity mediated by GAPDH." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(9): 3405-3409.
- Bai, J., R. L. Ramos, J. B. Ackman, A. M. Thomas, R. V. Lee and J. J. LoTurco (2003). "RNAi reveals doublecortin is required for radial migration in rat neocortex." *Nat Neurosci* **6**(12): 1277-1283.
- Baquet, Z. C., J. A. Gorski and K. R. Jones (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**(17): 4250-4258.
- Bates, G. P. (2005). "History of genetic disease: the molecular genetics of Huntington disease - a history." *Nat Rev Genet* **6**(10): 766-773.

- Behrens, P. F., P. Franz, B. Woodman, K. S. Lindenberg and G. B. Landwehrmeyer (2002). "Impaired glutamate transport and glutamate-glutamine cycling: downstream effects of the Huntington mutation." *Brain* **125**(Pt 8): 1908-1922.
- Bellion, A., J. P. Baudoin, C. Alvarez, M. Bornens and C. Metin (2005). "Nucleokinesis in tangentially migrating neurons comprises two alternating phases: forward migration of the Golgi/centrosome associated with centrosome splitting and myosin contraction at the rear." *J Neurosci* **25**(24): 5691-5699.
- Belmaker, R. H. and G. Agam (2008). "Major depressive disorder." *N Engl J Med* **358**(1): 55-68.
- Benchoua, A., Y. Trioulier, E. Diguët, C. Malgorn, M. C. Gaillard, N. Dufour, J. M. Elalouf, S. Krajewski, P. Hantraye, N. Deglon and E. Brouillet (2008). "Dopamine determines the vulnerability of striatal neurons to the N-terminal fragment of mutant huntingtin through the regulation of mitochondrial complex II." *Hum Mol Genet* **17**(10): 1446-1456.
- Benn, C. L., T. Sun, G. Sadri-Vakili, K. N. McFarland, D. P. DiRocco, G. J. Yohrling, T. W. Clark, B. Bouzou and J. H. Cha (2008). "Huntingtin modulates transcription, occupies gene promoters in vivo, and binds directly to DNA in a polyglutamine-dependent manner." *J Neurosci* **28**(42): 10720-10733.
- Berton, O. and E. J. Nestler (2006). "New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines." *Nat Rev Neurosci* **7**(2): 137-151.
- Bhide, P. G., M. Day, E. Sapp, C. Schwarz, A. Sheth, J. Kim, A. B. Young, J. Penney, J. Golden, N. Aronin and M. DiFiglia (1996). "Expression of normal and mutant huntingtin in the developing brain." *J Neurosci* **16**(17): 5523-5535.
- Bjorkqvist, M., A. Petersen, K. Bacos, J. Isaacs, P. Norlen, J. Gil, N. Popovic, F. Sundler, G. P. Bates, S. J. Tabrizi, P. Brundin and H. Mulder (2006). "Progressive alterations in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the R6/2 transgenic mouse model of Huntington's disease." *Hum Mol Genet* **15**(10): 1713-1721.
- Block, R. C., E. R. Dorsey, C. A. Beck, J. T. Brenna and I. Shoulson (2010). "Altered cholesterol and fatty acid metabolism in Huntington disease." *J Clin Lipidol* **4**(1): 17-23.
- Bodner, R. A., T. F. Outeiro, S. Altmann, M. M. Maxwell, S. H. Cho, B. T. Hyman, P. J. McLean, A. B. Young, D. E. Housman and A. G. Kazantsev (2006). "Pharmacological promotion of inclusion formation: a therapeutic approach for Huntington's and Parkinson's diseases." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(11): 4246-4251.
- Bonaguidi, M. A., J. Song, G. L. Ming and H. Song (2012). "A unifying hypothesis on mammalian neural stem cell properties in the adult hippocampus." *Curr Opin Neurobiol*.
- Borrell-Pages, M., D. Zala, S. Humbert and F. Saudou (2006). "Huntington's disease: from huntingtin function and dysfunction to therapeutic strategies." *Cell Mol Life Sci* **63**(22): 2642-2660.
- Boutell, J. M., P. Thomas, J. W. Neal, V. J. Weston, J. Duce, P. S. Harper and A. L. Jones (1999). "Aberrant interactions of transcriptional repressor proteins with the Huntington's disease gene product, huntingtin." *Hum Mol Genet* **8**(9): 1647-1655.
- Brenes, J. C., O. Rodriguez and J. Fornaguera (2008). "Differential effect of environment enrichment and social isolation on depressive-like behavior, spontaneous activity and serotonin and norepinephrine concentration in prefrontal cortex and ventral striatum." *Pharmacol Biochem Behav* **89**(1): 85-93.

- Brooks, S., G. Higgs, L. Jones and S. B. Dunnett (2012). "Longitudinal analysis of the behavioural phenotype in HdhQ92 Huntington's disease knock-in mice." *Brain Res Bull* **88**(2-3): 148-155.
- Brooks, S. P., N. Janghra, V. L. Workman, Z. Bayram-Weston, L. Jones and S. B. Dunnett (2012). "Longitudinal analysis of the behavioural phenotype in R6/1 (C57BL/6J) Huntington's disease transgenic mice." *Brain Res Bull* **88**(2-3): 94-103.
- Brouillet, E., M. C. Guyot, V. Mittoux, S. Altairac, F. Conde, S. Palfi and P. Hantraye (1998). "Partial inhibition of brain succinate dehydrogenase by 3-nitropropionic acid is sufficient to initiate striatal degeneration in rat." *J Neurochem* **70**(2): 794-805.
- Calabrese, F., R. Molteni, G. Racagni and M. A. Riva (2009). "Neuronal plasticity: a link between stress and mood disorders." *Psychoneuroendocrinology* **34 Suppl 1**: S208-216.
- Camins, A., E. Verdaguer, J. Folch, A. M. Canudas and M. Pallas (2006). "The role of CDK5/P25 formation/inhibition in neurodegeneration." *Drug News Perspect* **19**(8): 453-460.
- Castren, E. and T. Rantamaki (2010). "The role of BDNF and its receptors in depression and antidepressant drug action: Reactivation of developmental plasticity." *Dev Neurobiol* **70**(5): 289-297.
- Caviston, J. P., J. L. Ross, S. M. Antony, M. Tokito and E. L. Holzbaur (2007). "Huntingtin facilitates dynein/dynactin-mediated vesicle transport." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(24): 10045-10050.
- Caviston, J. P., A. L. Zajac, M. Tokito and E. L. Holzbaur (2011). "Huntingtin coordinates the dynein-mediated dynamic positioning of endosomes and lysosomes." *Mol Biol Cell* **22**(4): 478-492.
- Cepeda, C., N. Wu, V. M. Andre, D. M. Cummings and M. S. Levine (2007). "The corticostriatal pathway in Huntington's disease." *Prog Neurobiol* **81**(5-6): 253-271.
- Cha, J. H. (2000). "Transcriptional dysregulation in Huntington's disease." *Trends Neurosci* **23**(9): 387-392.
- Chang, D. T., G. L. Rintoul, S. Pandipati and I. J. Reynolds (2006). "Mutant huntingtin aggregates impair mitochondrial movement and trafficking in cortical neurons." *Neurobiol Dis* **22**(2): 388-400.
- Charvin, D., P. Vanhoutte, C. Pages, E. Borrelli and J. Caboche (2005). "Unraveling a role for dopamine in Huntington's disease: the dual role of reactive oxygen species and D2 receptor stimulation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(34): 12218-12223.
- Chenn, A. and S. K. McConnell (1995). "Cleavage orientation and the asymmetric inheritance of Notch1 immunoreactivity in mammalian neurogenesis." *Cell* **82**(4): 631-641.
- Cheung, Z. H. and N. Y. Ip (2012). "Cdk5: a multifaceted kinase in neurodegenerative diseases." *Trends Cell Biol* **22**(3): 169-175.
- Chiu, C. T., G. Liu, P. Leeds and D. M. Chuang (2011). "Combined treatment with the mood stabilizers lithium and valproate produces multiple beneficial effects in transgenic mouse models of Huntington's disease." *Neuropsychopharmacology* **36**(12): 2406-2421.
- Chopra, K., B. Kumar and A. Kuhad (2011). "Pathobiological targets of depression." *Expert Opin Ther Targets* **15**(4): 379-400.
- Colin, E., D. Zala, G. Liot, H. Rangone, M. Borrell-Page, X. J. Li, F. Saudou and S. Humbert (2008). "Huntingtin phosphorylation acts as a molecular switch for anterograde/retrograde transport in neurons." *EMBO J* **27**(15): 2124-2134.

- Cong, S. Y., B. A. Pepers, B. O. Evert, D. C. Rubinsztein, R. A. Roos, G. J. van Ommen and J. C. Dorsman (2005). "Mutant huntingtin represses CBP, but not p300, by binding and protein degradation." *Mol Cell Neurosci* **30**(4): 560-571.
- Cornett, J., F. Cao, C. E. Wang, C. A. Ross, G. P. Bates, S. H. Li and X. J. Li (2005). "Polyglutamine expansion of huntingtin impairs its nuclear export." *Nat Genet* **37**(2): 198-204.
- Costa, M. R., G. Wen, A. Lepier, T. Schroeder and M. Gotz (2008). "Par-complex proteins promote proliferative progenitor divisions in the developing mouse cerebral cortex." *Development* **135**(1): 11-22.
- Coyle, J. T. and R. S. Duman (2003). "Finding the intracellular signaling pathways affected by mood disorder treatments." *Neuron* **38**(2): 157-160.
- Crews, L., C. Patrick, A. Adame, E. Rockenstein and E. Masliah (2011). "Modulation of aberrant CDK5 signaling rescues impaired neurogenesis in models of Alzheimer's disease." *Cell Death Dis* **2**: e120.
- Cruz, J. C., D. Kim, L. Y. Moy, M. M. Dobbin, X. Sun, R. T. Bronson and L. H. Tsai (2006). "p25/cyclin-dependent kinase 5 induces production and intraneuronal accumulation of amyloid beta in vivo." *J Neurosci* **26**(41): 10536-10541.
- Cruz, J. C. and L. H. Tsai (2004). "Cdk5 deregulation in the pathogenesis of Alzheimer's disease." *Trends Mol Med* **10**(9): 452-458.
- Cryan, J. F. and C. Mombereau (2004). "In search of a depressed mouse: utility of models for studying depression-related behavior in genetically modified mice." *Mol Psychiatry* **9**(4): 326-357.
- Cudkovicz, M. and N. W. Kowall (1990). "Degeneration of pyramidal projection neurons in Huntington's disease cortex." *Ann Neurol* **27**(2): 200-204.
- Damiano, M., L. Galvan, N. Deglon and E. Brouillet (2010). "Mitochondria in Huntington's disease." *Biochim Biophys Acta* **1802**(1): 52-61.
- Dave, R. K., T. Ellis, M. C. Toumpas, J. P. Robson, E. Julian, C. Adolphe, P. F. Bartlett, H. M. Cooper, B. A. Reynolds and B. J. Wainwright (2011). "Sonic hedgehog and notch signaling can cooperate to regulate neurogenic divisions of neocortical progenitors." *PLoS One* **6**(2): e14680.
- David, D. J., M. Bourin, G. Jegu, C. Przybylski, P. Jolliet and A. M. Gardier (2003). "Effects of acute treatment with paroxetine, citalopram and venlafaxine in vivo on noradrenaline and serotonin outflow: a microdialysis study in Swiss mice." *Br J Pharmacol* **140**(6): 1128-1136.
- David, D. J., 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 and R. Hen (2009). "Neurogenesis-dependent and -independent effects of fluoxetine in an animal model of anxiety/depression." *Neuron* **62**(4): 479-493.
- Davies, S. W., M. Turmaine, B. A. Cozens, M. DiFiglia, A. H. Sharp, C. A. Ross, E. Scherzinger, E. E. Wanker, L. Mangiarini and G. P. Bates (1997). "Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation." *Cell* **90**(3): 537-548.
- Deng, W., J. B. Aimone and F. H. Gage (2010). "New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory?" *Nat Rev Neurosci* **11**(5): 339-350.
- Deyts, C., B. Galan-Rodriguez, E. Martin, N. Bouveyron, E. Roze, D. Charvin, J. Caboche and S. Betuing (2009). "Dopamine D2 receptor stimulation potentiates PolyQ-

- Huntingtin-induced mouse striatal neuron dysfunctions via Rho/ROCK-II activation." *PLoS One* **4**(12): e8287.
- Dhavan, R. and L. H. Tsai (2001). "A decade of CDK5." *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**(10): 749-759.
- Dietrich, P., R. Shanmugasundaram, E. Shuyu and I. Dragatsis (2009). "Congenital hydrocephalus associated with abnormal subcommissural organ in mice lacking huntingtin in Wnt1 cell lineages." *Hum Mol Genet* **18**(1): 142-150.
- DiFiglia, M. (1990). "Excitotoxic injury of the neostriatum: a model for Huntington's disease." *Trends Neurosci* **13**(7): 286-289.
- DiFiglia, M., E. Sapp, K. Chase, C. Schwarz, A. Meloni, C. Young, E. Martin, J. P. Vonsattel, R. Carraway, S. A. Reeves and et al. (1995). "Huntingtin is a cytoplasmic protein associated with vesicles in human and rat brain neurons." *Neuron* **14**(5): 1075-1081.
- DiFiglia, M., E. Sapp, K. O. Chase, S. W. Davies, G. P. Bates, J. P. Vonsattel and N. Aronin (1997). "Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain." *Science* **277**(5334): 1990-1993.
- Dorner, J. L., B. R. Miller, S. J. Barton, T. J. Brock and G. V. Rebec (2007). "Sex differences in behavior and striatal ascorbate release in the 140 CAG knock-in mouse model of Huntington's disease." *Behav Brain Res* **178**(1): 90-97.
- Dragatsis, I., M. S. Levine and S. Zeitlin (2000). "Inactivation of Hdh in the brain and testis results in progressive neurodegeneration and sterility in mice." *Nat Genet* **26**(3): 300-306.
- Dragileva, E., A. Hendricks, A. Teed, T. Gillis, E. T. Lopez, E. C. Friedberg, R. Kucherlapati, W. Edelmann, K. L. Lunetta, M. E. MacDonald and V. C. Wheeler (2009). "Intergenerational and striatal CAG repeat instability in Huntington's disease knock-in mice involve different DNA repair genes." *Neurobiol Dis* **33**(1): 37-47.
- Drew, M. R. and R. Hen (2007). "Adult hippocampal neurogenesis as target for the treatment of depression." *CNS Neurol Disord Drug Targets* **6**(3): 205-218.
- Duff, K., J. S. Paulsen, L. J. Beglinger, D. R. Langbehn and J. C. Stout (2007). "Psychiatric symptoms in Huntington's disease before diagnosis: the predict-HD study." *Biol Psychiatry* **62**(12): 1341-1346.
- Dulawa, S. C. and R. Hen (2005). "Recent advances in animal models of chronic antidepressant effects: the novelty-induced hypophagia test." *Neurosci Biobehav Rev* **29**(4-5): 771-783.
- Duman, R. S., J. Malberg, S. Nakagawa and C. D'Sa (2000). "Neuronal plasticity and survival in mood disorders." *Biol Psychiatry* **48**(8): 732-739.
- Duman, R. S. and L. M. Monteggia (2006). "A neurotrophic model for stress-related mood disorders." *Biol Psychiatry* **59**(12): 1116-1127.
- Dunah, A. W., H. Jeong, A. Griffin, Y. M. Kim, D. G. Standaert, S. M. Hersch, M. M. Mouradian, A. B. Young, N. Tanese and D. Krainc (2002). "Sp1 and TAFII130 transcriptional activity disrupted in early Huntington's disease." *Science* **296**(5576): 2238-2243.
- Duyao, M. P., A. B. Auerbach, A. Ryan, F. Persichetti, G. T. Barnes, S. M. McNeil, P. Ge, J. P. Vonsattel, J. F. Gusella, A. L. Joyner and et al. (1995). "Inactivation of the mouse Huntington's disease gene homolog Hdh." *Science* **269**(5222): 407-410.
- Ehrnhoefer, D. E., L. Sutton and M. R. Hayden (2011). "Small changes, big impact: posttranslational modifications and function of huntingtin in Huntington disease." *Neuroscientist* **17**(5): 475-492.

- Eisch, A. J., H. A. Cameron, J. M. Encinas, L. A. Meltzer, G. L. Ming and L. S. Overstreet-Wadiche (2008). "Adult neurogenesis, mental health, and mental illness: hope or hype?" *J Neurosci* **28**(46): 11785-11791.
- Engelender, S., A. H. Sharp, V. Colomer, M. K. Tokito, A. Lanahan, P. Worley, E. L. Holzbaur and C. A. Ross (1997). "Huntingtin-associated protein 1 (HAP1) interacts with the p150Glued subunit of dynactin." *Hum Mol Genet* **6**(13): 2205-2212.
- Estrada Sanchez, A. M., J. Mejia-Toiber and L. Massieu (2008). "Excitotoxic neuronal death and the pathogenesis of Huntington's disease." *Arch Med Res* **39**(3): 265-276.
- Fan, X., H. J. Kim, D. Bouton, M. Warner and J. A. Gustafsson (2008). "Expression of liver X receptor beta is essential for formation of superficial cortical layers and migration of later-born neurons." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(36): 13445-13450.
- Farkas, L. M. and W. B. Huttner (2008). "The cell biology of neural stem and progenitor cells and its significance for their proliferation versus differentiation during mammalian brain development." *Curr Opin Cell Biol* **20**(6): 707-715.
- Farooq, R. K., E. Isingrini, A. Tanti, A. M. Le Guisquet, N. Arlicot, F. Minier, S. Leman, S. Chalon, C. Belzung and V. Camus (2012). "Is unpredictable chronic mild stress (UCMS) a reliable model to study depression-induced neuroinflammation?" *Behav Brain Res* **231**(1): 130-137.
- Farvolden, P., S. H. Kennedy and R. W. Lam (2003). "Recent developments in the psychobiology and pharmacotherapy of depression: optimising existing treatments and novel approaches for the future." *Expert Opin Investig Drugs* **12**(1): 65-86.
- Fava, M. and K. S. Kendler (2000). "Major depressive disorder." *Neuron* **28**(2): 335-341.
- Fedele, V., L. Roybon, U. Nordstrom, J. Y. Li and P. Brundin (2011). "Neurogenesis in the R6/2 mouse model of Huntington's disease is impaired at the level of NeuroD1." *Neuroscience* **173**: 76-81.
- Feng, Y. and C. A. Walsh (2004). "Mitotic spindle regulation by Nde1 controls cerebral cortical size." *Neuron* **44**(2): 279-293.
- Ferrante, R. J., O. A. Andreassen, A. Dedeoglu, K. L. Ferrante, B. G. Jenkins, S. M. Hersch and M. F. Beal (2002). "Therapeutic effects of coenzyme Q10 and remacemide in transgenic mouse models of Huntington's disease." *J Neurosci* **22**(5): 1592-1599.
- Fischer, A., F. Sananbenesi, P. T. Pang, B. Lu and L. H. Tsai (2005). "Opposing roles of transient and prolonged expression of p25 in synaptic plasticity and hippocampus-dependent memory." *Neuron* **48**(5): 825-838.
- Fusco, F. R., Q. Chen, W. J. Lamoereaux, G. Figueredo-Cardenas, Y. Jiao, J. A. Coffman, D. J. Surmeier, M. G. Honig, L. R. Carlock and A. Reiner (1999). "Cellular localization of huntingtin in striatal and cortical neurons in rats: lack of correlation with neuronal vulnerability in Huntington's disease." *J Neurosci* **19**(4): 1189-1202.
- Fusco, F. R., C. Zuccato, M. Tartari, A. Martorana, Z. De March, C. Giampa, E. Cattaneo and G. Bernardi (2003). "Co-localization of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and wild-type huntingtin in normal and quinolinic acid-lesioned rat brain." *Eur J Neurosci* **18**(5): 1093-1102.
- Gammill, L. S. and M. Bronner-Fraser (2003). "Neural crest specification: migrating into genomics." *Nat Rev Neurosci* **4**(10): 795-805.
- Garcia, M., D. Charvin and J. Caboche (2004). "Expanded huntingtin activates the c-Jun terminal kinase/c-Jun pathway prior to aggregate formation in striatal neurons in culture." *Neuroscience* **127**(4): 859-870.

- Gauthier, L. R., B. C. Charrin, M. Borrell-Pages, J. P. Dompierre, H. Rangone, F. P. Cordelieres, J. De Mey, M. E. MacDonald, V. Lessmann, S. Humbert and F. Saudou (2004). "Huntingtin controls neurotrophic support and survival of neurons by enhancing BDNF vesicular transport along microtubules." *Cell* **118**(1): 127-138.
- Ge, X., C. L. Frank, F. Calderon de Anda and L. H. Tsai (2010). "Hook3 interacts with PCM1 to regulate pericentriolar material assembly and the timing of neurogenesis." *Neuron* **65**(2): 191-203.
- Gervais, F. G., R. Singaraja, S. Xanthoudakis, C. A. Gutekunst, B. R. Leavitt, M. Metzler, A. S. Hackam, J. Tam, J. P. Vaillancourt, V. Houtzager, D. M. Rasper, S. Roy, M. R. Hayden and D. W. Nicholson (2002). "Recruitment and activation of caspase-8 by the Huntingtin-interacting protein Hip-1 and a novel partner Hippi." *Nat Cell Biol* **4**(2): 95-105.
- Gil, J. M., M. Leist, N. Popovic, P. Brundin and A. Petersen (2004). "Asialoerythropoietin is not effective in the R6/2 line of Huntington's disease mice." *BMC Neurosci* **5**: 17.
- Gil, J. M., P. Mohapel, I. M. Araujo, N. Popovic, J. Y. Li, P. Brundin and A. Petersen (2005). "Reduced hippocampal neurogenesis in R6/2 transgenic Huntington's disease mice." *Neurobiol Dis* **20**(3): 744-751.
- Gil-Mohapel, J., J. M. Simpson, M. Ghilan and B. R. Christie (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., K. Colombo, M. Molina-Calavita, G. Keryer, D. Zala, B. C. Charrin, P. Dietrich, M. L. Volvert, F. Guillemot, I. Dragatsis, Y. Bellaiche, F. Saudou, L. Nguyen and S. Humbert (2010). "Huntingtin is required for mitotic spindle orientation and mammalian neurogenesis." *Neuron* **67**(3): 392-406.
- Goldberg, Y. P., D. W. Nicholson, D. M. Rasper, M. A. Kalchman, H. B. Koide, R. K. Graham, M. Bromm, P. Kazemi-Esfarjani, N. A. Thornberry, J. P. Vaillancourt and M. R. Hayden (1996). "Cleavage of huntingtin by apopain, a proapoptotic cysteine protease, is modulated by the polyglutamine tract." *Nat Genet* **13**(4): 442-449.
- Gong, B., M. C. Lim, J. Wanderer, A. Wytenbach and A. J. Morton (2008). "Time-lapse analysis of aggregate formation in an inducible PC12 cell model of Huntington's disease reveals time-dependent aggregate formation that transiently delays cell death." *Brain Res Bull* **75**(1): 146-157.
- Gonitel, R., H. Moffitt, K. Sathasivam, B. Woodman, P. J. Detloff, R. L. Faull and G. P. Bates (2008). "DNA instability in postmitotic neurons." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(9): 3467-3472.
- Graham, R. K., Y. Deng, E. J. Slow, B. Haigh, N. Bissada, G. Lu, J. Pearson, J. Shehadeh, L. Bertram, Z. Murphy, S. C. Warby, C. N. Doty, S. Roy, C. L. Wellington, B. R. Leavitt, L. A. Raymond, D. W. Nicholson and M. R. Hayden (2006). "Cleavage at the caspase-6 site is required for neuronal dysfunction and degeneration due to mutant huntingtin." *Cell* **125**(6): 1179-1191.
- Grandmougin, T., C. Bourdet and J. M. Gurruchaga (1997). "De la danse de Saint Guy à la chorée de Huntington : rappels sur l'émergence d'un concept médical." *Médecine/sciences* **13**: 850-854.
- Gray, M., D. I. Shirasaki, C. Cepeda, V. M. Andre, B. Wilburn, X. H. Lu, J. Tao, I. Yamazaki, S. H. Li, Y. E. Sun, X. J. Li, M. S. Levine and X. W. Yang (2008). "Full-length human mutant huntingtin with a stable polyglutamine repeat can elicit progressive and selective neuropathogenesis in BACHD mice." *J Neurosci* **28**(24): 6182-6195.

- Griebel, G., C. Belzung, G. Perrault and D. J. Sanger (2000). "Differences in anxiety-related behaviours and in sensitivity to diazepam in inbred and outbred strains of mice." *Psychopharmacology (Berl)* **148**(2): 164-170.
- Grote, H. E., N. D. Bull, M. L. Howard, A. van Dellen, C. Blakemore, P. F. Bartlett and A. J. Hannan (2005). "Cognitive disorders and neurogenesis deficits in Huntington's disease mice are rescued by fluoxetine." *Eur J Neurosci* **22**(8): 2081-2088.
- Gu, X., E. R. Greiner, R. Mishra, R. Kodali, A. Osmand, S. Finkbeiner, J. S. Steffan, L. M. Thompson, R. Wetzel and X. W. Yang (2009). "Serines 13 and 16 are critical determinants of full-length human mutant huntingtin induced disease pathogenesis in HD mice." *Neuron* **64**(6): 828-840.
- Guillemot, F. (2005). "Cellular and molecular control of neurogenesis in the mammalian telencephalon." *Curr Opin Cell Biol* **17**(6): 639-647.
- Gulacsi, A. A. and S. A. Anderson (2008). "Beta-catenin-mediated Wnt signaling regulates neurogenesis in the ventral telencephalon." *Nat Neurosci* **11**(12): 1383-1391.
- Gunawardena, S. and L. S. Goldstein (2005). "Polyglutamine diseases and transport problems: deadly traffic jams on neuronal highways." *Arch Neurol* **62**(1): 46-51.
- Gunawardena, S., L. S. Her, R. G. Brusch, R. A. Laymon, I. R. Niesman, B. Gordesky-Gold, L. Sintasath, N. M. Bonini and L. S. Goldstein (2003). "Disruption of axonal transport by loss of huntingtin or expression of pathogenic polyQ proteins in *Drosophila*." *Neuron* **40**(1): 25-40.
- Gusella, J. F. and M. E. MacDonald (1995). "Huntington's disease." *Semin Cell Biol* **6**(1): 21-28.
- Halpin, M. (2011). "Diagnosis, psychiatry and neurology: the case of Huntington Disease." *Soc Sci Med* **73**(6): 858-865.
- Hantraye, P., D. Riche, M. Maziere and O. Isacson (1990). "A primate model of Huntington's disease: behavioral and anatomical studies of unilateral excitotoxic lesions of the caudate-putamen in the baboon." *Exp Neurol* **108**(2): 91-104.
- Harjes, P. and E. E. Wanker (2003). "The hunt for huntingtin function: interaction partners tell many different stories." *Trends Biochem Sci* **28**(8): 425-433.
- Hartfuss, E., R. Galli, N. Heins and M. Gotz (2001). "Characterization of CNS precursor subtypes and radial glia." *Dev Biol* **229**(1): 15-30.
- Hatten, M. E. (1999). "Central nervous system neuronal migration." *Annu Rev Neurosci* **22**: 511-539.
- Havel, L. S., C. E. Wang, B. Wade, B. Huang, S. Li and X. J. Li (2011). "Preferential accumulation of N-terminal mutant huntingtin in the nuclei of striatal neurons is regulated by phosphorylation." *Hum Mol Genet* **20**(7): 1424-1437.
- Hedreen, J. C., C. E. Peyser, S. E. Folstein and C. A. Ross (1991). "Neuronal loss in layers V and VI of cerebral cortex in Huntington's disease." *Neurosci Lett* **133**(2): 257-261.
- Heng, J. I., A. Chariot and L. Nguyen (2010). "Molecular layers underlying cytoskeletal remodelling during cortical development." *Trends Neurosci* **33**(1): 38-47.
- Heninger, G. R., P. L. Delgado and D. S. Charney (1996). "The revised monoamine theory of depression: a modulatory role for monoamines, based on new findings from monoamine depletion experiments in humans." *Pharmacopsychiatry* **29**(1): 2-11.
- Heuser, I. J., T. N. Chase and M. M. Mouradian (1991). "The limbic-hypothalamic-pituitary-adrenal axis in Huntington's disease." *Biol Psychiatry* **30**(9): 943-952.
- Hevner, R. F., L. Shi, N. Justice, Y. Hsueh, M. Sheng, S. Smiga, A. Bulfone, A. M. Goffinet, A. T. Campagnoni and J. L. Rubenstein (2001). "Tbr1 regulates differentiation of the preplate and layer 6." *Neuron* **29**(2): 353-366.

- Hickey, M. A., K. Gallant, G. G. Gross, M. S. Levine and M. F. Chesselet (2005). "Early behavioral deficits in R6/2 mice suitable for use in preclinical drug testing." *Neurobiol Dis* **20**(1): 1-11.
- Hilditch-Maguire, P., F. Trettel, L. A. Passani, A. Auerbach, F. Persichetti and M. E. MacDonald (2000). "Huntingtin: an iron-regulated protein essential for normal nuclear and perinuclear organelles." *Hum Mol Genet* **9**(19): 2789-2797.
- Ho, L. W., R. Brown, M. Maxwell, A. Wytttenbach and D. C. Rubinsztein (2001). "Wild type Huntingtin reduces the cellular toxicity of mutant Huntingtin in mammalian cell models of Huntington's disease." *J Med Genet* **38**(7): 450-452.
- Hobbs, N. Z., A. V. Pedrick, M. J. Say, C. Frost, R. Dar Santos, A. Coleman, A. Sturrock, D. Craufurd, J. C. Stout, B. R. Leavitt, J. Barnes, S. J. Tabrizi and R. I. Scahill (2011). "The structural involvement of the cingulate cortex in premanifest and early Huntington's disease." *Mov Disord* **26**(9): 1684-1690.
- Hodges, A., A. D. Strand, A. K. Aragaki, A. Kuhn, T. Sengstag, G. Hughes, L. A. Elliston, C. Hartog, D. R. Goldstein, D. Thu, Z. R. Hollingsworth, F. Collin, B. Synek, P. A. Holmans, A. B. Young, N. S. Wexler, M. Delorenzi, C. Kooperberg, S. J. Augood, R. L. Faull, J. M. Olson, L. Jones and R. Luthi-Carter (2006). "Regional and cellular gene expression changes in human Huntington's disease brain." *Hum Mol Genet* **15**(6): 965-977.
- Hoffner, G., P. Kahlem and P. Djian (2002). "Perinuclear localization of huntingtin as a consequence of its binding to microtubules through an interaction with beta-tubulin: relevance to Huntington's disease." *J Cell Sci* **115**(Pt 5): 941-948.
- Holbert, S., I. Denghien, T. Kiechle, A. Rosenblatt, C. Wellington, M. R. Hayden, R. L. Margolis, C. A. Ross, J. Dausset, R. J. Ferrante and C. Neri (2001). "The Gln-Ala repeat transcriptional activator CA150 interacts with huntingtin: neuropathologic and genetic evidence for a role in Huntington's disease pathogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(4): 1811-1816.
- Huang, E., D. Qu, Y. Zhang, K. Venderova, M. E. Haque, M. W. Rousseaux, R. S. Slack, J. M. Woulfe and D. S. Park (2010). "The role of Cdk5-mediated apurinic/aprimidinic endonuclease 1 phosphorylation in neuronal death." *Nat Cell Biol* **12**(6): 563-571.
- Huang, K., S. Sanders, R. Singaraja, P. Orban, T. Cijssouw, P. Arstikaitis, A. Yanai, M. R. Hayden and A. El-Husseini (2009). "Neuronal palmitoyl acyl transferases exhibit distinct substrate specificity." *FASEB J* **23**(8): 2605-2615.
- Humbert, S., E. A. Bryson, F. P. Cordelieres, N. C. Connors, S. R. Datta, S. Finkbeiner, M. E. Greenberg and F. Saudou (2002). "The IGF-1/Akt pathway is neuroprotective in Huntington's disease and involves Huntingtin phosphorylation by Akt." *Dev Cell* **2**(6): 831-837.
- Huntington, G. (1872). "On Chorea." *The Medical and Surgical Reporter: A Weekly Journal, (Philadelphia: S.W. Butler)* **26**(15): 317-321.
- Ikeda, H., M. Yamaguchi, S. Sugai, Y. Aze, S. Narumiya and A. Kakizuka (1996). "Expanded polyglutamine in the Machado-Joseph disease protein induces cell death in vitro and in vivo." *Nat Genet* **13**(2): 196-202.
- Ishizuka, K., A. Kamiya, E. C. Oh, H. Kanki, S. Seshadri, J. F. Robinson, H. Murdoch, A. J. Dunlop, K. Kubo, K. Furukori, B. Huang, M. Zeledon, A. Hayashi-Takagi, H. Okano, K. Nakajima, M. D. Houslay, N. Katsanis and A. Sawa (2011). "DISC1-dependent switch from progenitor proliferation to migration in the developing cortex." *Nature* **473**(7345): 92-96.
- Jacobsen, J. C., C. S. Bawden, S. R. Rudiger, C. J. McLaughlan, S. J. Reid, H. J. Waldvogel, M. E. MacDonald, J. F. Gusella, S. K. Walker, J. M. Kelly, G. C. Webb, R. L. Faull, M. I. Rees

- and R. G. Snell (2010). "An ovine transgenic Huntington's disease model." Hum Mol Genet **19**(10): 1873-1882.
- Jeong, H., F. Then, T. J. Melia, Jr., J. R. Mazzulli, L. Cui, J. N. Savas, C. Voisine, P. Paganetti, N. Tanese, A. C. Hart, A. Yamamoto and D. Krainc (2009). "Acetylation targets mutant huntingtin to autophagosomes for degradation." Cell **137**(1): 60-72.
- Jessberger, S., S. Aigner, G. D. Clemenson, Jr., N. Toni, D. C. Lie, O. Karalay, R. Overall, G. Kempermann and F. H. Gage (2008). "Cdk5 regulates accurate maturation of newborn granule cells in the adult hippocampus." PLoS Biol **6**(11): e272.
- Jessberger, S., F. H. Gage, A. J. Eisch and D. C. Lagace (2009). "Making a neuron: Cdk5 in embryonic and adult neurogenesis." Trends Neurosci **32**(11): 575-582.
- Johnson, R., R. J. Gamblin, L. Ooi, A. W. Bruce, I. J. Donaldson, D. R. Westhead, I. C. Wood, R. M. Jackson and N. J. Buckley (2006). "Identification of the REST regulon reveals extensive transposable element-mediated binding site duplication." Nucleic Acids Res **34**(14): 3862-3877.
- Julien, C. L., J. C. Thompson, S. Wild, P. Yardumian, J. S. Snowden, G. Turner and D. Craufurd (2007). "Psychiatric disorders in preclinical Huntington's disease." J Neurol Neurosurg Psychiatry **78**(9): 939-943.
- Kalchman, M. A., R. K. Graham, G. Xia, H. B. Koide, J. G. Hodgson, K. C. Graham, Y. P. Goldberg, R. D. Gietz, C. M. Pickart and M. R. Hayden (1996). "Huntingtin is ubiquitinated and interacts with a specific ubiquitin-conjugating enzyme." J Biol Chem **271**(32): 19385-19394.
- Kaltenbach, L. S., E. Romero, R. R. Becklin, R. Chettier, R. Bell, A. Phansalkar, A. Strand, C. Torcassi, J. Savage, A. Hurlburt, G. H. Cha, L. Ukani, C. L. Chepanoske, Y. Zhen, S. Sahasrabudhe, J. Olson, C. Kurschner, L. M. Ellerby, J. M. Peltier, J. Botas and R. E. Hughes (2007). "Huntingtin interacting proteins are genetic modifiers of neurodegeneration." PLoS Genet **3**(5): e82.
- Kawaguchi, A., T. Ikawa, T. Kasukawa, H. R. Ueda, K. Kurimoto, M. Saitou and F. Matsuzaki (2008). "Single-cell gene profiling defines differential progenitor subclasses in mammalian neurogenesis." Development **135**(18): 3113-3124.
- Kawauchi, T., K. Chihama, Y. Nabeshima and M. Hoshino (2006). "Cdk5 phosphorylates and stabilizes p27kip1 contributing to actin organization and cortical neuronal migration." Nat Cell Biol **8**(1): 17-26.
- Kempermann, G., H. G. Kuhn and F. H. Gage (1997). "More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment." Nature **386**(6624): 493-495.
- Kennedy, L. and P. F. Shelbourne (2000). "Dramatic mutation instability in HD mouse striatum: does polyglutamine load contribute to cell-specific vulnerability in Huntington's disease?" Hum Mol Genet **9**(17): 2539-2544.
- Keryer, G., J. R. Pineda, G. Liot, J. Kim, P. Dietrich, C. Benstaali, K. Smith, F. P. Cordelieres, N. Spassky, R. J. Ferrante, I. Dragatsis and F. Saudou (2011). "Ciliogenesis is regulated by a huntingtin-HAP1-PCM1 pathway and is altered in Huntington disease." J Clin Invest **121**(11): 4372-4382.
- Knoblich, J. A. (2008). "Mechanisms of asymmetric stem cell division." Cell **132**(4): 583-597.
- Knoth, R. L., S. C. Bolge, E. Kim and Q. V. Tran (2010). "Effect of inadequate response to treatment in patients with depression." Am J Manag Care **16**(8): e188-196.
- Konno, D., G. Shioi, A. Shitamukai, A. Mori, H. Kiyonari, T. Miyata and F. Matsuzaki (2008). "Neuroepithelial progenitors undergo LGN-dependent planar divisions to maintain self-renewability during mammalian neurogenesis." Nat Cell Biol **10**(1): 93-101.

- Kosodo, Y. and W. B. Huttner (2009). "Basal process and cell divisions of neural progenitors in the developing brain." *Dev Growth Differ* **51**(3): 251-261.
- Kriegstein, A. and A. Alvarez-Buylla (2009). "The glial nature of embryonic and adult neural stem cells." *Annu Rev Neurosci* **32**: 149-184.
- Kriegstein, A. R. and S. C. Noctor (2004). "Patterns of neuronal migration in the embryonic cortex." *Trends Neurosci* **27**(7): 392-399.
- Krishnan, V. and E. J. Nestler (2008). "The molecular neurobiology of depression." *Nature* **455**(7215): 894-902.
- Kuemmerle, S., C. A. Gutekunst, A. M. Klein, X. J. Li, S. H. Li, M. F. Beal, S. M. Hersch and R. J. Ferrante (1999). "Huntington aggregates may not predict neuronal death in Huntington's disease." *Ann Neurol* **46**(6): 842-849.
- Kuhn, A., D. R. Goldstein, A. Hodges, A. D. Strand, T. Sengstag, C. Kooperberg, K. Becanovic, M. A. Pouladi, K. Sathasivam, J. H. Cha, A. J. Hannan, M. R. Hayden, B. R. Leavitt, S. B. Dunnett, R. J. Ferrante, R. Albin, P. Shelbourne, M. Delorenzi, S. J. Augood, R. L. Faull, J. M. Olson, G. P. Bates, L. Jones and R. Luthi-Carter (2007). "Mutant huntingtin's effects on striatal gene expression in mice recapitulate changes observed in human Huntington's disease brain and do not differ with mutant huntingtin length or wild-type huntingtin dosage." *Hum Mol Genet* **16**(15): 1845-1861.
- Kumar, P., H. Kalonia and A. Kumar (2010). "Huntington's disease: pathogenesis to animal models." *Pharmacol Rep* **62**(1): 1-14.
- Kusakawa, G., T. Saito, R. Onuki, K. Ishiguro, T. Kishimoto and S. Hisanaga (2000). "Calpain-dependent proteolytic cleavage of the p35 cyclin-dependent kinase 5 activator to p25." *J Biol Chem* **275**(22): 17166-17172.
- Lagace, D. C., D. R. Benavides, J. W. Kamsy, M. Mapelli, P. Greengard, J. A. Bibb and A. J. Eisch (2008). "Cdk5 is essential for adult hippocampal neurogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(47): 18567-18571.
- Lancaster, M. A. and J. A. Knoblich (2012). "Spindle orientation in mammalian cerebral cortical development." *Curr Opin Neurobiol*.
- Lazarini, F., M. A. Mouthon, G. Gheusi, F. de Chaumont, J. C. Olivo-Marin, S. Lamarque, D. N. Abrous, F. D. Boussin and P. M. Lledo (2009). "Cellular and behavioral effects of cranial irradiation of the subventricular zone in adult mice." *PLoS One* **4**(9): e7017.
- Lazic, S. E., H. Grote, R. J. Armstrong, C. Blakemore, A. J. Hannan, A. van Dellen and R. A. Barker (2004). "Decreased hippocampal cell proliferation in R6/1 Huntington's mice." *Neuroreport* **15**(5): 811-813.
- Lazic, S. E., H. E. Grote, C. Blakemore, A. J. Hannan, A. van Dellen, W. Phillips and R. A. Barker (2006). "Neurogenesis in the R6/1 transgenic mouse model of Huntington's disease: effects of environmental enrichment." *Eur J Neurosci* **23**(7): 1829-1838.
- Leavitt, B. R., J. A. Guttman, J. G. Hodgson, G. H. Kimel, R. Singaraja, A. W. Vogl and M. R. Hayden (2001). "Wild-type huntingtin reduces the cellular toxicity of mutant huntingtin in vivo." *Am J Hum Genet* **68**(2): 313-324.
- Leavitt, B. R., J. M. van Raamsdonk, J. Shehadeh, H. Fernandes, Z. Murphy, R. K. Graham, C. L. Wellington, L. A. Raymond and M. R. Hayden (2006). "Wild-type huntingtin protects neurons from excitotoxicity." *J Neurochem* **96**(4): 1121-1129.
- Leblhuber, F., M. Peichl, C. Neubauer, F. Reisecker, F. X. Steinparz, E. Windhager and W. Maschek (1995). "Serum dehydroepiandrosterone and cortisol measurements in Huntington's chorea." *J Neurol Sci* **132**(1): 76-79.

- Lee, J. K., K. Mathews, B. Schlaggar, J. Perlmutter, J. S. Paulsen, E. Epping, L. Burmeister and P. Nopoulos (2012). "Measures of growth in children at risk for Huntington disease." *Neurology* **79**(7): 668-674.
- Lee, J. M., R. M. Pinto, T. Gillis, J. C. St Claire and V. C. Wheeler (2011). "Quantification of age-dependent somatic CAG repeat instability in Hdh CAG knock-in mice reveals different expansion dynamics in striatum and liver." *PLoS One* **6**(8): e23647.
- Lee, M. S., Y. T. Kwon, M. Li, J. Peng, R. M. Friedlander and L. H. Tsai (2000). "Neurotoxicity induces cleavage of p35 to p25 by calpain." *Nature* **405**(6784): 360-364.
- Lee, S., J. Jeong, Y. Kwak and S. K. Park (2010). "Depression research: where are we now?" *Mol Brain* **3**: 8.
- Lee, W. C., M. Yoshihara and J. T. Littleton (2004). "Cytoplasmic aggregates trap polyglutamine-containing proteins and block axonal transport in a Drosophila model of Huntington's disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(9): 3224-3229.
- Li, H., S. H. Li, Z. X. Yu, P. Shelbourne and X. J. Li (2001). "Huntingtin aggregate-associated axonal degeneration is an early pathological event in Huntington's disease mice." *J Neurosci* **21**(21): 8473-8481.
- Li, J. Y., M. Plomann and P. Brundin (2003). "Huntington's disease: a synaptopathy?" *Trends Mol Med* **9**(10): 414-420.
- Li, S. H., A. L. Cheng, H. Zhou, S. Lam, M. Rao, H. Li and X. J. Li (2002). "Interaction of Huntington disease protein with transcriptional activator Sp1." *Mol Cell Biol* **22**(5): 1277-1287.
- Li, S. H., C. A. Gutekunst, S. M. Hersch and X. J. Li (1998). "Interaction of huntingtin-associated protein with dynactin P150Glued." *J Neurosci* **18**(4): 1261-1269.
- Li, X., E. Sapp, K. Chase, L. A. Comer-Tierney, N. Masso, J. Alexander, P. Reeves, K. B. Kegel, A. Valencia, M. Esteves, N. Aronin and M. DiFiglia (2009). "Disruption of Rab11 activity in a knock-in mouse model of Huntington's disease." *Neurobiol Dis* **36**(2): 374-383.
- Li, X., E. Sapp, A. Valencia, K. B. Kegel, Z. H. Qin, J. Alexander, N. Masso, P. Reeves, J. J. Ritch, S. Zeitlin, N. Aronin and M. DiFiglia (2008). "A function of huntingtin in guanine nucleotide exchange on Rab11." *Neuroreport* **19**(16): 1643-1647.
- Li, X., C. Standley, E. Sapp, A. Valencia, Z. H. Qin, K. B. Kegel, J. Yoder, L. A. Comer-Tierney, M. Esteves, K. Chase, J. Alexander, N. Masso, L. Sobin, K. Bellve, R. Tuft, L. Lifshitz, K. Fogarty, N. Aronin and M. DiFiglia (2009). "Mutant huntingtin impairs vesicle formation from recycling endosomes by interfering with Rab11 activity." *Mol Cell Biol* **29**(22): 6106-6116.
- Li, X. J., S. H. Li, A. H. Sharp, F. C. Nucifora, Jr., G. Schilling, A. Lanahan, P. Worley, S. H. Snyder and C. A. Ross (1995). "A huntingtin-associated protein enriched in brain with implications for pathology." *Nature* **378**(6555): 398-402.
- Li, Y., B. W. Luikart, S. Birnbaum, J. Chen, C. H. Kwon, S. G. Kernie, R. Bassel-Duby and L. F. Parada (2008). "TrkB regulates hippocampal neurogenesis and governs sensitivity to antidepressive treatment." *Neuron* **59**(3): 399-412.
- Lin, C. H., S. Tallaksen-Greene, W. M. Chien, J. A. Cearley, W. S. Jackson, A. B. Crouse, S. Ren, X. J. Li, R. L. Albin and P. J. Detloff (2001). "Neurological abnormalities in a knock-in mouse model of Huntington's disease." *Hum Mol Genet* **10**(2): 137-144.
- Lin, H., T. Y. Lin and J. L. Juang (2007). "Abl deregulates Cdk5 kinase activity and subcellular localization in Drosophila neurodegeneration." *Cell Death Differ* **14**(3): 607-615.

- Liu, J. P. and S. O. Zeitlin (2011). "The long and the short of aberrant ciliogenesis in Huntington disease." *J Clin Invest* **121**(11): 4237-4241.
- Liu, M., S. J. Pleasure, A. E. Collins, J. L. Noebels, F. J. Naya, M. J. Tsai and D. H. Lowenstein (2000). "Loss of BETA2/NeuroD leads to malformation of the dentate gyrus and epilepsy." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(2): 865-870.
- Lo Sardo, V., C. Zuccato, G. Gaudenzi, B. Vitali, C. Ramos, M. Tartari, M. A. Myre, J. A. Walker, A. Pistocchi, L. Conti, M. Valenza, B. Drung, B. Schmidt, J. Gusella, S. Zeitlin, F. Cotelli and E. Cattaneo (2012). "An evolutionary recent neuroepithelial cell adhesion function of huntingtin implicates ADAM10-Ncadherin." *Nat Neurosci* **15**(5): 713-721.
- Lorincz, M. T. and V. A. Zawistowski (2009). "Expanded CAG repeats in the murine Huntington's disease gene increases neuronal differentiation of embryonic and neural stem cells." *Mol Cell Neurosci* **40**(1): 1-13.
- Low, V. F., M. Dragunow, L. J. Tippett, R. L. Faull and M. A. Curtis (2011). "No change in progenitor cell proliferation in the hippocampus in Huntington's disease." *Neuroscience* **199**: 577-588.
- Lu, Y., T. Li, H. Y. Qureshi, D. Han and H. K. Paudel (2011). "Early growth response 1 (Egr-1) regulates phosphorylation of microtubule-associated protein tau in mammalian brain." *J Biol Chem* **286**(23): 20569-20581.
- Luo, S. and D. C. Rubinsztein (2009). "Huntingtin promotes cell survival by preventing Pak2 cleavage." *J Cell Sci* **122**(Pt 6): 875-885.
- Luo, S., C. Vacher, J. E. Davies and D. C. Rubinsztein (2005). "Cdk5 phosphorylation of huntingtin reduces its cleavage by caspases: implications for mutant huntingtin toxicity." *J Cell Biol* **169**(4): 647-656.
- Luthi-Carter, R., A. Strand, N. L. Peters, S. M. Solano, Z. R. Hollingsworth, A. S. Menon, A. S. Frey, B. S. Spektor, E. B. Penney, G. Schilling, C. A. Ross, D. R. Borchelt, S. J. Tapscott, A. B. Young, J. H. Cha and J. M. Olson (2000). "Decreased expression of striatal signaling genes in a mouse model of Huntington's disease." *Hum Mol Genet* **9**(9): 1259-1271.
- Ma, D. K., W. R. Kim, G. L. Ming and H. Song (2009). "Activity-dependent extrinsic regulation of adult olfactory bulb and hippocampal neurogenesis." *Ann N Y Acad Sci* **1170**: 664-673.
- Macdonald, V. and G. Halliday (2002). "Pyramidal cell loss in motor cortices in Huntington's disease." *Neurobiol Dis* **10**(3): 378-386.
- Macdonald, V., G. M. Halliday, R. J. Trent and E. A. McCusker (1997). "Significant loss of pyramidal neurons in the angular gyrus of patients with Huntington's disease." *Neuropathol Appl Neurobiol* **23**(6): 492-495.
- Malatesta, P., I. Appolloni and F. Calzolari (2008). "Radial glia and neural stem cells." *Cell Tissue Res* **331**(1): 165-178.
- Malatesta, P., E. Hartfuss and M. Gotz (2000). "Isolation of radial glial cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage." *Development* **127**(24): 5253-5263.
- Mangiarini, L., K. Sathasivam, M. Seller, B. Cozens, A. Harper, C. Hetherington, M. Lawton, Y. Trotter, H. Lehrach, S. W. Davies and G. P. Bates (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.
- Manley, K., T. L. Shirley, L. Flaherty and A. Messer (1999). "Msh2 deficiency prevents in vivo somatic instability of the CAG repeat in Huntington disease transgenic mice." *Nat Genet* **23**(4): 471-473.

- Marcora, E., K. Gowan and J. E. Lee (2003). "Stimulation of NeuroD activity by huntingtin and huntingtin-associated proteins HAP1 and MLK2." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(16): 9578-9583.
- Matthews, K., D. Christmas, J. Swan and E. Sorrell (2005). "Animal models of depression: navigating through the clinical fog." Neurosci Biobehav Rev **29**(4-5): 503-513.
- McCarthy, D. M., X. Zhang, S. B. Darnell, G. R. Sangrey, Y. Yanagawa, G. Sadri-Vakili and P. G. Bhidé (2011). "Cocaine alters BDNF expression and neuronal migration in the embryonic mouse forebrain." J Neurosci **31**(38): 13400-13411.
- McGuire, J. R., J. Rong, S. H. Li and X. J. Li (2006). "Interaction of Huntingtin-associated protein-1 with kinesin light chain: implications in intracellular trafficking in neurons." J Biol Chem **281**(6): 3552-3559.
- Mehler, M. F. and S. Gokhan (2000). "Mechanisms underlying neural cell death in neurodegenerative diseases: alterations of a developmentally-mediated cellular rheostat." Trends Neurosci **23**(12): 599-605.
- Menalled, L. B. (2005). "Knock-in mouse models of Huntington's disease." NeuroRx **2**(3): 465-470.
- Metzler, M., L. Gan, G. Mazarei, R. K. Graham, L. Liu, N. Bissada, G. Lu, B. R. Leavitt and M. R. Hayden (2010). "Phosphorylation of huntingtin at Ser421 in YAC128 neurons is associated with protection of YAC128 neurons from NMDA-mediated excitotoxicity and is modulated by PP1 and PP2A." J Neurosci **30**(43): 14318-14329.
- Metzler, M., V. Legendre-Guillemain, L. Gan, V. Chopra, A. Kwok, P. S. McPherson and M. R. Hayden (2001). "HIP1 functions in clathrin-mediated endocytosis through binding to clathrin and adaptor protein 2." J Biol Chem **276**(42): 39271-39276.
- Milakovic, T. and G. V. Johnson (2005). "Mitochondrial respiration and ATP production are significantly impaired in striatal cells expressing mutant huntingtin." J Biol Chem **280**(35): 30773-30782.
- Milnerwood, A. J., D. M. Cummings, G. M. Dallerac, J. Y. Brown, S. C. Vatsavayai, M. C. Hirst, P. Rezaie and K. P. Murphy (2006). "Early development of aberrant synaptic plasticity in a mouse model of Huntington's disease." Hum Mol Genet **15**(10): 1690-1703.
- Ming, G. L. and H. Song (2005). "Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system." Annu Rev Neurosci **28**: 223-250.
- Ming, G. L. and H. Song (2011). "Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions." Neuron **70**(4): 687-702.
- Mitsushashi, T. and T. Takahashi (2009). "Genetic regulation of proliferation/differentiation characteristics of neural progenitor cells in the developing neocortex." Brain Dev **31**(7): 553-557.
- Miyata, T., A. Kawaguchi, H. Okano and M. Ogawa (2001). "Asymmetric inheritance of radial glial fibers by cortical neurons." Neuron **31**(5): 727-741.
- Miyata, T., D. Kawaguchi, A. Kawaguchi and Y. Gotoh (2010). "Mechanisms that regulate the number of neurons during mouse neocortical development." Curr Opin Neurobiol **20**(1): 22-28.
- Modregger, J., N. A. DiProspero, V. Charles, D. A. Tagle and M. Plomann (2002). "PACSIN 1 interacts with huntingtin and is absent from synaptic varicosities in presymptomatic Huntington's disease brains." Hum Mol Genet **11**(21): 2547-2558.
- Molero, A. E., S. Gokhan, S. Gonzalez, J. L. Feig, L. C. Alexandre and M. F. Mehler (2009). "Impairment of developmental stem cell-mediated striatal neurogenesis and

- pluripotency genes in a knock-in model of Huntington's disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(51): 21900-21905.
- Molyneaux, B. J., P. Arlotta, J. R. Menezes and J. D. Macklis (2007). "Neuronal subtype specification in the cerebral cortex." *Nat Rev Neurosci* **8**(6): 427-437.
- Montoya, A., B. H. Price, M. Menear and M. Lepage (2006). "Brain imaging and cognitive dysfunctions in Huntington's disease." *J Psychiatry Neurosci* **31**(1): 21-29.
- Moore, C. A., M. Perderiset, F. Francis, J. Chelly, A. Houdusse and R. A. Milligan (2004). "Mechanism of microtubule stabilization by doublecortin." *Mol Cell* **14**(6): 833-839.
- Morfini, G. A., Y. M. You, S. L. Pollema, A. Kaminska, K. Liu, K. Yoshioka, B. Bjorkblom, E. T. Coffey, C. Bagnato, D. Han, C. F. Huang, G. Banker, G. Pigino and S. T. Brady (2009). "Pathogenic huntingtin inhibits fast axonal transport by activating JNK3 and phosphorylating kinesin." *Nat Neurosci* **12**(7): 864-871.
- Murray, F., D. W. Smith and P. H. Hutson (2008). "Chronic low dose corticosterone exposure decreased hippocampal cell proliferation, volume and induced anxiety and depression like behaviours in mice." *Eur J Pharmacol* **583**(1): 115-127.
- Nasir, J., S. B. Floresco, J. R. O'Kusky, V. M. Diewert, J. M. Richman, J. Zeisler, A. Borowski, J. D. Marth, A. G. Phillips and M. R. Hayden (1995). "Targeted disruption of the Huntington's disease gene results in embryonic lethality and behavioral and morphological changes in heterozygotes." *Cell* **81**(5): 811-823.
- Nicolas, G., D. Devys, A. Goldenberg, D. Maltete, C. Herve, D. Hannequin and L. Guyant-Marechal (2011). "Juvenile Huntington disease in an 18-month-old boy revealed by global developmental delay and reduced cerebellar volume." *Am J Med Genet A* **155A**(4): 815-818.
- Niethammer, M., D. S. Smith, R. Ayala, J. Peng, J. Ko, M. S. Lee, M. Morabito and L. H. Tsai (2000). "NUDEL is a novel Cdk5 substrate that associates with LIS1 and cytoplasmic dynein." *Neuron* **28**(3): 697-711.
- Nikolic, M., M. M. Chou, W. Lu, B. J. Mayer and L. H. Tsai (1998). "The p35/Cdk5 kinase is a neuron-specific Rac effector that inhibits Pak1 activity." *Nature* **395**(6698): 194-198.
- Nishimura, Y. V., K. Sekine, K. Chihama, K. Nakajima, M. Hoshino, Y. Nabeshima and T. Kawauchi (2010). "Dissecting the factors involved in the locomotion mode of neuronal migration in the developing cerebral cortex." *J Biol Chem* **285**(8): 5878-5887.
- Nithianantharajah, J., C. Barkus, M. Murphy and A. J. Hannan (2008). "Gene-environment interactions modulating cognitive function and molecular correlates of synaptic plasticity in Huntington's disease transgenic mice." *Neurobiol Dis* **29**(3): 490-504.
- Noctor, S. C., A. C. Flint, T. A. Weissman, R. S. Dammerman and A. R. Kriegstein (2001). "Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex." *Nature* **409**(6821): 714-720.
- Noctor, S. C., A. C. Flint, T. A. Weissman, W. S. Wong, B. K. Clinton and A. R. Kriegstein (2002). "Dividing precursor cells of the embryonic cortical ventricular zone have morphological and molecular characteristics of radial glia." *J Neurosci* **22**(8): 3161-3173.
- Noctor, S. C., V. Martinez-Cerdeno, L. Ivic and A. R. Kriegstein (2004). "Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases." *Nat Neurosci* **7**(2): 136-144.
- Nopoulos, P. C., E. H. Aylward, C. A. Ross, J. A. Mills, D. R. Langbehn, H. J. Johnson, V. A. Magnotta, R. K. Pierson, L. J. Beglinger, M. A. Nance, R. A. Barker and J. S. Paulsen

- (2011). "Smaller intracranial volume in prodromal Huntington's disease: evidence for abnormal neurodevelopment." *Brain* **134**(Pt 1): 137-142.
- Nucifora, F. C., Jr., M. Sasaki, M. F. Peters, H. Huang, J. K. Cooper, M. Yamada, H. Takahashi, S. Tsuji, J. Troncoso, V. L. Dawson, T. M. Dawson and C. A. Ross (2001). "Interference by huntingtin and atrophin-1 with cbp-mediated transcription leading to cellular toxicity." *Science* **291**(5512): 2423-2428.
- Okamoto, S., M. A. Pouladi, M. Talantova, D. Yao, P. Xia, D. E. Ehrnhoefer, R. Zaidi, A. Clemente, M. Kaul, R. K. Graham, D. Zhang, H. S. Vincent Chen, G. Tong, M. R. Hayden and S. A. Lipton (2009). "Balance between synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor activity influences inclusions and neurotoxicity of mutant huntingtin." *Nat Med* **15**(12): 1407-1413.
- Ona, V. O., M. Li, J. P. Vonsattel, L. J. Andrews, S. Q. Khan, W. M. Chung, A. S. Frey, A. S. Menon, X. J. Li, P. E. Stieg, J. Yuan, J. B. Penney, A. B. Young, J. H. Cha and R. M. Friedlander (1999). "Inhibition of caspase-1 slows disease progression in a mouse model of Huntington's disease." *Nature* **399**(6733): 263-267.
- Ordway, J. M., S. Tallaksen-Greene, C. A. Gutekunst, E. M. Bernstein, J. A. Cearley, H. W. Wiener, L. S. t. Dure, R. Lindsey, S. M. Hersch, R. S. Johe, R. L. Albin and P. J. Detloff (1997). "Ectopically expressed CAG repeats cause intranuclear inclusions and a progressive late onset neurological phenotype in the mouse." *Cell* **91**(6): 753-763.
- Orr, A. L., S. Li, C. E. Wang, H. Li, J. Wang, J. Rong, X. Xu, P. G. Mastroberardino, J. T. Greenamyre and X. J. Li (2008). "N-terminal mutant huntingtin associates with mitochondria and impairs mitochondrial trafficking." *J Neurosci* **28**(11): 2783-2792.
- Orvoen, S., P. Pla, A. M. Gardier, F. Saudou and D. J. David (2012). "Huntington's disease knock-in male mice show specific anxiety-like behaviour and altered neuronal maturation." *Neurosci Lett* **507**(2): 127-132.
- Overstreet-Wadiche, L. S., A. L. Bensen and G. L. Westbrook (2006). "Delayed development of adult-generated granule cells in dentate gyrus." *J Neurosci* **26**(8): 2326-2334.
- Pal, A., F. Severin, B. Lommer, A. Shevchenko and M. Zerial (2006). "Huntingtin-HAP40 complex is a novel Rab5 effector that regulates early endosome motility and is up-regulated in Huntington's disease." *J Cell Biol* **172**(4): 605-618.
- Palidwor, G. A., S. Shcherbinin, M. R. Huska, T. Rasko, U. Stelzl, A. Arumughan, R. Foulle, P. Porras, L. Sanchez-Pulido, E. E. Wanker and M. A. Andrade-Navarro (2009). "Detection of alpha-rod protein repeats using a neural network and application to huntingtin." *PLoS Comput Biol* **5**(3): e1000304.
- Pang, T. Y., X. Du, M. S. Zajac, M. L. Howard and A. J. Hannan (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**(4): 753-766.
- Panov, A. V., C. A. Gutekunst, B. R. Leavitt, M. R. Hayden, J. R. Burke, W. J. Strittmatter and J. T. Greenamyre (2002). "Early mitochondrial calcium defects in Huntington's disease are a direct effect of polyglutamines." *Nat Neurosci* **5**(8): 731-736.
- Paoletti, P., I. Vila, M. Rife, J. M. Lizcano, J. Alberch and S. Gines (2008). "Dopaminergic and glutamatergic signaling crosstalk in Huntington's disease neurodegeneration: the role of p25/cyclin-dependent kinase 5." *J Neurosci* **28**(40): 10090-10101.
- Pardo, R., E. Colin, E. Regulier, P. Aebischer, N. Deglon, S. Humbert and F. Saudou (2006). "Inhibition of calcineurin by FK506 protects against polyglutamine-huntingtin

- toxicity through an increase of huntingtin phosphorylation at S421." *J Neurosci* **26**(5): 1635-1645.
- Park, K. H. J., G. Lu, J. Fan, L. A. Raymond and B. R. Leavitt (2012). "Decreasing Levels of the cdk5 Activators, p25 and p35, Reduces Excitotoxicity in Striatal Neurons " *Journal of Huntington's Disease* **1**(1): 97-104.
- Pearson, C. E. (2003). "Slipping while sleeping? Trinucleotide repeat expansions in germ cells." *Trends Mol Med* **9**(11): 490-495.
- Peng, Q., N. Masuda, M. Jiang, Q. Li, M. Zhao, C. A. Ross and W. Duan (2008). "The antidepressant sertraline improves the phenotype, promotes neurogenesis and increases BDNF levels in the R6/2 Huntington's disease mouse model." *Exp Neurol* **210**(1): 154-163.
- Perera, T. D., A. J. Dwork, K. A. Keegan, L. Thirumangalakudi, C. M. Lipira, N. Joyce, C. Lange, J. D. Higley, G. Rosoklija, R. Hen, H. A. Sackeim and J. D. Coplan (2011). "Necessity of hippocampal neurogenesis for the therapeutic action of antidepressants in adult nonhuman primates." *PLoS One* **6**(4): e17600.
- Perutz, M. F., T. Johnson, M. Suzuki and J. T. Finch (1994). "Glutamine repeats as polar zippers: their possible role in inherited neurodegenerative diseases." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(12): 5355-5358.
- Petersen, A. and M. Bjorkqvist (2006). "Hypothalamic-endocrine aspects in Huntington's disease." *Eur J Neurosci* **24**(4): 961-967.
- Petrik, D., D. C. Lagace and A. J. Eisch (2012). "The neurogenesis hypothesis of affective and anxiety disorders: are we mistaking the scaffolding for the building?" *Neuropharmacology* **62**(1): 21-34.
- Phillips, W., A. J. Morton and R. A. Barker (2005). "Abnormalities of neurogenesis in the R6/2 mouse model of Huntington's disease are attributable to the in vivo microenvironment." *J Neurosci* **25**(50): 11564-11576.
- Piedrahita, D., I. Hernandez, A. Lopez-Tobon, D. Fedorov, B. Obara, B. S. Manjunath, R. L. Boudreau, B. Davidson, F. Laferla, J. C. Gallego-Gomez, K. S. Kosik and G. P. Cardona-Gomez (2010). "Silencing of CDK5 reduces neurofibrillary tangles in transgenic alzheimer's mice." *J Neurosci* **30**(42): 13966-13976.
- Pietropaolo, S., A. Guilleminot, B. Martin, F. R. D'Amato and W. E. Crusio (2011). "Genetic-background modulation of core and variable autistic-like symptoms in Fmr1 knock-out mice." *PLoS One* **6**(2): e17073.
- Pigott, H. E., A. M. Leventhal, G. S. Alter and J. J. Boren (2010). "Efficacy and effectiveness of antidepressants: current status of research." *Psychother Psychosom* **79**(5): 267-279.
- Pineda, J. R., R. Pardo, D. Zala, H. Yu, S. Humbert and F. Saudou (2009). "Genetic and pharmacological inhibition of calcineurin corrects the BDNF transport defect in Huntington's disease." *Mol Brain* **2**: 33.
- Pinto, L. and M. Gotz (2007). "Radial glial cell heterogeneity--the source of diverse progeny in the CNS." *Prog Neurobiol* **83**(1): 2-23.
- Pollard, S. M. and L. Conti (2007). "Investigating radial glia in vitro." *Prog Neurobiol* **83**(1): 53-67.
- Postiglione, M. P., C. Juschke, Y. Xie, G. A. Haas, C. Charalambous and J. A. Knoblich (2011). "Mouse inscuteable induces apical-basal spindle orientation to facilitate intermediate progenitor generation in the developing neocortex." *Neuron* **72**(2): 269-284.
- Pouladi, M. A., R. K. Graham, J. M. Karasinska, Y. Xie, R. D. Santos, A. Petersen and M. R. Hayden (2009). "Prevention of depressive behaviour in the YAC128 mouse model

- of Huntington disease by mutation at residue 586 of huntingtin." *Brain* **132**(Pt 4): 919-932.
- Przedborski, S., V. Jackson-Lewis, R. Djaldetti, G. Liberatore, M. Vila, S. Vukosavic and G. Almer (2000). "The parkinsonian toxin MPTP: action and mechanism." *Restor Neurol Neurosci* **16**(2): 135-142.
- Purves, D., F. D., W. S.M., M. O.J., A. J.G., K. C.L. and L. A.-S. (2001). "Neuroscience, United-State."
- Qin, Z. H. and Z. L. Gu (2004). "Huntingtin processing in pathogenesis of Huntington disease." *Acta Pharmacol Sin* **25**(10): 1243-1249.
- Qu, D., J. Rashidian, M. P. Mount, H. Aleyasin, M. Parsanejad, A. Lira, E. Haque, Y. Zhang, S. Callaghan, M. Daigle, M. W. Rousseaux, R. S. Slack, P. R. Albert, I. Vincent, J. M. Woulfe and D. S. Park (2007). "Role of Cdk5-mediated phosphorylation of Prx2 in MPTP toxicity and Parkinson's disease." *Neuron* **55**(1): 37-52.
- Rainer, Q., L. Xia, J. P. Guilloux, C. Gabriel, E. Mocaer, R. Hen, E. Enhamre, A. M. Gardier and D. J. David (2011). "Beneficial behavioural and neurogenic effects of agomelatine in a model of depression/anxiety." *Int J Neuropsychopharmacol*: 1-15.
- Rakic, P. (1971). "Guidance of neurons migrating to the fetal monkey neocortex." *Brain Res* **33**(2): 471-476.
- Rakic, P. (1971). "Neuron-glia relationship during granule cell migration in developing cerebellar cortex. A Golgi and electronmicroscopic study in Macacus Rhesus." *J Comp Neurol* **141**(3): 283-312.
- Rakic, P., A. E. Ayoub, J. J. Breunig and M. H. Dominguez (2009). "Decision by division: making cortical maps." *Trends Neurosci* **32**(5): 291-301.
- Ramon y Cajal, S. (1913). "Degeneration and regeneration of the nervous system." **London**(Oxford Univ. Press).
- Ranen, N. G., O. C. Stine, M. H. Abbott, M. Sherr, A. M. Codori, M. L. Franz, N. I. Chao, A. S. Chung, N. Pleasant, C. Callahan and et al. (1995). "Anticipation and instability of IT-15 (CAG)_n repeats in parent-offspring pairs with Huntington disease." *Am J Hum Genet* **57**(3): 593-602.
- Rangone, H., G. Poizat, J. Troncoso, C. A. Ross, M. E. MacDonald, F. Saudou and S. Humbert (2004). "The serum- and glucocorticoid-induced kinase SGK inhibits mutant huntingtin-induced toxicity by phosphorylating serine 421 of huntingtin." *Eur J Neurosci* **19**(2): 273-279.
- Ratovitski, T., E. Chighladze, N. Arbez, T. Boronina, S. Herbrich, R. N. Cole and C. A. Ross (2012). "Huntingtin protein interactions altered by polyglutamine expansion as determined by quantitative proteomic analysis." *Cell Cycle* **11**(10): 2006-2021.
- Rawlins, M. (2010). "Huntington's disease out of the closet?" *Lancet* **376**(9750): 1372-1373.
- Reddy, P. H. and U. P. Shirendeb (2012). "Mutant huntingtin, abnormal mitochondrial dynamics, defective axonal transport of mitochondria, and selective synaptic degeneration in Huntington's disease." *Biochim Biophys Acta* **1822**(2): 101-110.
- Reddy, P. H., M. Williams, V. Charles, L. Garrett, L. Pike-Buchanan, W. O. Whetsell, Jr., G. Miller and D. A. Tagle (1998). "Behavioural abnormalities and selective neuronal loss in HD transgenic mice expressing mutated full-length HD cDNA." *Nat Genet* **20**(2): 198-202.
- Reiner, A., N. Del Mar, C. A. Meade, H. Yang, I. Dragatsis, S. Zeitlin and D. Goldowitz (2001). "Neurons lacking huntingtin differentially colonize brain and survive in chimeric mice." *J Neurosci* **21**(19): 7608-7619.

- Renoir, T., M. S. Zajac, X. Du, T. Y. Pang, L. Leang, C. Chevarin, L. Lanfumey and A. J. Hannan (2011). "Sexually dimorphic serotonergic dysfunction in a mouse model of Huntington's disease and depression." *PLoS One* **6**(7): e22133.
- Reynolds, D. S., R. J. Carter and A. J. Morton (1998). "Dopamine modulates the susceptibility of striatal neurons to 3-nitropropionic acid in the rat model of Huntington's disease." *J Neurosci* **18**(23): 10116-10127.
- Rigamonti, D., J. H. Bauer, C. De-Fraja, L. Conti, S. Sipione, C. Sciorati, E. Clementi, A. Hackam, M. R. Hayden, Y. Li, J. K. Cooper, C. A. Ross, S. Govoni, C. Vincenz and E. Cattaneo (2000). "Wild-type huntingtin protects from apoptosis upstream of caspase-3." *J Neurosci* **20**(10): 3705-3713.
- Rigamonti, D., S. Sipione, D. Goffredo, C. Zuccato, E. Fossale and E. Cattaneo (2001). "Huntingtin's neuroprotective activity occurs via inhibition of procaspase-9 processing." *J Biol Chem* **276**(18): 14545-14548.
- Rising, A. C., J. Xu, A. Carlson, V. V. Napoli, E. M. Denovan-Wright and R. J. Mandel (2011). "Longitudinal behavioral, cross-sectional transcriptional and histopathological characterization of a knock-in mouse model of Huntington's disease with 140 CAG repeats." *Exp Neurol* **228**(2): 173-182.
- Ritch, J. J., A. Valencia, J. Alexander, E. Sapp, L. Gatune, G. R. Sangrey, S. Sinha, C. M. Scherber, S. Zeitlin, G. Sadri-Vakili, D. Irimia, M. Difiglia and K. B. Kegel (2012). "Multiple phenotypes in Huntington disease mouse neural stem cells." *Mol Cell Neurosci* **50**(1): 70-81.
- Rockabrand, E., N. Slepko, A. Pantalone, V. N. Nukala, A. Kazantsev, J. L. Marsh, P. G. Sullivan, J. S. Steffan, S. L. Sensi and L. M. Thompson (2007). "The first 17 amino acids of Huntingtin modulate its sub-cellular localization, aggregation and effects on calcium homeostasis." *Hum Mol Genet* **16**(1): 61-77.
- Rodgers, R. J., E. Boullier, P. Chatzimichalaki, G. D. Cooper and A. Shorten (2002). "Contrasting phenotypes of C57BL/6J^{OlaHsd}, 129S2/Sv^{Hsd} and 129/SvEv mice in two exploration-based tests of anxiety-related behaviour." *Physiol Behav* **77**(2-3): 301-310.
- Rosas, H. D., D. H. Salat, S. Y. Lee, A. K. Zaleta, V. Pappu, B. Fischl, D. Greve, N. Hevelone and S. M. Hersch (2008). "Cerebral cortex and the clinical expression of Huntington's disease: complexity and heterogeneity." *Brain* **131**(Pt 4): 1057-1068.
- Rosenblatt, A. and I. Leroi (2000). "Neuropsychiatry of Huntington's disease and other basal ganglia disorders." *Psychosomatics* **41**(1): 24-30.
- Ross, C. A. (1997). "Intranuclear neuronal inclusions: a common pathogenic mechanism for glutamine-repeat neurodegenerative diseases?" *Neuron* **19**(6): 1147-1150.
- Ross, C. A. and S. J. Tabrizi (2011). "Huntington's disease: from molecular pathogenesis to clinical treatment." *Lancet Neurol* **10**(1): 83-98.
- Sahara, S. and D. D. O'Leary (2009). "Fgf10 regulates transition period of cortical stem cell differentiation to radial glia controlling generation of neurons and basal progenitors." *Neuron* **63**(1): 48-62.
- Sahay, A. and R. Hen (2007). "Adult hippocampal neurogenesis in depression." *Nat Neurosci* **10**(9): 1110-1115.
- Saleh, N., S. Moutereau, A. Durr, P. Krystkowiak, J. P. Azulay, C. Tranchant, E. Broussolle, F. Morin, A. C. Bachoud-Levi and P. Maison (2009). "Neuroendocrine disturbances in Huntington's disease." *PLoS One* **4**(3): e4962.
- Samuels, B. A. and R. Hen (2011). "Neurogenesis and affective disorders." *Eur J Neurosci* **33**(6): 1152-1159.

- Santarelli, L., M. Saxe, C. Gross, A. Surget, F. Battaglia, S. Dulawa, N. Weisstaub, J. Lee, R. Duman, O. Arancio, C. Belzung and R. Hen (2003). "Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants." *Science* **301**(5634): 805-809.
- Sapolsky, R. M. (2004). "Is impaired neurogenesis relevant to the affective symptoms of depression?" *Biol Psychiatry* **56**(3): 137-139.
- Sasaki, S., A. Shionoya, M. Ishida, M. J. Gambello, J. Yingling, A. Wynshaw-Boris and S. Hirotsune (2000). "A LIS1/NUDEL/cytoplasmic dynein heavy chain complex in the developing and adult nervous system." *Neuron* **28**(3): 681-696.
- Saudou, F., S. Finkbeiner, D. Devys and M. E. Greenberg (1998). "Huntingtin acts in the nucleus to induce apoptosis but death does not correlate with the formation of intranuclear inclusions." *Cell* **95**(1): 55-66.
- Sauvageot, C. M. and C. D. Stiles (2002). "Molecular mechanisms controlling cortical gliogenesis." *Curr Opin Neurobiol* **12**(3): 244-249.
- Sawa, A., E. Nagata, S. Sutcliffe, P. Dullor, M. B. Cascio, Y. Ozeki, S. Roy, C. A. Ross and S. H. Snyder (2005). "Huntingtin is cleaved by caspases in the cytoplasm and translocated to the nucleus via perinuclear sites in Huntington's disease patient lymphoblasts." *Neurobiol Dis* **20**(2): 267-274.
- Schaar, B. T. and S. K. McConnell (2005). "Cytoskeletal coordination during neuronal migration." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(38): 13652-13657.
- Schilling, B., J. Gafni, C. Torcassi, X. Cong, R. H. Row, M. A. LaFevre-Bernt, M. P. Cusack, T. Ratovitski, R. Hirschhorn, C. A. Ross, B. W. Gibson and L. M. Ellerby (2006). "Huntingtin phosphorylation sites mapped by mass spectrometry. Modulation of cleavage and toxicity." *J Biol Chem* **281**(33): 23686-23697.
- Schilling, G., M. W. Becher, A. H. Sharp, H. A. Jinnah, K. Duan, J. A. Kotzok, H. H. Slunt, T. Ratovitski, J. K. Cooper, N. A. Jenkins, N. G. Copeland, D. L. Price, C. A. Ross and D. R. Borchelt (1999). "Intranuclear inclusions and neuritic aggregates in transgenic mice expressing a mutant N-terminal fragment of huntingtin." *Hum Mol Genet* **8**(3): 397-407.
- Schilling, G., A. V. Savonenko, A. Klevytska, J. L. Morton, S. M. Tucker, M. Poirier, A. Gale, N. Chan, V. Gonzales, H. H. Slunt, M. L. Coonfield, N. A. Jenkins, N. G. Copeland, C. A. Ross and D. R. Borchelt (2004). "Nuclear-targeting of mutant huntingtin fragments produces Huntington's disease-like phenotypes in transgenic mice." *Hum Mol Genet* **13**(15): 1599-1610.
- Schulte, J. and J. T. Littleton (2011). "The biological function of the Huntingtin protein and its relevance to Huntington's Disease pathology." *Curr Trends Neurol* **5**: 65-78.
- Serra, H. G., L. Duvick, T. Zu, K. Carlson, S. Stevens, N. Jorgensen, A. Lysholm, E. Burright, H. Y. Zoghbi, H. B. Clark, J. M. Andresen and H. T. Orr (2006). "RORalpha-mediated Purkinje cell development determines disease severity in adult SCA1 mice." *Cell* **127**(4): 697-708.
- Sessa, A., C. A. Mao, A. K. Hadjantonakis, W. H. Klein and V. Broccoli (2008). "Tbr2 directs conversion of radial glia into basal precursors and guides neuronal amplification by indirect neurogenesis in the developing neocortex." *Neuron* **60**(1): 56-69.
- Sheline, Y. I. (2003). "Neuroimaging studies of mood disorder effects on the brain." *Biol Psychiatry* **54**(3): 338-352.
- Shimojo, M. (2008). "Huntingtin regulates RE1-silencing transcription factor/neuron-restrictive silencer factor (REST/NRSF) nuclear trafficking indirectly through a

- complex with REST/NRSF-interacting LIM domain protein (RILP) and dynactin p150 Glued." *J Biol Chem* **283**(50): 34880-34886.
- Shirendeb, U. P., M. J. Calkins, M. Manczak, V. Anekonda, B. Dufour, J. L. McBride, P. Mao and P. H. Reddy (2012). "Mutant huntingtin's interaction with mitochondrial protein Drp1 impairs mitochondrial biogenesis and causes defective axonal transport and synaptic degeneration in Huntington's disease." *Hum Mol Genet* **21**(2): 406-420.
- Sieradzan, K. A. and D. M. Mann (2001). "The selective vulnerability of nerve cells in Huntington's disease." *Neuropathol Appl Neurobiol* **27**(1): 1-21.
- Silver, D. L., D. E. Watkins-Chow, K. C. Schreck, T. J. Pierfelice, D. M. Larson, A. J. Burnetti, H. J. Liaw, K. Myung, C. A. Walsh, N. Gaiano and W. J. Pavan (2010). "The exon junction complex component Magoh controls brain size by regulating neural stem cell division." *Nat Neurosci* **13**(5): 551-558.
- Simpson, J. M., J. Gil-Mohapel, M. A. Pouladi, M. Ghilan, Y. Xie, M. R. Hayden and B. R. Christie (2011). "Altered adult hippocampal neurogenesis in the YAC128 transgenic mouse model of Huntington disease." *Neurobiol Dis* **41**(2): 249-260.
- Singh, K. K., X. Ge, Y. Mao, L. Drane, K. Meletis, B. A. Samuels and L. H. Tsai (2010). "Dixdc1 is a critical regulator of DISC1 and embryonic cortical development." *Neuron* **67**(1): 33-48.
- Slow, E. J., J. van Raamsdonk, D. Rogers, S. H. Coleman, R. K. Graham, Y. Deng, R. Oh, N. Bissada, S. M. Hossain, Y. Z. Yang, X. J. Li, E. M. Simpson, C. A. Gutekunst, B. R. Leavitt and M. R. Hayden (2003). "Selective striatal neuronal loss in a YAC128 mouse model of Huntington disease." *Hum Mol Genet* **12**(13): 1555-1567.
- Smith, P. D., S. J. Crocker, V. Jackson-Lewis, K. L. Jordan-Sciutto, S. Hayley, M. P. Mount, M. J. O'Hare, S. Callaghan, R. S. Slack, S. Przedborski, H. Anisman and D. S. Park (2003). "Cyclin-dependent kinase 5 is a mediator of dopaminergic neuron loss in a mouse model of Parkinson's disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(23): 13650-13655.
- Snyder, J. S., A. Soumier, M. Brewer, J. Pickel and H. A. Cameron (2011). "Adult hippocampal neurogenesis buffers stress responses and depressive behaviour." *Nature* **476**(7361): 458-461.
- Song, C., Y. Zhang, C. G. Parsons and Y. F. Liu (2003). "Expression of polyglutamine-expanded huntingtin induces tyrosine phosphorylation of N-methyl-D-aspartate receptors." *J Biol Chem* **278**(35): 33364-33369.
- Spinney, L. (2010). "Uncovering the true prevalence of Huntington's disease." *Lancet Neurol* **9**(8): 760-761.
- Stahnisch, F. W. and R. Nitsch (2002). "Santiago Ramon y Cajal's concept of neuronal plasticity: the ambiguity lives on." *Trends Neurosci* **25**(11): 589-591.
- Steffan, J. S., N. Agrawal, J. Pallos, E. Rockabrand, L. C. Trotman, N. Slepko, K. Illes, T. Lukacsovich, Y. Z. Zhu, E. Cattaneo, P. P. Pandolfi, L. M. Thompson and J. L. Marsh (2004). "SUMO modification of Huntingtin and Huntington's disease pathology." *Science* **304**(5667): 100-104.
- Steffan, J. S., A. Kazantsev, O. Spasic-Boskovic, M. Greenwald, Y. Z. Zhu, H. Gohler, E. E. Wanker, G. P. Bates, D. E. Housman and L. M. Thompson (2000). "The Huntington's disease protein interacts with p53 and CREB-binding protein and represses transcription." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(12): 6763-6768.
- Strehlow, A. N., J. Z. Li and R. M. Myers (2007). "Wild-type huntingtin participates in protein trafficking between the Golgi and the extracellular space." *Hum Mol Genet* **16**(4): 391-409.

- Stricker, S. H., K. Meiri and M. Gotz (2006). "P-GAP-43 is enriched in horizontal cell divisions throughout rat cortical development." *Cereb Cortex* **16 Suppl 1**: i121-131.
- Su, S. C. and L. H. Tsai (2011). "Cyclin-dependent kinases in brain development and disease." *Annu Rev Cell Dev Biol* **27**: 465-491.
- Subramaniam, S., K. M. Sixt, R. Barrow and S. H. Snyder (2009). "Rhes, a striatal specific protein, mediates mutant-huntingtin cytotoxicity." *Science* **324**(5932): 1327-1330.
- Sun, Y., A. Savanenin, P. H. Reddy and Y. F. Liu (2001). "Polyglutamine-expanded huntingtin promotes sensitization of N-methyl-D-aspartate receptors via post-synaptic density 95." *J Biol Chem* **276**(27): 24713-24718.
- Swami, M., A. E. Hendricks, T. Gillis, T. Massood, J. Mysore, R. H. Myers and V. C. Wheeler (2009). "Somatic expansion of the Huntington's disease CAG repeat in the brain is associated with an earlier age of disease onset." *Hum Mol Genet* **18**(16): 3039-3047.
- Szebenyi, G., G. A. Morfini, A. Babcock, M. Gould, K. Selkoe, D. L. Stenoien, M. Young, P. W. Faber, M. E. MacDonald, M. J. McPhaul and S. T. Brady (2003). "Neuropathogenic forms of huntingtin and androgen receptor inhibit fast axonal transport." *Neuron* **40**(1): 41-52.
- Tabata, H., S. Yoshinaga and K. Nakajima (2012). "Cytoarchitecture of mouse and human subventricular zone in developing cerebral neocortex." *Exp Brain Res* **216**(2): 161-168.
- Takahashi, M., E. Iseki and K. Kosaka (2000). "Cdk5 and munc-18/p67 co-localization in early stage neurofibrillary tangles-bearing neurons in Alzheimer type dementia brains." *J Neurol Sci* **172**(1): 63-69.
- Tanaka, T., F. F. Serneo, H. C. Tseng, A. B. Kulkarni, L. H. Tsai and J. G. Gleeson (2004). "Cdk5 phosphorylation of doublecortin ser297 regulates its effect on neuronal migration." *Neuron* **41**(2): 215-227.
- Tang, X. and L. D. Sanford (2005). "Home cage activity and activity-based measures of anxiety in 129P3/J, 129X1/SvJ and C57BL/6J mice." *Physiol Behav* **84**(1): 105-115.
- Tartari, M., C. Gissi, V. Lo Sardo, C. Zuccato, E. Picardi, G. Pesole and E. Cattaneo (2008). "Phylogenetic comparison of huntingtin homologues reveals the appearance of a primitive polyQ in sea urchin." *Mol Biol Evol* **25**(2): 330-338.
- Taverna, E. and W. B. Huttner (2010). "Neural progenitor nuclei IN motion." *Neuron* **67**(6): 906-914.
- Taylor, A. M., M. Blurton-Jones, S. W. Rhee, D. H. Cribbs, C. W. Cotman and N. L. Jeon (2005). "A microfluidic culture platform for CNS axonal injury, regeneration and transport." *Nat Methods* **2**(8): 599-605.
- Teri, L. and A. Wagner (1992). "Alzheimer's disease and depression." *J Consult Clin Psychol* **60**(3): 379-391.
- Thompson, L. M., C. T. Aiken, L. S. Kaltenbach, N. Agrawal, K. Illes, A. Khoshnan, M. Martinez-Vincente, M. Arrasate, J. G. O'Rourke, H. Khashwji, T. Lukacsovich, Y. Z. Zhu, A. L. Lau, A. Massey, M. R. Hayden, S. O. Zeitlin, S. Finkbeiner, K. N. Green, F. M. LaFerla, G. Bates, L. Huang, P. H. Patterson, D. C. Lo, A. M. Cuervo, J. L. Marsh and J. S. Steffan (2009). "IKK phosphorylates Huntingtin and targets it for degradation by the proteasome and lysosome." *J Cell Biol* **187**(7): 1083-1099.
- Thu, D. C., D. E. Oorschot, L. J. Tippet, A. L. Nana, V. M. Hogg, B. J. Synek, R. Luthi-Carter, H. J. Waldvogel and R. L. Faull (2010). "Cell loss in the motor and cingulate cortex

- correlates with symptomatology in Huntington's disease." *Brain* **133**(Pt 4): 1094-1110.
- Tong, Y., T. J. Ha, L. Liu, A. Nishimoto, A. Reiner and D. Goldowitz (2011). "Spatial and temporal requirements for huntingtin (Htt) in neuronal migration and survival during brain development." *J Neurosci* **31**(41): 14794-14799.
- Trushina, E., R. B. Dyer, J. D. Badger, 2nd, D. Ure, L. Eide, D. D. Tran, B. T. Vrieze, V. Legendre-Guillemain, P. S. McPherson, B. S. Mandavilli, B. Van Houten, S. Zeitlin, M. McNiven, R. Aebersold, M. Hayden, J. E. Parisi, E. Seeberg, I. Dragatsis, K. Doyle, A. Bender, C. Chacko and C. T. McMurray (2004). "Mutant huntingtin impairs axonal trafficking in mammalian neurons in vivo and in vitro." *Mol Cell Biol* **24**(18): 8195-8209.
- Trushina, E., R. D. Singh, R. B. Dyer, S. Cao, V. H. Shah, R. G. Parton, R. E. Pagano and C. T. McMurray (2006). "Mutant huntingtin inhibits clathrin-independent endocytosis and causes accumulation of cholesterol in vitro and in vivo." *Hum Mol Genet* **15**(24): 3578-3591.
- Tsai, J. W., K. H. Bremner and R. B. Vallee (2007). "Dual subcellular roles for LIS1 and dynein in radial neuronal migration in live brain tissue." *Nat Neurosci* **10**(8): 970-979.
- Tsai, J. W., W. N. Lian, S. Kemal, A. R. Kriegstein and R. B. Vallee (2010). "Kinesin 3 and cytoplasmic dynein mediate interkinetic nuclear migration in neural stem cells." *Nat Neurosci* **13**(12): 1463-1471.
- Tuoc, T. C., K. Radyushkin, A. B. Tonchev, M. C. Pinon, R. Ashery-Padan, Z. Molnar, M. S. Davidoff and A. Stoykova (2009). "Selective cortical layering abnormalities and behavioral deficits in cortex-specific Pax6 knock-out mice." *J Neurosci* **29**(26): 8335-8349.
- Valenza, M. and E. Cattaneo (2006). "Cholesterol dysfunction in neurodegenerative diseases: is Huntington's disease in the list?" *Prog Neurobiol* **80**(4): 165-176.
- van den Bogaard, S. J., E. M. Dumas, L. Ferrarini, J. Milles, M. A. van Buchem, J. van der Grond and R. A. Roos (2011). "Shape analysis of subcortical nuclei in Huntington's disease, global versus local atrophy--results from the TRACK-HD study." *J Neurol Sci* **307**(1-2): 60-68.
- van der Burg, J. M., M. Bjorkqvist and P. Brundin (2009). "Beyond the brain: widespread pathology in Huntington's disease." *Lancet Neurol* **8**(8): 765-774.
- van Duijn, E., E. M. Kingma and R. C. van der Mast (2007). "Psychopathology in verified Huntington's disease gene carriers." *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* **19**(4): 441-448.
- Velier, J., M. Kim, C. Schwarz, T. W. Kim, E. Sapp, K. Chase, N. Aronin and M. DiFiglia (1998). "Wild-type and mutant huntingtins function in vesicle trafficking in the secretory and endocytic pathways." *Exp Neurol* **152**(1): 34-40.
- Ventrucci, A. and A. M. Cuervo (2007). "Autophagy and neurodegeneration." *Curr Neurol Neurosci Rep* **7**(5): 443-451.
- Voikar, V., S. Koks, E. Vasar and H. Rauvala (2001). "Strain and gender differences in the behavior of mouse lines commonly used in transgenic studies." *Physiol Behav* **72**(1-2): 271-281.
- von Bohlen und Halbach, O. (2011). "Immunohistological markers for proliferative events, gliogenesis, and neurogenesis within the adult hippocampus." *Cell Tissue Res* **345**(1): 1-19.
- von Horsten, S., I. Schmitt, H. P. Nguyen, C. Holzmann, T. Schmidt, T. Walther, M. Bader, R. Pabst, P. Kobbe, J. Krotova, D. Stiller, A. Kask, A. Vaarmann, S. Rathke-Hartlieb, J. B.

- Schulz, U. Grasshoff, I. Bauer, A. M. Vieira-Saecker, M. Paul, L. Jones, K. S. Lindenberg, B. Landwehrmeyer, A. Bauer, X. J. Li and O. Riess (2003). "Transgenic rat model of Huntington's disease." *Hum Mol Genet* **12**(6): 617-624.
- Vukovic, J., D. G. Blackmore, D. Jhaveri and P. F. Bartlett (2011). "Activation of neural precursors in the adult neurogenic niches." *Neurochem Int* **59**(3): 341-346.
- Waldron-Roby, E., T. Ratovitski, X. Wang, M. Jiang, E. Watkin, N. Arbez, R. K. Graham, M. R. Hayden, Z. Hou, S. Mori, D. Swing, M. Pletnikov, W. Duan, L. Tessarollo and C. A. Ross (2012). "Transgenic mouse model expressing the caspase 6 fragment of mutant huntingtin." *J Neurosci* **32**(1): 183-193.
- Walker, F. O. (2007). "Huntington's disease." *Lancet* **369**(9557): 218-228.
- Warby, S. C., C. N. Doty, R. K. Graham, J. B. Carroll, Y. Z. Yang, R. R. Singaraja, C. M. Overall and M. R. Hayden (2008). "Activated caspase-6 and caspase-6-cleaved fragments of huntingtin specifically colocalize in the nucleus." *Hum Mol Genet* **17**(15): 2390-2404.
- Warby, S. C., H. Visscher, J. A. Collins, C. N. Doty, C. Carter, S. L. Butland, A. R. Hayden, I. Kanazawa, C. J. Ross and M. R. Hayden (2011). "HTT haplotypes contribute to differences in Huntington disease prevalence between Europe and East Asia." *Eur J Hum Genet* **19**(5): 561-566.
- Watakabe, A. (2009). "Comparative molecular neuroanatomy of mammalian neocortex: what can gene expression tell us about areas and layers?" *Dev Growth Differ* **51**(3): 343-354.
- Weissman, T., S. C. Noctor, B. K. Clinton, L. S. Honig and A. R. Kriegstein (2003). "Neurogenic radial glial cells in reptile, rodent and human: from mitosis to migration." *Cereb Cortex* **13**(6): 550-559.
- Wellington, C. L., L. M. Ellerby, A. S. Hackam, R. L. Margolis, M. A. Trifiro, R. Singaraja, K. McCutcheon, G. S. Salvesen, S. S. Propp, M. Bromm, K. J. Rowland, T. Zhang, D. Rasper, S. Roy, N. Thornberry, L. Pinsky, A. Kakizuka, C. A. Ross, D. W. Nicholson, D. E. Bredesen and M. R. Hayden (1998). "Caspase cleavage of gene products associated with triplet expansion disorders generates truncated fragments containing the polyglutamine tract." *J Biol Chem* **273**(15): 9158-9167.
- Wen, Y., E. Planel, M. Herman, H. Y. Figueroa, L. Wang, L. Liu, L. F. Lau, W. H. Yu and K. E. Duff (2008). "Interplay between cyclin-dependent kinase 5 and glycogen synthase kinase 3 beta mediated by neuregulin signaling leads to differential effects on tau phosphorylation and amyloid precursor protein processing." *J Neurosci* **28**(10): 2624-2632.
- Wen, Y., W. H. Yu, B. Maloney, J. Bailey, J. Ma, I. Marie, T. Maurin, L. Wang, H. Figueroa, M. Herman, P. Krishnamurthy, L. Liu, E. Planel, L. F. Lau, D. K. Lahiri and K. Duff (2008). "Transcriptional regulation of beta-secretase by p25/cdk5 leads to enhanced amyloidogenic processing." *Neuron* **57**(5): 680-690.
- Wexler, A. (2010). "Stigma, history, and Huntington's disease." *Lancet* **376**(9734): 18-19.
- Wexler, N. S. (2012). "Huntington's disease: advocacy driving science." *Annu Rev Med* **63**: 1-22.
- Wexler, N. S., A. B. Young, R. E. Tanzi, H. Travers, S. Starosta-Rubinstein, J. B. Penney, S. R. Snodgrass, I. Shoulson, F. Gomez, M. A. Ramos Arroyo and et al. (1987). "Homozygotes for Huntington's disease." *Nature* **326**(6109): 194-197.
- Wheeler, V. C., W. Auerbach, J. K. White, J. Srinidhi, A. Auerbach, A. Ryan, M. P. Duyao, V. Vrbanc, M. Weaver, J. F. Gusella, A. L. Joyner and M. E. MacDonald (1999). "Length-dependent gametic CAG repeat instability in the Huntington's disease knock-in mouse." *Hum Mol Genet* **8**(1): 115-122.

- White, J. K., W. Auerbach, M. P. Duyao, J. P. Vonsattel, J. F. Gusella, A. L. Joyner and M. E. MacDonald (1997). "Huntingtin is required for neurogenesis and is not impaired by the Huntington's disease CAG expansion." *Nat Genet* **17**(4): 404-410.
- Xia, J., D. H. Lee, J. Taylor, M. Vandelft and R. Truant (2003). "Huntingtin contains a highly conserved nuclear export signal." *Hum Mol Genet* **12**(12): 1393-1403.
- Xie, Z., L. Y. Moy, K. Sanada, Y. Zhou, J. J. Buchman and L. H. Tsai (2007). "Cep120 and TACCs control interkinetic nuclear migration and the neural progenitor pool." *Neuron* **56**(1): 79-93.
- Xie, Z., K. Sanada, B. A. Samuels, H. Shih and L. H. Tsai (2003). "Serine 732 phosphorylation of FAK by Cdk5 is important for microtubule organization, nuclear movement, and neuronal migration." *Cell* **114**(4): 469-482.
- Yamamori, T. and K. S. Rockland (2006). "Neocortical areas, layers, connections, and gene expression." *Neurosci Res* **55**(1): 11-27.
- Yamanaka, T., A. Tosaki, H. Miyazaki, M. Kurosawa, Y. Furukawa, M. Yamada and N. Nukina (2010). "Mutant huntingtin fragment selectively suppresses Brn-2 POU domain transcription factor to mediate hypothalamic cell dysfunction." *Hum Mol Genet* **19**(11): 2099-2112.
- Yanai, A., K. Huang, R. Kang, R. R. Singaraja, P. Arstikaitis, L. Gan, P. C. Orban, A. Mullard, C. M. Cowan, L. A. Raymond, R. C. Drisdell, W. N. Green, B. Ravikumar, D. C. Rubinsztein, A. El-Husseini and M. R. Hayden (2006). "Palmitoylation of huntingtin by HIP14 is essential for its trafficking and function." *Nat Neurosci* **9**(6): 824-831.
- Yang, S. H., P. H. Cheng, H. Banta, K. Piotrowska-Nitsche, J. J. Yang, E. C. Cheng, B. Snyder, K. Larkin, J. Liu, J. Orkin, Z. H. Fang, Y. Smith, J. Bachevalier, S. M. Zola, S. H. Li, X. J. Li and A. W. Chan (2008). "Towards a transgenic model of Huntington's disease in a non-human primate." *Nature* **453**(7197): 921-924.
- Yingling, J., Y. H. Youn, D. Darling, K. Toyo-Oka, T. Pramparo, S. Hirotune and A. Wynshaw-Boris (2008). "Neuroepithelial stem cell proliferation requires LIS1 for precise spindle orientation and symmetric division." *Cell* **132**(3): 474-486.
- Zajac, M. S., T. Y. Pang, N. Wong, B. Weinrich, L. S. Leang, J. M. Craig, R. Saffery and A. J. Hannan (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): 621-636.
- Zala, D., E. Colin, H. Rangone, G. Liot, S. Humbert and F. Saudou (2008). "Phosphorylation of mutant huntingtin at S421 restores anterograde and retrograde transport in neurons." *Hum Mol Genet* **17**(24): 3837-3846.
- Zambello, E., L. Zanetti, G. F. Hedou, O. Angelici, R. Arban, R. O. Tazan, G. Sperk and L. Caberlotto (2011). "Neuropeptide Y-Y2 receptor knockout mice: influence of genetic background on anxiety-related behaviors." *Neuroscience* **176**: 420-430.
- Zeitlin, S., J. P. Liu, D. L. Chapman, V. E. Papaioannou and A. Efstratiadis (1995). "Increased apoptosis and early embryonic lethality in mice nullizygous for the Huntington's disease gene homologue." *Nat Genet* **11**(2): 155-163.
- Zhang, Y., B. R. Leavitt, J. M. van Raamsdonk, I. Dragatsis, D. Goldowitz, M. E. MacDonald, M. R. Hayden and R. M. Friedlander (2006). "Huntingtin inhibits caspase-3 activation." *EMBO J* **25**(24): 5896-5906.
- Zhang, Y., M. Li, M. Drozda, M. Chen, S. Ren, R. O. Mejia Sanchez, B. R. Leavitt, E. Cattaneo, R. J. Ferrante, M. R. Hayden and R. M. Friedlander (2003). "Depletion of wild-type huntingtin in mouse models of neurologic diseases." *J Neurochem* **87**(1): 101-106.

- Zhao, C., W. Deng and F. H. Gage (2008). "Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis." *Cell* **132**(4): 645-660.
- Zheng, Y. L., N. D. Amin, Y. F. Hu, P. Rudrabhatla, V. Shukla, J. Kanungo, S. Kesavapany, P. Grant, W. Albers and H. C. Pant (2010). "A 24-residue peptide (p5), derived from p35, the Cdk5 neuronal activator, specifically inhibits Cdk5-p25 hyperactivity and tau hyperphosphorylation." *J Biol Chem* **285**(44): 34202-34212.
- Zhu, W. L., H. S. Shi, S. J. Wang, C. M. Xu, W. G. Jiang, X. Wang, P. Wu, Q. Q. Li, Z. B. Ding and L. Lu (2012). "Increased Cdk5/p35 activity in the dentate gyrus mediates depressive-like behaviour in rats." *Int J Neuropsychopharmacol* **15**(6): 795-809.
- Zuccato, C., N. Belyaev, P. Conforti, L. Ooi, M. Tartari, E. Papadimou, M. MacDonald, E. Fossale, S. Zeitlin, N. Buckley and E. Cattaneo (2007). "Widespread disruption of repressor element-1 silencing transcription factor/neuron-restrictive silencer factor occupancy at its target genes in Huntington's disease." *J Neurosci* **27**(26): 6972-6983.
- Zuccato, C. and E. Cattaneo (2007). "Role of brain-derived neurotrophic factor in Huntington's disease." *Prog Neurobiol* **81**(5-6): 294-330.
- Zuccato, C., M. Tartari, A. Crotti, D. Goffredo, M. Valenza, L. Conti, T. Cataudella, B. R. Leavitt, M. R. Hayden, T. Timmusk, D. Rigamonti and E. Cattaneo (2003). "Huntingtin interacts with REST/NRSF to modulate the transcription of NRSE-controlled neuronal genes." *Nat Genet* **35**(1): 76-83.
- Zuccato, C., M. Valenza and E. Cattaneo (2010). "Molecular mechanisms and potential therapeutical targets in Huntington's disease." *Physiol Rev* **90**(3): 905-981.