



HAL
open science

Analyse d'un peptide P42 protecteur de la maladie de Huntington

Simon Couly

► **To cite this version:**

Simon Couly. Analyse d'un peptide P42 protecteur de la maladie de Huntington. Sciences agricoles. Université Montpellier, 2018. Français. NNT : 2018MONTT022 . tel-01925318

HAL Id: tel-01925318

<https://theses.hal.science/tel-01925318>

Submitted on 16 Nov 2018

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.

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Biologie Santé

École doctorale : Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé (CBS2)

Unité de recherche : MMDN, Mécanismes Moléculaires dans les Démences Neurodégénératives (U1198)

ANALYSE D'UN PEPTIDE P42 PROTECTEUR DE LA MALADIE DE HUNTINGTON

Présentée par Simon COULY

Le 18 octobre 2018

Sous la direction de Florence MASCHAT

Devant le jury composé de

Chantal MATHIS, DR, Laboratoire de Neurosciences Cognitives et Adaptatives (Strasbourg)

Yvon TROTTIER, DR, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (Strasbourg)

Frédérique SCAMPS, CR, Institut des Neurosciences de Montpellier (Montpellier)

Emmanuel BROUILLET, DU, Laboratoire de Maladies Neurodégénératives (Fontenay-aux-Roses)

Jean-Maurice DURA, DR, Institut de Génétique Humaine (Montpellier)

Florence MASCHAT, DR, Mécanismes Moléculaires dans les Démences Neurodégénératives
(Montpellier)

Rapporteur

Rapporteur

Examinatrice

Examineur

Président du jury

Directrice de thèse



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Biologie Santé

École doctorale : Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé (CBS2)

Unité de recherche : MMDN, Mécanismes Moléculaires dans les Démences Neurodégénératives (U1198)

ANALYSE D'UN PEPTIDE P42 PROTECTEUR DE LA MALADIE DE HUNTINGTON

Présentée par Simon COULY

Le 18 octobre 2018

Sous la direction de Florence MASCHAT

Devant le jury composé de

Chantal MATHIS, DR, Laboratoire de Neurosciences Cognitives et Adaptatives (Strasbourg)	Rapporteur
Yvon TROTTIER, DR, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (Strasbourg)	Rapporteur
Frédérique SCAMPS, CR, Institut des Neurosciences de Montpellier (Montpellier)	Examinatrice
Emmanuel BROUILLET, DU, Laboratoire de Maladies Neurodégénératives (Fontenay-aux-Roses)	Examineur
Jean-Maurice DURA, DR, Institut de Génétique Humaine (Montpellier)	Président du jury
Florence MASCHAT, DR, Mécanismes Moléculaires dans les Démences Neurodégénératives (Montpellier)	Directrice de thèse



Remerciements

Je remercie sincèrement les membres du jury, **Chantal Mathis**, **Yvon Trottier** et **Emmanuel Brouillet**, d'avoir accepté de prendre du temps pour évaluer mon travail et d'assister à ma soutenance de thèse.

Pour cette magnifique aventure qu'aura été la thèse, la personne que je souhaite en particulier remercier est **Florence Maschat**, ma directrice de thèse. Je souhaite la remercier d'avoir cru en moi et de m'avoir donné une chance, une chance de faire mes preuves dans le milieu de la recherche. Je souhaite également la remercier pour tous ce qu'elle m'a enseigné tout au long de ces 3 années dans son équipe, que ce soit d'un point de vue scientifique ou humain. Et finalement je souhaite la remercier d'avoir toujours été à l'écoute et compréhensive.

Je remercie chaleureusement **Frédérique Scamps** qui, en plus de faire partie du jury de thèse, a participé aux différents comités de thèse. Je la remercie aussi pour m'avoir accueilli lors de mon premier stage en laboratoire il y a de ça 6 ans.

Je remercie **Jean-Maurice Dura** qui, tout comme Frédérique, a participé aux comités de thèse en plus de participer au jury de thèse. Aussi, je le remercie d'avoir accepté la présidence du jury de thèse.

Je remercie **Michel Vignes** pour toutes les connaissances et l'aide qu'il m'a apporté dans de nombreux domaines et en particulier en électrophysiologie.

Je remercie **Tanguy Maurice** pour toutes les connaissances qu'il m'a transmises, en particulier sur le comportement animal et en statistique, mais je le remercie aussi pour les nombreuses discussions très enrichissantes sur des sujets divers et variés que j'ai eu avec lui durant ces 3 années.

Je remercie également tous les membres de mon équipe, en particulier **Nathalie Bonneaud** et **Jean-Charles Liévens** qui chacun à leur façon m'ont permis de m'améliorer, de progresser, de grandir.

Je tiens à remercier aussi **chacun des membres du laboratoire MMDN** qui m'ont accueilli il y a 3 ans. C'est en partie grâce à eux et en particulier **Lucie Crouzier**, si pendant ces 3 ans tous les jours (ou presque) j'ai été heureux d'aller travailler.

Pour finir, je tiens à remercier toute ma famille, si je suis ce que je suis, et que je fais ce que je fais, c'est en particulier grâce à eux. Je remercie notamment **Caroline Angelard**, ma sœur, docteur en biologie, qui m'a inspiré tout le long de mes études. Et finalement je remercie mes parents, **Alain Couly** et **Monique Bultel-Herment** sans qui je ne serais pas là.

Résumé

La maladie de Huntington (MH) est une maladie neurodégénérative progressive héréditaire. Aucun traitement curatif n'a encore été trouvé. La MH est provoquée par une mutation dans le gène *HTT* induisant l'augmentation anormale du domaine PolyQ contenue dans la Huntingtine (Htt), la protéine codée par le gène *HTT*. Les conséquences et les mécanismes de cette mutation sont maintenant bien décrits et ont permis d'identifier une interaction importante entre la Htt et la voie de signalisation du BDNF. Le BDNF est un facteur neurotrophique qui joue des rôles importants, à travers l'activation de son récepteur TrkB, dans le développement et le maintien des neurones et également dans la plasticité des réseaux synaptiques. La Htt mutante (mHtt) diminue l'expression et le transport du BDNF et de TrkB dans les neurones.

P42, une partie de 23 acides aminés de la Htt, est capable de sauver de nombreux phénotypes pathologiques induits dans la MH.

L'objectif de ma thèse est de mieux comprendre les mécanismes d'action de P42, dans le but d'optimiser son potentiel thérapeutique. Pour cela, j'ai développé plusieurs expériences sur plusieurs modèles.

Dans un article, publié dans *HMG*, je montre les effets d'un traitement avec P42 sur la voie de signalisation BDNF/TrkB dans un modèle de MH : les souris R6/2. Pour cela, j'ai analysé plusieurs phénotypes pathologiques, comportements et mécanismes cellulaires développés par les souris R6/2 et connus pour être dépendants de la voie BDNF/TrkB. J'ai également mesuré les taux d'ARNm et de protéines, du BDNF et de TrkB, dans le cortex et le striatum. Ce que j'ai trouvé est que P42 agit sur la voie BDNF/TrkB principalement en augmentant l'expression de TrkB dans le striatum.

Afin d'observer l'effet de P42 sur le transport vésiculaire, j'ai également utilisé la drosophile comme modèle. Grâce à ce modèle, j'ai pu observer *in vivo* le transport vésiculaire dans différentes conditions avec ou sans mHtt ou P42.

Egalement, dans le but de mieux suivre l'évolution des différents phénotypes pathologiques induits par la MH et l'effet du traitement par P42, j'ai expérimenté le Hamlet test[®], un test innovant multi-comportemental.

Enfin, j'ai observé sur les souris R6/2, l'effet d'une bithérapie P42 avec P3, un peptide ciblant les effets toxiques induits par les ARNm codants pour un PolyQ.

Tous ces résultats permettent de mieux comprendre les mécanismes d'action de P42.

Abstract

Huntington's disease (HD) is a rare genetic neurodegenerative disorder. Curative treatments are still actively sought. HD is induced by a mutation in the *HTT* gene inducing an abnormal expansion of the polyQ domain contained in the Huntingtin protein (Htt). Mechanisms and consequences of this mutation are now well described and allowed to identify an interaction of the Htt with the BDNF signaling pathway. BDNF is a neurotrophic factor, which plays important roles, through TrkB, one of its receptor, in neuronal development and plasticity. Mutant Htt (mHtt) down-regulates BDNF and TrkB transcription and transport along the axons.

P42, a part of the Htt protein, is a 23aa peptide able to rescue HD pathological phenotypes, such as aggregation, axonal transport and neuronal viability.

The aim of my PhD was to better understand the mechanisms of action of P42, in a purpose to optimize its therapeutic potential. To this end I developed different studies using different models.

In a paper now accepted for publication in *HMG*, I first used a P42-based treatment on R6/2 HD mice, to analyze the effect of P42 on the BDNF/TrkB signaling pathway. To this end I analyzed pathologic phenotypes: behaviors or cell mechanisms developing in R6/2 mice that are related to the BDNF/TrkB pathway. I also measured BDNF and TrkB, mRNA or protein levels in both striatum and cortex. What I found is that P42 is acting on BDNF/TrkB pathway mainly by increasing the protein level of TrkB in the striatum.

To observe the effect of P42 on vesicular transport, I rather used a *Drosophila* model, to perform live imaging based studies, in different transgenic conditions: with or without mHtt or P42.

Also, in a way to better follow the progression of different pathological phenotypes and the effect of treatments on R6/2 mice, I benefited from a very recent and innovative tool, the HAMLET, which allows a multi-behavioral test.

Finally, a bitherapy was tested on R6/2 mice combining P42 and P3, a peptide raised against PolyQ mRNA that are also toxic.

All those results contribute to a better understanding of P42 mechanisms of action.

Prologue

Extrait de *Hunting Down Huntington's* par Andrew Revkin, 1^{er} décembre 1993:

From the shores of Maracaibo to the halls of Washington, Nancy Wexler has spent 25 years stalking her mother's killer

« Joseph Hartman and his wife, Marilyn, smile stiffly as they sit in the Ben Franklin room of the University of Pennsylvania's student union. He is gaunt and pale, with a long face and cropped, graying hair. She has the delicate frame of a songbird and is prim and neat in glasses and a green and white floral-print dress. They might be posing for a picture--a modern version of American Gothic--except that Joseph Hartman's body is in constant motion.

Two dozen physicians and biologists politely but intently inspect Hartman as his case is presented by his neurologist. Hartman (not his real name) first sought medical help 13 years ago, complaining of irritability, lack of sleep, the jitters. He soon became unable to work and began to lose his short-term memory.

Only after many years did the chorea begin. The word comes from the Greek for dance, and that is exactly what Hartman is doing now. His hands dart and float in the air as if manipulated by an inebriated puppeteer. His head has a looseness that recalls those toy puppies whose heads once bobbed in the rear windows of American sedans. He watches his own limbs as if from a distance, occasionally reasserting control long enough to force a hand to grasp at the fabric of his pant leg or scratch the nape of his neck. Inevitably, his body rebels and resumes its dance. It is a dance of death. »

Pour ne pas oublier.

Table des matières

Table des figures	ix
Lexique	xii
Chapitre I. Introduction.....	1
Partie 1. La maladie de Huntington	1
I.1.1. Historique	2
I.1.2. Aspect clinique	4
I.1.2.1. Epidémiologie	4
I.1.2.2. Les symptômes et leur évolution	7
I.1.2.2.1. Symptômes d'ordre moteur.....	9
I.1.2.2.2. Symptômes d'ordre cognitif.....	10
I.1.2.2.3. Symptômes d'ordre psychiatrique	10
I.1.2.2.4. Autres phénotypes et causes de la létalité	10
I.1.2.3. Traitements.....	12
I.1.3. Aspect moléculaire	14
I.1.3.1. Le gène : <i>HTT</i>	14
I.1.3.2. La protéine : Huntingtine	18
I.1.3.2.1. Structures	18
I.1.3.2.1.1. Evolutions et conservations.....	18
I.1.3.2.1.2. Structures primaires, secondaires, tertiaires et quaternaires	21
I.1.3.2.2. Fonctions.....	27
I.1.3.2.2.1. Interactomes.....	27
I.1.3.2.2.2. Développement	29
I.1.3.2.2.3. Survie cellulaire	31
I.1.3.2.2.4. Transport vésiculaire	33
I.1.3.2.2.5. Régulation de la transcription	36
I.1.3.2.2.6. Autres fonctions	37
Partie 2. Physiopathologie de la voie de signalisation BDNF/TrkB	41
I.2.1. Le striatum et les ganglions de la base	41
I.2.2. BDNF/TrkB	46
I.2.3. La voie BDNF/TrkB dans la maladie de Huntington	51
Partie 3. Présentation du peptide P42.....	53
I.3.1. P42	53
I.3.2. Le modèle : Souris R6/2	55
I.3.3. P42TAT et la technologie Aonys®	57
I.3.4. Effet d'un traitement en pré-symptomatique	58
Chapitre II. Résultats.....	60
Partie 1. Amélioration de la voie du BDNF par P42 dans la maladie de Huntington	61
II.1.1. Effet d'un traitement post-symptomatique	62
II.1.1.1. Taille des ventricules.....	62
II.1.1.2. Coordination motrice.....	64
II.1.1.3. Agrégats	65
II.1.2. Effet de P42T sur les taux de transcrit et de protéine du BDNF et de TrkB	67
II.1.2.1. Cortex et Striatum.....	67
II.1.2.2. Hippocampe.....	72
II.1.2.3. Conclusion des résultats sur les taux de transcrits et de protéines.....	73
II.1.3. Effet de P42T sur le comportement	74
II.1.3.1. Anxiété	75

II.1.3.2.	Mémoire	79
II.1.3.3.	Clasping et évolution du poids.....	83
II.1.3.4.	Conclusion des résultats comportementaux	84
II.1.4.	Effet de P42T sur la plasticité synaptique	85
II.1.4.1.	Effet du traitement	86
II.1.4.2.	Effet de l'application directe de P42TAT.....	88
II.1.5.	Effet de P42T sur des souris sauvages.....	90
II.1.5.1.	Comportements et biochimie	90
II.1.5.2.	Plasticité synaptique	94
II.1.6.	Activité calcique	98
II.1.6.1.	Effet de P42TAT.....	98
II.1.6.2.	Effet de P42TAT en présence d'antagonistes du BDNF.....	100
II.1.7.	Données complémentaires	102
II.1.7.1.	Profils protéiques du BDNF.....	102
II.1.7.2.	Evolution de transcrits en aval de la voie BDNF/TrkB.....	108
II.1.7.3.	Evolution de transcrits en amont de la voie BDNF/TrkB.....	110
II.1.8.	Conclusions	111
Partie 2.	P42 et transport vésiculaire	113
II.2.1.	Effet de P42 sur le transport de DNT1.....	113
II.2.1.1.	Effet de P42 sur la vitesse et le sens du déplacement de DNT1	115
II.2.1.2.	Effet de P42 sur le nombre de vésicules de DNT1 le long des microtubules	120
II.2.2.	Effet de P42 sur le transport en condition physiologique.....	121
II.2.3.	Colocalisation de P42 avec les microtubules.....	127
Partie 3.	Hamlet : dispositif permettant de suivre l'évolution de la MH et de P42	129
II.3.1.	Utilisation du Hamlet pour le suivi de la MH et du traitement par P42	131
II.3.1.1.	Résultats du test de mémoire topographique	132
II.3.1.2.	Résultats entraînements.....	132
II.3.2.	Hamlet environnement ultra-enrichi : effet sur les souris R6/2.....	135
Partie 4.	P3 et bithérapie	138
II.4.1.	Effet de P3a et de la bithérapie sur les souris R6/2	140
II.4.2.	Effet de P3 sur les souris Wt.....	142
Chapitre III.	Discussion générale	147
Partie 1.	Axe : recherche fondamentale	147
III.1.1.	P42 en condition pathologique	148
III.1.2.	P42 en condition physiologique	152
Partie 2.	Axe : recherche appliquée.....	153
Partie 3.	Conclusion générale.....	154
Matériels et méthodes	155	
Données supplémentaires	162	
Bibliographie.....	169	
Article publié.....	181	

Table des figures

Chapitre I

Figure I-1 Emplacement du striatum dans le cerveau humain.....	1
Figure I-2 Arbre généalogique d'une famille atteinte de MH.....	4
Figure I-3 Arbres généalogiques montrant des cas sporadiques de MH.....	7
Figure I-4 Age d'apparition des symptômes et leur durée jusqu'au décès en fonction du polyQ.....	8
Figure I-5 Schéma des différentes catégories de patients en fonction de la taille du PolyQ.....	9
Figure I-6 Evolution du cerveau d'un patient atteint de MH.....	11
Figure I-7 Apparition et évolution des différents signes cliniques et neurobiologiques de la MH.....	11
Figure I-8 Représentation des différentes étapes de développement d'un médicament.....	13
Figure I-9 Représentation du chromosome 4 humain.....	15
Figure I-10 Taux d'expression de HTT dans l'organisme.....	16
Figure I-11 Evolution de l'expression de HTT au cours du développement.....	17
Figure I-12 Représentation des séquences des gènes de HTT chez l'Homme et de ses homologues dans différentes espèces.....	18
Figure I-13 Représentation des séquences des gènes de HTT chez l'Homme et de ses homologues dans différentes espèces (2).....	20
Figure I-14 Arbre phylogénique des espèces présentées dans le tableau précédent.....	20
Figure I-15 Représentation 3D de la structure de l'exon 1 de la Htt.....	22
Figure I-16 Structure de la Htt.....	23
Figure I-17 Représentation des différentes conformations de la Htt.....	26
Figure I-18 Interactome de la Htt.....	28
Figure I-19 Représentation de la Htt et de ses interactions dans le complexe moteur.....	35
Figure I-20 Représentation de la liaison corticostriatale.....	38
Figure I-21 Illustration du striatum.....	41
Figure I-22 Schéma anatomique des ganglions de la base.....	42
Figure I-23 Schéma du fonctionnement des ganglions de la base.....	43
Figure I-24 Schéma de la maturation du BDNF.....	46
Figure I-25 Les cascades de signalisation activées par TrkB.....	48
Figure I-26 Dualité ProBDNF/p75 vs BDNF/TrkB.....	49
Figure I-27 Schéma de la Htt.....	54

Chapitre II

Figure II-1 Traitement pré-symptomatique et post-symptomatique.....	61
Figure II-2 P42T.....	62
Figure II-3 Etudes histologiques.....	63
Figure II-4 Rotarod : coordination motrice.....	64
Figure II-5 Nombre et taille des agrégats de mHtt.....	66
Figure II-6 Taux de transcrits et de protéines dans le cortex.....	69
Figure II-7 Taux de transcrits et de protéines dans le striatum.....	71
Figure II-8 Taux de transcrits et de protéines dans l'hippocampe.....	73
Figure II-9 Effet de P42T sur l'anxiété : boîte noire et boîte blanche.....	76
Figure II-10 Effet de P42T sur l'anxiété : test en champ ouvert.....	78
Figure II-11 Effet de P42T sur la mémoire.....	80
Figure II-12 Habituation au champ ouvert.....	82

Figure II-13 Clasping et évolution du poids	84
Figure II-14 Effet de P42T sur la plasticité synaptique	87
Figure II-15 Application de P42T sur des souris R6/2	89
Figure II-16 Effet de P42T sur le comportement de souris sauvages	91
Figure II-17 Effet de P42T sur le taux de transcrits et de protéines chez des souris sauvages	93
Figure II-18 Effet de l'application de P42TAT chez des souris sauvages	95
Figure II-19 Protocole de paired-pulse	97
Figure II-20 Effet de l'application de P42TAT sur l'activité de neurones	99
Figure II-21 Effet de P42T en présence d'antagonistes du BDNF	101
Figure II-22 Profils protéiques Wt NT.....	103
Figure II-23 Profil protéique du BDNF dans le cortex	105
Figure II-24 Profil protéique du striatum.....	106
Figure II-25 Profil protéique du BDNF dans l'hippocampe	107
Figure II-26 Taux de transcrits de C-fos.....	109
Figure II-27 Taux de transcrits des cibles de REST	111
Figure II-28 Schéma de conclusion	112
Figure II-29 Système GAL4-UAS	114
Figure II-30 Transport axonal.....	114
Figure II-31 Distribution des vésicules selon leur vitesse	116
Figure II-32 Kymographes.....	117
Figure II-33 Effet de P42 sur le déplacement des vésicules DNT1	118
Figure II-34 Effet de P42 sur la vitesse des vésicules DNT1	119
Figure II-35 Effet de P42 sur le nombre de vésicules DNT1GFP	120
Figure II-36 Effet de la présence ou l'absence de P42 dans la hHtt sur le transport de vésicules NPY	122
Figure II-37 Effet de la présence ou l'absence de P42 dans la hHtt sur la vitesse de vésicules NPY	123
Figure II-38 Effet de la présence ou l'absence de P42 dans la hHttc sur le transport de vésicules NPY	124
Figure II-39 Effet de la présence ou l'absence de P42 dans la hHttc sur la vitesse des vésicules NPY	125
Figure II-40 Effet de la présence ou l'absence de P42 dans la hHtt et hHttc sur le nombre de vésicules NPY.....	126
Figure II-41 Colocalisation avec β 3-tubuline	127
Figure II-42 Le Hamlet.....	129
Figure II-43 Protocole journalier du Hamlet	130
Figure II-44 Test de mémoire topographique du Hamlet	131
Figure II-45 Evolution du comportement des souris Wt dans le Hamlet au cours des 10 jours d'entraînement.....	132
Figure II-46 Evolution du comportement des souris (WtP42T, R6/2 NT, R6/2P42T) dans le Hamlet au cours du temps.....	133
Figure II-47 Evolution du comportement entre le J1 et le J10	134
Figure II-48 Effet du Hamlet et de P42 sur la coordination motrice	136
Figure II-49 Schéma du fonctionnement de la Nucléoline et de P3	139
Figure II-50 Résultats des tests comportementaux avec P42T, P3a et de la bithérapie.....	140
Figure II-51 Effet du traitement par P3a et de la bithérapie sur l'évolution du poids et du score de Rotarod.....	142
Figure II-52 Effet de P3a sur les souris sauvages et l'évolution de leur score au Rotarod	143
Figure II-53 Effet de l'application de P3 et de ses différentes formes sur l'activité calcique de neurones d'hippocampe.....	144

Figure II-54 Effet de P3T sur l'évolution du score de Rotarod de souris sauvages	145
Figure III-1 Evolution et conservation du domaine P42.....	147
Figure III-2 Modèle de l'interaction P42/N17 et de son importance dans l'agrégation	149
Figure III-3 Schéma du modèle de l'effet de P42 sur le transport du BDNF et de ses conséquences.....	150
Tableau 1 Résumé des observations sur les taux de transcrits et protéines	72
Tableau 2 Résumé du test d'habituation au champ ouvert.....	83
Tableau 3 Résumé des effets observés dans le Hamlet.....	135
Données supplémentaires 1 Normalisation avec stainfree.....	162
Données supplémentaires 2 Taux de transcrits de Rsk1, Rsk2, DARPP32, P75.....	163
Données supplémentaires 3 Résultats du test de mémoire du Hamlet.....	163
Données supplémentaires 4 Effet de P3a et de la bithérapie sur des souris sauvages	164
Données supplémentaires 5 Effet de P3TAT sur l'évolution du poids des souris sauvages..	165
Données supplémentaires 6 Effet du traitement par P3TAT sur la transmission synaptique	166
Données supplémentaires 7 Macro pour la mesure de la taille des ventricules.....	167
Données supplémentaires 8 Macro pour la détection et le comptage automatique des agrégats	168

Lexique

Aa : Acide aminé

AMPA : acide α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic

ASO : Antisense Oligonucléotide

BDNF : Brain Derived Neurotrophic Factor

CBP : CREB Binding Protein

Chrm4 : Récepteur cholinergique muscarinique M4

CPP : Cell penetrating protein

CRE : C-AMP Response Element

CREB : C-AMP Response Element-Binding Protein

DA : Dopamine

dHtt : Huntingtine de drosophile

DNT1 : Drosophila Neurotrophin 1

EPSC : Excitatory post-synaptic current

ERK : Extracellular signal-regulated kinases

Fyn : Proto-oncogene tyrosine-protein kinase

GABA : Acide γ -aminobutyrique

GPe : Globus Pallidus externe

GPI : Globus Pallidus interne

HAP1 : Huntingtin Associated Protein 1

HDCRG : The Huntington's Disease Collaborative Research Group

HEAT : Domaine d'interaction avec d'autres protéines

hHtt : Huntingtine humaine de 548 acides aminés

hHtt Δ P42 : Huntingtine humaine de 548 acides aminés moins le domaine P42

hHttc : Huntingtine humaine de 171 acides aminés

HTT : Gène codant pour la huntingtine

Htt : Huntingtine (humaine ou murine)

IA : Allèle intermédiaire

IPSC : Inhibitory post-synaptic current

IT15 : Interesting Transcript 15

KI : Knock-In

KO : Knock-Out

LTP : Long term potentiation

MARCKS : Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate
MH : Maladie de Huntington
mHtt : Huntingtine mutante
MSN : Medium Spiny Neurons
mTOR : Mammalian Target of Rapamycin
N17 : Les 17 premiers acides aminés de la Htt
NCL : Nucléoline
NGF : Nerve Growth Factor
NMDA : acide N-méthyl-D-aspartique
NPY : Neuropeptide Y
NST : Noyaux Sous-Thalamique
NT : Traitement par des microémulsions Aonys[®] vides
P3 : Peptide de 13 acides aminés dont la séquence est issue de la nucléoline
P3a : P3 acétylé
P3T : Traitement par P3TAT dans les microémulsions Aonys[®]
P3TAT : P3 conjugué avec TAT
P42 : Fragment de 23 acides aminée de la huntingtine
P42T : Traitement par P42TAT dans les microémulsions Aonys[®]
P42TAT : P42 conjugué à TAT
P75 : Ou LNGFR pour Low-affinity nerve growth factor receptor
pEnk1 : Pro-enképhaline1
PI3K : Phosphoinositide 3-kinase
PKB : Protéine Kinase B ou Akt
PKC : Protéine Kinase C
PLC γ : Phospholipase_C gamma.
PolyQ : Domaine de répétition de glutamines
PP : Paired pulse
PRR : Proline Rich Region
PSD-95 : Postsynaptic density protein 95
Q : Glutamine
QBP1 : Polyglutamine-Binding peptide1
R6/2 : Souris développant la MH
RE1 : Repressor Element 1
REST : Repressor Element 1-Silencing Trasncription factor
SNc : Substance Noire compacte
SNr : Substance Noire réticulée

Sp1 : Specificity Protein 1

Syn1 : Synapsine 1

SUMO : Small ubiquitin like Modifier

TAT : Peptide de 11 acides aminées facilitant le passage des membranes cellulaires

TrkB : Tropomyosin receptor kinase B

Wt : Souris sauvages

Chapitre I. Introduction

Ma thèse a pour but de mieux comprendre l'effet et le mode d'action de P42, un peptide protecteur de la maladie de Huntington (MH). Avant de décrire les résultats obtenus et les conclusions que l'on peut en tirer, nous allons dans un premier temps rappeler ce qu'est la MH et ce qu'est ce peptide P42.

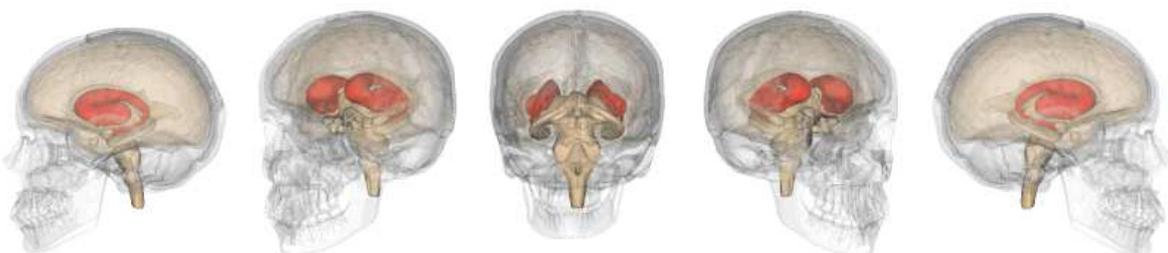
Partie 1. La maladie de Huntington

La MH est une maladie neurodégénérative progressive héréditaire, rare et fatale, provoquée par une mutation du gène *HTT* [1], porté par le chromosome 4, et code pour une protéine : la Huntingtin (Htt). Cette protéine d'environ 3144 acides aminés a près de sa terminaison N-terminale une répétition de glutamines (PolyQ).

Les patients développant la MH contiennent un domaine PolyQ de 36 glutamines ou plus. L'âge des patients, au moment de l'apparition des premiers symptômes est d'environ 40 ans mais varie en fonction de la taille du PolyQ. Les symptômes développés par les patients sont d'ordre moteur, psychiatrique et cognitif. Le décès des patients intervient environ 15 ans après l'apparition des premiers symptômes et ce délai entre l'apparition des symptômes et le décès varie peu avec la taille du PolyQ [2]. Les principales causes du décès sont des pneumonies, des troubles cardiaques et le suicide [3]. La prévalence varie d'une population à l'autre mais à titre d'exemple, chez les Européens elle est comprise entre 4 et 8 cas pour 100 000 personnes [4].

Bien que la Htt soit ubiquitaire, ce sont en particuliers les neurones qui sont affectés dans la MH et plus précisément les neurones épineux moyens (MSN : medium spiny neurones) du striatum. D'un point de vue histologique, chez les patients atteints de MH, il y a notamment une importante dégénérescence du striatum. Le striatum est une structure centrale du cerveau, comme le montre la Figure I-1.

Figure I-1 Emplacement du striatum dans le cerveau humain



Représentation 3D du cerveau humain avec le striatum représenté en orange. Modèle 3D extrait de Anatomography de Life Science Databases(LSDB).

Cette structure joue un rôle très important dans la régulation de l'activité motrice mais a également un rôle dans d'autres mécanismes plus cognitifs comme certaines formes de mémoires.

La Htt est une protéine qui interagit avec de nombreuses protéines et de ce fait est impliquée dans de nombreux mécanismes cellulaires. La mutation de la Htt provoque des pertes de fonctions, et des gains de fonctions toxiques. En conditions pathologiques de MH, il y a notamment des troubles au niveau de la survie neuronale, la plasticité synaptique, l'activité mitochondriale, le transport axonal, l'homéostasie calcique, et, des dérèglements transcriptionnels et post-traductionnels ainsi qu'un phénomène d'excitotoxicité au niveau de certaines synapses. Ces phénomènes entraînent des perturbations dans les voies de signalisations de neurotransmetteurs comme le glutamate, la dopamine, le GABA mais également d'autres molécules comme le BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor), que ce soit au niveau des ligands ou des récepteurs [5], [6].

La MH est une maladie qui n'a actuellement aucun traitement curatif, seuls des traitements symptomatiques existent. L'intérêt de comprendre cette maladie, de rechercher et développer un agent thérapeutique est donc très grand.

I.1.1. Historique

La MH a longtemps été désigné sous le nom de chorée de Huntington, son symptôme le plus marquant. Le symptôme de chorée est caractérisé par des mouvements choréiques, en d'autre terme des mouvements involontaires, désordonnés, illogiques, brusques, rapides et de grande amplitude. Etymologiquement le terme chorée, prend sa source du grec ancien *khoreía* et plus directement du latin *chorea* désignant une danse aux mouvements circulaires.

Des premières descriptions de troubles choréiformes dans une population ont été réalisés au XVIème siècle, faisant potentiellement référence à des cas de MH. Durant plus de 3 siècles aucune avancée sur la MH n'a été constatée. Durant ces 3 siècles, notamment pendant la colonisation de l'Amérique du nord par les anglais, les personnes souffrant du symptôme de chorée étaient souvent considérées comme possédées donnant parfois le nom de « San Vitus » à la maladie développée par des patients potentiellement atteints de MH. Des écrits semblent même montrer que lors de la chasse aux sorcières vers la fin du XVII^{ème} siècle aux Etats-Unis au moins une personne atteinte de la maladie aurait été exécutée à Salem dans le Massachussetts.

Ce n'est que durant le XVIIIème siècle que la maladie de Huntington trouva son nom. Au début de ce siècle une première étude américano-anglo-norvégienne fait mention de

patients atteints de « chorée chronique héréditaire ». Mais ce n'est qu'en 1872, qu'un jeune docteur newyorkais décrit précisément la maladie, son nom : George Huntington, la publication : « *On chorea* ». De manière intéressante, Huntington, en plus de décrire précisément les différents phénotypes pathologiques de la maladie, montre le caractère héréditaire et le mode de transmission, autosomal dominant, tel qu'on le connaît aujourd'hui... 28 ans avant la redécouverte des lois mendéliennes par Hugo de Vries, Carl Correns, et Erich von Tschermak..

Au début du XXème siècle, Charles Davenport un chercheur américain chef de file du mouvement eugéniste entreprend la recherche de porteurs de nombreuses maladies héréditaires. Durant ces années de nombreuses observations ont pu être réalisées notamment sur l'évolution du cerveau durant le développement de la MH. Amerigo Negrette, un clinicien vénézuélien met en évidence en 1952 un important foyer de cas de MH dans la ville de Maracaibo au Venezuela [7]. Des études de terrains font état, dans deux autres villes situées autour de lac, de nombreux autres cas de chorée de Huntington, alors appelé localement : « *el mal* ». La publication de ses travaux en espagnol ne facilite pas la diffusion et ce n'est que plus d'une dizaine d'années après, à travers ces étudiants, que ces travaux sont diffusés à travers le monde, et atteignent la communauté de scientifiques étudiant la MH.

En 1968, l'étude de la MH prend une nouvelle dimension sous l'impulsion Milton Wexler psychanalyste américain. Milton Wexler, dont la femme était atteinte de MH, ouvre l'Hereditary Disease Foundation (HDF) et lance la mission : Huntington's Disease Collaborative Research Project. Pas à pas Milton Wexler et sa fille Nancy Wexler qui prit au fil des années le relais avancèrent en étroite collaboration avec de nombreux cliniciens, biologistes et généticiens dans la recherche du gène portant la mutation induisant la MH. Ces études étaient particulièrement focalisées sur une région du monde récemment connue comme ayant une prévalence importante de MH, les alentours du lac Maracaibo au Venezuela.

C'est en 1979 lors d'un des nombreux congrès financés par Nancy Wexler et la HDF qu'émergea l'idée qui allait permettre l'identification du gène responsable de la MH. Cette idée : l'utilisation de sondes capables de détecter des séquences polymorphiques spécifiques des patients atteints de MH. Un des organisateurs David Housman persuada son étudiant James Gusella de travailler sur ces sondes. Après quelques années de labeur et avec beaucoup de chance, James Gusella trouva une sonde capable de discriminer des échantillons de sang provenant de patients atteints de MH et de patients sains. La localisation précise du gène *HTT* n'était alors plus qu'une question de temps.

Finalement, en 1993 est publié « *A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes* » [1] l'article localisant précisément le gène portant la mutation responsable de la MH : Le gène IT15, aujourd'hui

appelé *HTT*. Ce gène est situé sur le chromosome 4 et plus précisément dans le locus 4p16.3. L'article est signé non pas par une liste de noms mais par « *The Huntington's Disease Collaborative Research Group* » (HDCRG) alors composé de nombreux scientifiques comme Nancy Wexler et James Gusella précédemment cités, mais également, entre autres, de Gillian P. Bates, Marcy E. MacDonalds et Leslie Thomson qui développèrent plus tard, chacune, des modèles de MH, respectivement de souris [8], de cellules [9] et de drosophiles [10].

Aujourd'hui, Nancy Wexler et la HDF continuent les recherches sur la MH afin de notamment trouver un traitement.

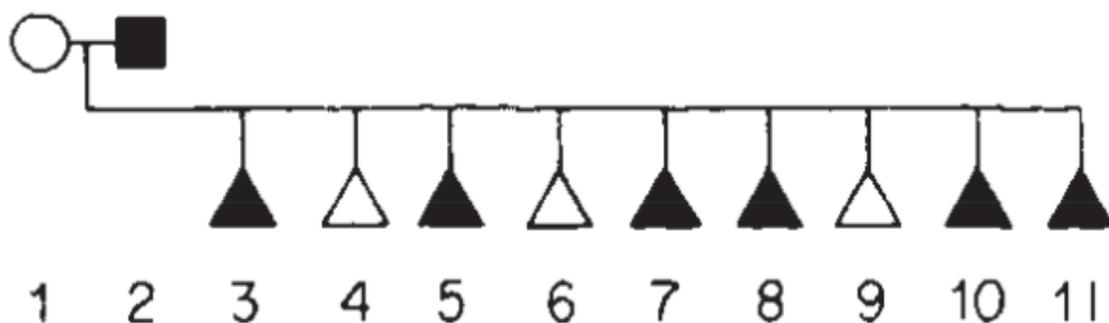
1.1.2. Aspect clinique

La MH est une maladie neurodégénérative progressive héréditaire, rare et fatale [1]. Dans ce chapitre, nous allons particulièrement nous attarder sur l'aspect épidémiologique et le caractère héréditaire de la maladie ainsi que les différents symptômes, qu'ils soient moteurs, cognitifs ou psychiatriques ainsi que leur évolution.

1.1.2.1. *Epidémiologie.*

La MH est une maladie héréditaire à transmission autosomale dominante. La mutation est portée par un autosome et une seule copie du gène est nécessaire à l'apparition de la maladie [1], comme le montre la Figure I-2. Cette figure représente un arbre généalogique d'une famille vénézuélienne directement tirée de l'article publié par le HDCRG en 1993.

Figure I-2 Arbre généalogique d'une famille atteinte de MH



Les carrés représentent des hommes, les ronds des femmes, les triangles représentent des hommes ou des femmes et sont là pour préserver l'anonymat de la famille. Le blanc représente des cas n'ayant pas développé de MH. Le noir représente des cas de MH. Extrait des travaux de l'HDCRG (1993).

Cette figure souligne le caractère héréditaire de la MH, avec 6 individus développant la même maladie que le père (noir) contre 3 descendants sains (blanc) comme la mère.

La MH est provoquée par la mutation du gène *HTT*. Cette mutation porte sur un domaine de répétition de CAG, transcrit et traduit en glutamine sur la protéine Htt. Plus cette répétition est importante plus l'âge d'apparition des premiers symptômes sera bas [2]. La répétition de plus de 36 CAG induit la maladie. Néanmoins entre 36-40 CAG la probabilité que la personne meurt avant l'apparition des premiers symptômes est très importante. Langbehn *et al* [11] mesurent la pénétrance de l'allèle mutant en fonction du nombre de répétitions et estime que seulement 21% des patients portant 36 répétitions développeront la MH avant 80 ans, alors qu'avec 40 répétitions ce taux monte à 93%. Cette différence entre prévalence et taux d'hétérozygotie est dû à un très grand nombre de personnes portant un allèle du gène contenant un domaine de répétitions de CAG compris entre 36 et 40 CAG qui ne sont jamais diagnostiquées. De fait, la prévalence est inférieure au taux d'hétérozygotie du gène *HTT* [4]. Les études sur la prévalence de la MH sont donc conditionnées par ce phénomène et donc dépendantes des méthodes de diagnostic et de leur avancée mais également des démographies et économies des populations à travers le monde mais également à travers le temps. Il est important et intéressant de relever que récemment Kay *et al* [4] montrent que dans plusieurs populations indépendantes dont la prévalence varie entre 3 et 11 pour 100 000, il est noté que 1 personne sur 400 est porteuse d'une version du gène *HTT* avec plus de 36 répétitions de CAG.

La MH est une maladie présente à travers le monde entier, en revanche la prévalence de la maladie varie en fonction des régions [4]. En effet la proportion de personnes développant la MH dans une population donnée est très hétérogène en fonction de la population considérée. Différentes études épidémiologiques à travers l'histoire ont eu pour but de recenser les patients atteints de MH. Les plus récentes observations semblent montrer que la population la plus touchée soit la population caucasienne. En Europe la prévalence est d'environ 7 pour 100 000 mais de nombreuses variations sont à noter. Dans l'Europe du Nord, il est observé un taux relativement haut par rapport au reste de l'Europe mais même au sein de cette région des foyers à faible prévalence sont à noter comme l'Islande avec seulement 3 cas pour une population de 314000 habitants. Inversement, des taux relativement bas sont observés en Europe du Sud mais des foyers avec une prévalence élevée sont observés, notamment sur l'île de Malte. En Amérique du Nord, les Etats-Unis semblent avoir une prévalence relativement faible autour de 5 pour 100 000 alors qu'au Canada la prévalence semble être à plus de 13 pour 100 000. Enfin, les régions du monde avec des populations non-

caucasienne, comme l'Afrique et l'Asie, excepté certains foyers particuliers, ont des taux de prévalence d'environ 1 pour 100 000.

Ces importantes variations peuvent être dues à des événements historiques importants. Des études haplotypiques mettent en évidence que la colonisation de certains pays d'Afrique ou d'Amérique par des populations européennes a par exemple joué un rôle dans la démographie de la MH. Les politiques d'eugénisme qui furent pratiquées dans certains pays vers la moitié du XXème siècle ont également eu un impact important. De plus, l'économie de certaines régions du monde peut également influencer sur la prévalence. Dans certains pays peu développés des cas peuvent ne pas être identifiés faute de moyens. Tandis qu'aux Etats-Unis le coût des soins de santé et la perte d'assurance maladie pourrait également biaiser la prévalence comme le suggère Alice Wexler [12]. Le caractère insulaire de certaines régions comme l'Islande et l'Australie ont également dû jouer un rôle dans le maintien dans le temps de ces hétérogénéités.

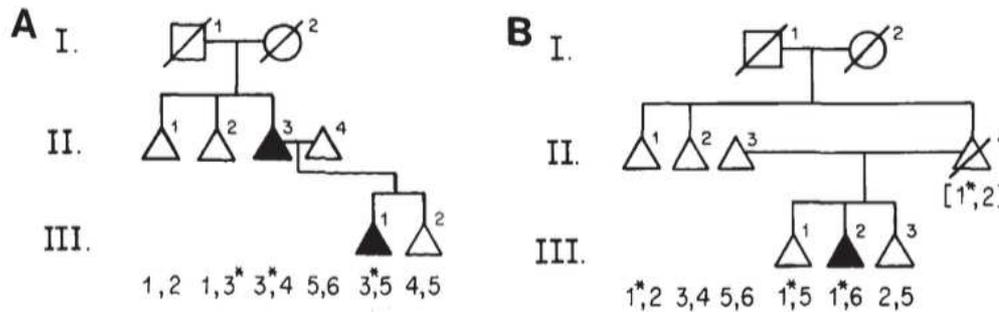
Les études haplotypiques ont également mis en évidence des facteurs génétiques favorisant l'apparition de la MH [4] expliquant notamment les différences observées entre les différents peuples.

De plus, bien que rare, il est intéressant de parler des cas d'homozygotie [13]. En effet, bien que la MH soit une maladie provoquée par la présence d'un seul allèle, quelques cas d'homozygotie sont recensés. De manière intrigante il est noté que ces patients ne développent pas plus tôt la MH que des patients ayant un seul allèle muté et un nombre de répétitions équivalent. L'absence d'allèle sauvage semble donc ne pas être plus dommageable que la présence d'une seule copie mutée. Ces résultats sont cependant à relativiser avec le faible de nombres de cas recensés, mais indiquent cependant une fonctionnalité de la protéine Htt mutée.

Il est également important d'observer la variabilité de la prévalence au cours du temps. Ainsi on note que de manière globale la prévalence de la MH augmente au cours du temps. Par exemple au Royaume-Uni, la prévalence est passée de 5,4 en 1990 à 12,3 en 2010 [4]. Ces variations dans le temps peuvent s'expliquer par plusieurs phénomènes. Tout d'abord, l'augmentation de la longévité de la population mondiale rend observable certains cas de MH ne se développant que tardivement. Egalement, avant 1993 aucun test n'était capable de déterminer avec certitude la présence ou non de l'allèle mutant de *HTT*. Mais cette augmentation soulève également une question importante sur la présence ou non de formes sporadiques de la MH.

Comme le montrent les arbres généalogiques de la Figure I-3, toujours issus de « The Huntington's Disease Collaborative Research Group », il est noté à travers l'histoire et encore aujourd'hui des cas de MH sans antécédents familiaux.

Figure I-3 Arbres généalogiques montrant des cas sporadiques de MH



Les carrés représentent des hommes, les ronds des femmes, les triangles représentent des hommes ou des femmes et sont là pour préserver l'anonymat de la famille. Le blanc représente des cas n'ayant pas développé de MH. Le noir représente des cas de MH. Un symbole barré signifie que le sujet est décédé. Extrait des travaux de l'HDCRG (1993)

Vers la fin du XXème siècle ces cas sporadiques étaient plutôt expliqués par un manque d'informations sur les antécédents familiaux ou par le décès précoce de l'éventuel porteur de la MH ou par des mutations aléatoires et indépendantes du contexte familial. Au fil des années et notamment avec le bond réalisé par l'HDCRG en 1993, une autre observation a été mise en évidence : l'augmentation du nombre de répétitions de CAG d'une génération à une autre [14], [15]. En effet, Goldberg *et al* [14] notent que dans les cas sporadiques de MH observés, le père du patient possède un allèle intermédiaire (IA), un allèle avec entre 27 et 35 glutamines et que lors de la transmission une mutation du gène a lieu entraînant une augmentation du nombre de CAG au-delà du seuil de 36 glutamines. Goldberg note également que plus le père est âgé plus la probabilité que la mutation ait lieu, augmente. En revanche aucune instabilité n'est notée lorsque c'est la mère qui transmet l'allèle.

Est-ce donc des cas de MH sporadiques ou familiales ? Un peu des deux.

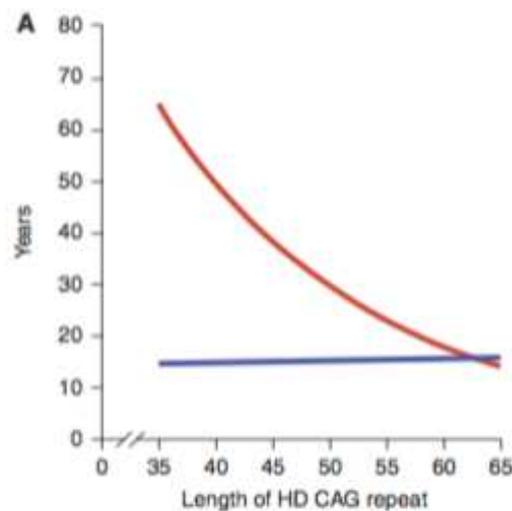
De plus, Kay *et al* [4] montre que parmi tous les patients atteints de MH, 10% de ces cas seraient dû à une transmission d'un IA. De plus, Samaka *et al* [15] indique qu'environ 6% de la population globale n'ayant aucun antécédent familial connu de MH posséderait une IA.

Cette instabilité est également notée dans des cas de transmission par le père de l'allèle mutant. En effet, dans ces cas la descendance a un risque important de développer la MH de manière plus précoce que le père, phénomène corrélé avec une augmentation du nombre de répétitions de CAG [14].

1.1.2.2. Les symptômes et leur évolution

L'âge où apparaissent les premiers symptômes varie en fonction du nombre de répétitions de CAG, plus il y a de répétition plus jeune sera le patient lors de l'apparition des premiers symptômes. En revanche, la durée entre l'apparition des premiers symptômes et le décès du patient varie très peu avec la longueur du PolyQ, comme le présente la Figure I-4 extraite de la revue de Finkbeiner [2].

Figure I-4 Age d'apparition des symptômes et leur durée jusqu'au décès en fonction du polyQ



En rouge, représentation de la variation de l'âge d'apparition des premiers symptômes en fonction du nombre de la taille du PolyQ sur la mHtt. En bleu, représentation de l'évolution de la durée entre l'âge d'apparition des premiers symptômes et le décès du patient en fonction de la taille du PolyQ sur la mHtt. Extrait des travaux de Finkbeiner (2011).

Aucun cas de MH n'a été recensé chez des patients portant un domaine PolyQ inférieur à 36 glutamines (Q). Aussi la MH n'est diagnostiqué que chez des patients exprimant une Htt avec 36 Q ou plus. Entre 36 et 40, la pénétrance est partielle, les symptômes sont développés très tard voir jamais, le patient décédant avant leur apparition. Puis au-delà de 40, plus le nombre de répétition est important plus tôt vont apparaître les symptômes. De plus, avec 60 répétitions ou plus, des formes juvéniles de MH sont recensées. La Figure I-5 extraite des travaux de Podvin *et al* [16] schématise cette relation taille PolyQ/âges des premiers symptômes. Les symptômes développés dans les cas de MH sont d'ordre moteur, cognitif et psychiatrique.

Figure I-5 Schéma des différentes catégories de patients en fonction de la taille du PolyQ.

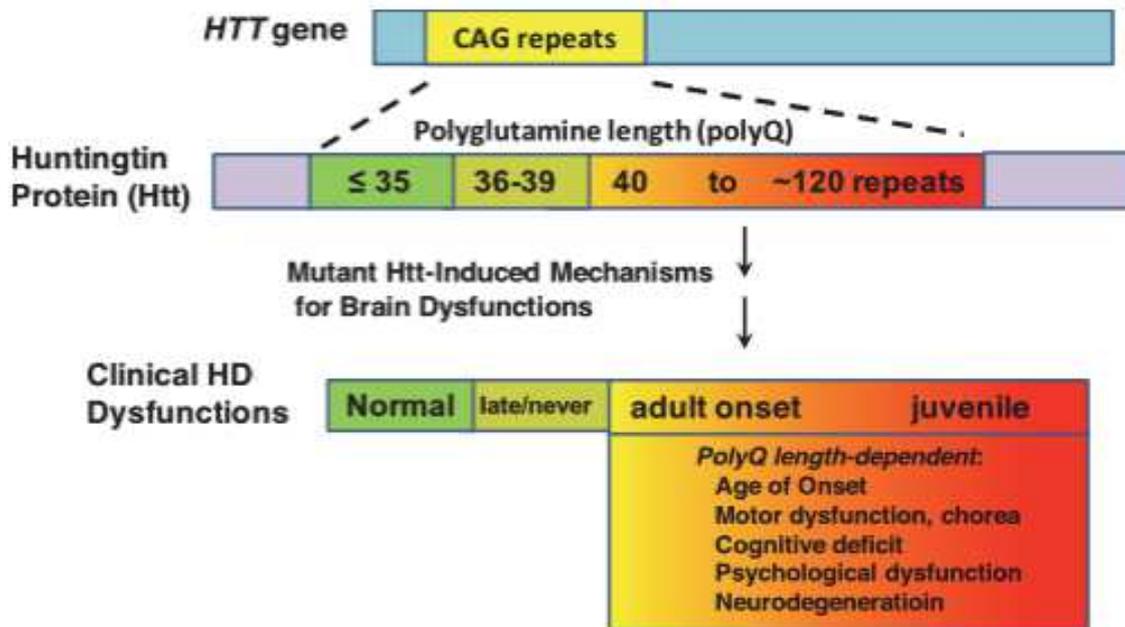


Figure extraite des travaux de Podvin et al (2018).

1.1.2.2.1. Symptômes d'ordre moteur

Le plus impressionnant et le plus connu historiquement des symptômes est la chorée qui apparaît relativement tôt dans la MH. La chorée est un symptôme caractérisé par des mouvements choréiques. Les mouvements choréiques sont définis comme des mouvements amples, circulaires, involontaires, désordonnés et rapides. Leur fréquence varie en fonction de l'état du patient. Au repos la fréquence diminue, lors d'un stress cognitif ou psychiatrique la fréquence augmente. Ce sont principalement les muscles distaux qui sont touchés mais également les muscles de la face et du cou. Cela se traduit par des mouvements amples au niveau des membres supérieurs mais également par une démarche sautillante au niveau des membres inférieurs. Au niveau de la tête il est observé des mouvements brusques et illogiques de la tête et des expressions faciales déformées.

Plus tard dans le développement de la MH, plusieurs autres déficits moteurs sont également constatés. Ainsi les patients souffrent également de bradykinésie, se traduisant par une lenteur dans l'exécution de mouvements volontaires, dystonie, se traduisant par des contractions involontaires du muscle pendant des mouvements volontaires. Également des saccades oculaires sont observées au niveau des muscles de la face.

Des tests permettant de quantifier ces troubles moteurs existent avec notamment le « total motor score » établi par le *Unified Huntington's Disease Rating Scale* (UHDRS).

1.1.2.2.2. Symptômes d'ordre cognitif

Des troubles cognitifs pouvant être détectés plus tôt que les troubles moteurs sont également observés chez les patients atteints de MH [17]. Principalement il est noté une démence de type sous-cortical propre à la MH, se traduisant par des problèmes au niveau de l'attention, de la planification de certains gestes moteurs complexes et dans la reconnaissance spatiale mais sans déficit de mémoire comme on peut l'observer chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer [18]. Turner *et al* proposent même de parler de « Huntington's disease dementia ». Tout comme les troubles moteurs, les troubles cognitifs sont également observables avec la UHDRS.

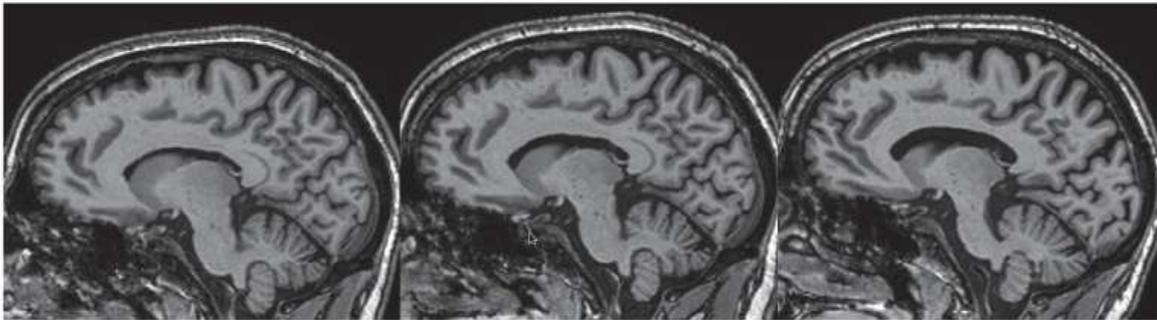
1.1.2.2.3. Symptômes d'ordre psychiatrique

D'après les données de l'European Huntington's Disease Network's Registry [6], 20% des patients présentent des problèmes psychiatriques. Chez les patients il est noté des cas d'irritabilité excessive voir de psychose, caractérisé par une distorsion de la perception de la réalité entraînée par des délires, hallucinations et entraînant des crises de violence. Une anxiété accrue est également notée et caractérisée par des crises d'inquiétude, de crainte et de peur. Finalement, un état dépressif est régulièrement noté chez les patients, caractérisé par des sautes d'humeur provoquées par une faible estime de soi et une perte de plaisir et d'intérêt à la vie. Ces troubles psychiatriques peuvent entraîner à terme des idées suicidaires parfois concrétisées. 8-9% des patients atteints de MH se suicident et 25% font des tentatives [19].

1.1.2.2.4. Autres phénotypes et causes de la létalité

D'autres phénotypes pathologiques sont également observables chez les patients atteints de MH, notamment une perte du poids [16]. La perte du poids étant particulièrement corrélé au nombre de répétitions de CAG. De nombreuses études font état de résultats *post-mortem* ou *via* IRM (imagerie par résonance magnétique) montrant une dégénérescence importante de certaines structures du cerveau [6], [20]. C'est en particulier le striatum qui est le plus affecté, suivi du cortex. Comme on peut le voir sur la Figure I-6 extraite des travaux de Scahill *et al* [21] qui montre l'évolution de la taille des ventricules et du cortex notamment au cours de l'évolution de la MH.

Figure I-6 Evolution du cerveau d'un patient atteint de MH



Images acquises par IRM. À gauche le patient est âgé de 51 ans, au milieu de 54 ans, et à droite 57 ans. Figure extraite des travaux de Scahill et al (2017).

De plus, d'autres structures semblent plus tardivement touchées comme le cortex et l'hippocampe. Ce phénomène entrainerait une perte de 20% du volume total du cerveau.

En moyenne le décès arrive 15 ans après l'apparition des premiers symptômes [19]. Plusieurs causes de décès sont observées, toutes liées aux symptômes décrits plus haut. Ainsi, on observe des décès d'infections pulmonaires, de problèmes cardiaques, d'accidents domestiques, et également un taux important de suicide.

La Figure I-7 adaptée des travaux de A Ross et J Tabrizi [20] schématise l'apparition et l'évolution des différents phénotypes pathologiques au cours de la vie d'un patient.

Figure I-7 Apparition et évolution des différents signes cliniques et neurobiologiques de la MH

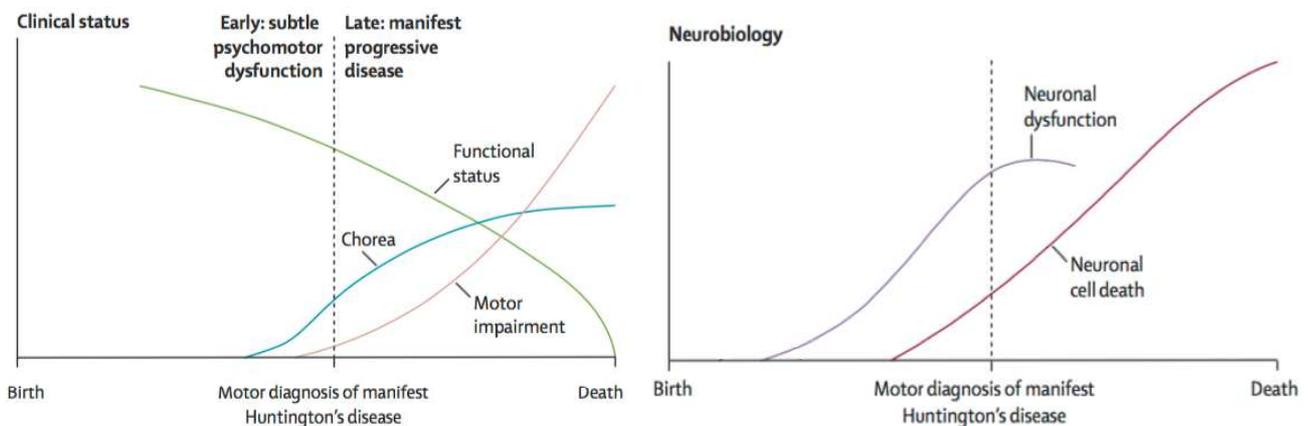


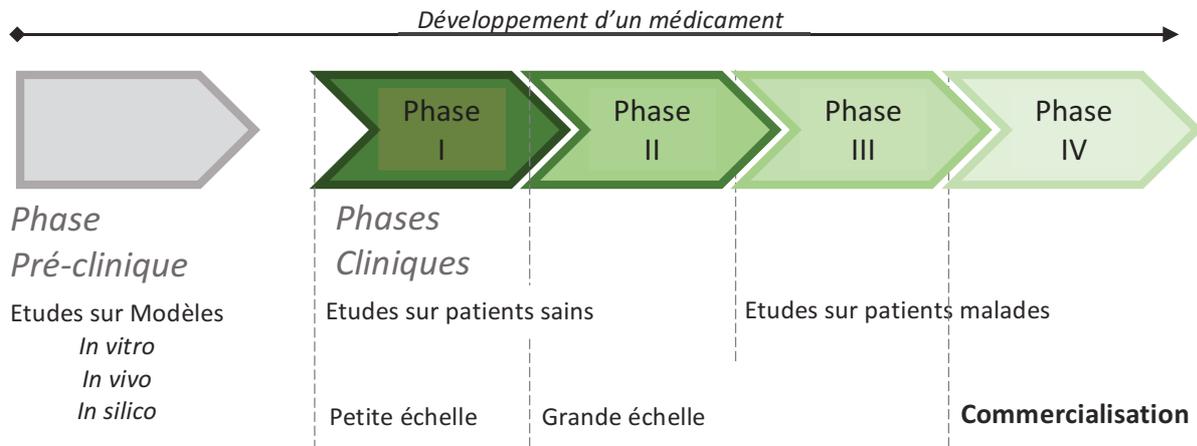
Figure adaptée des travaux de Ross et Tabrizi (2011).

Finalement il est également intéressant, d'un point de vue clinique, de parler des autres maladies induites par un élargissement pathologique d'un domaine PolyQ. Le domaine PolyQ n'est pas exclusif à la Htt, et d'autres protéines contiennent ce domaine, comme par exemple l'Ataxin-7 [22]. L'expansion anormale du PolyQ dans cette protéine entraîne des gains de fonctions toxiques induisant la mort neuronale en particulier dans le cervelet, le tronc cérébral et la rétine [23]. Il est référencé en tout 9 maladies à PolyQ, parmi lesquelles sont retrouvées la MH et l'ataxie spinocérébelleuse de type 7 provoquée par la mutation de l'Ataxin-7 [22].

1.1.2.3. Traitements

Depuis la découverte du gène *HTT* en 1993, dont la mutation est responsable de la MH, de nombreuses avancées ont été réalisées concernant la physiopathologie de la MH. Actuellement, seuls des traitements symptomatiques existent, aucun traitement ni préventif ni curatif n'est disponible. Néanmoins, certains médicaments sont en cours de développement. Certains à des stades plus avancés que d'autres. Parmi les plus avancés on notera en particulier, la Tétrabenazine (TBZ) qui fut longtemps le seul médicament officiellement reconnu comme efficace par certains pays pour traiter les patients atteints de MH [24]. Concrètement ce médicament agit principalement sur les troubles moteurs et n'est pas exclusivement utilisé dans le cas de la MH. Il agit sur VMAT2 (*Vesicular monoamine transporter 2*), transporteur vésiculaire des monoamines dont la dopamine qui est une voie particulièrement affectée dans la MH. Néanmoins les importants effets secondaires et son effet bénéfique seulement sur un des phénotypes pathologiques font que le TBZ reste un choix par défaut. Plus récemment, la deutetribenazine a également été commercialisée comme un médicament utilisé contre la MH. La deutetribenazine est un dérivé de la tétribenazine avec le changement de six atomes d'hydrogène pour deux de deutérium, ne changeant pas l'action de la molécule sur les voies dopaminergiques mais ralentissant son métabolisme et donc son élimination. Également bien avancé dans le développement : la latrepirdine, une molécule qui semble stabiliser les membranes mitochondriales structurellement et fonctionnellement, particulièrement affecté dans la MH [25] qui a passé la phase 2 avec des résultats très prometteurs. En revanche en 2011 lors de la phase 3 [24], sur une population plus importante, et en double aveugle aucun effet n'a pu être constaté. Un schéma représentant les différentes phases du développement d'un médicament est présenté dans la Figure I-8.

Figure I-8 Représentation des différentes étapes de développement d'un médicament.



De plus, un autre type de thérapie particulièrement prometteuse émerge : la thérapie par ASO. Les ASO pour Anti-sens oligonucléotides sont des oligonucléotides qui vont venir se paier à l'ARN [26]. Ceci permet d'éliminer un ARN cible en activant la dégradation par RNAase-H, et ainsi d'empêcher sa traduction. Des ASO sont actuellement en phase clinique. Aujourd'hui, les ASO existant cible la Huntingtine mutante (mHtt) *via* des interactions avec des SNP (single nucleotide polymorphisme). Néanmoins ces cibles sont dans 30% des patients, aussi présentes sur l'ARN de Htt sauvage entraînant également l'élimination de l'ARN de la Htt sauvage. D'autres molécules prometteuses beaucoup moins avancées d'un point de vue développement pharmaceutique sont également en cours d'essai, mais toutes semblent montrer des actions sur des symptômes consécutifs de la mutation. P42, qui est une partie endogène de la Htt [27]–[29] peut s'avérer particulièrement intéressant dans le sens où il pourrait agir en aval de tous ces dérèglements cellulaires sans affecter la physiologie de la Htt sauvage. Historiquement, d'autres molécules ont également marqué l'histoire de la MH. On notera entre autres le lithium qui permet de prévenir certains désordres psychiatriques et diminuerait les tentatives de suicide. QBP1, pour Polyglutamine Binding Protein 1 qui se fixe au domaine PolyQ des mHtt et empêche l'agrégation potentiellement toxique. Le Riluzole qui permet de diminuer l'excitotoxicité en bloquant les voies glutamatergiques. Egalement comme cible thérapeutique est notable la voie de signalisation du BDNF. Le BDNF et son récepteur TrkB (Tropomyosin related kinases receptor B) sont des éléments essentiels au développement, au maintien et au fonctionnement des neurones et des réseaux neuronaux dont la voie de signalisation est particulièrement impactée dans la MH. De nombreuses études ont cherché à administrer du BDNF plus ou moins directement dans le cerveau [6]. Bien que relativement efficace sur des modèles de MH, l'administration de BDNF exogène s'est avérée

dangereuse au vu des effets secondaires importants et une solution peu optimale dans le sens où dans la MH ce n'est pas seulement la concentration du BDNF qui est affectée mais également son transport et la physiologie de son récepteur TrkB. Parmi ces différentes études thérapeutiques sur la voie BDNF/TrkB on peut noter les travaux de Jian *et al* [30] qui ont développé une petite molécule agoniste de TrkB. Toutes ces molécules se sont avérées soit avoir des effets secondaires trop importants soit des effets trop ciblés sur un petit spectre de symptômes et ne sont pas arrivés au bout du processus du développement de médicaments.

De nombreuses molécules sont développées dans l'idée d'être administrée aux patients afin d'améliorer leurs conditions de vie, mais d'autres stratégies thérapeutiques sont également à l'étude, en particulier la greffe de cellules. En effet, les neurones les plus touchés dans la MH sont ceux du striatum et des greffes de neurones de striatum ont déjà été expérimentées [31], [32]. Durant les phases précliniques des effets positifs ont notamment été remarqués sur l'activité motrice, mais peu d'effets positifs ont été observés en phase clinique. Il est intéressant de noter que des cellules greffées ont été retrouvées lors d'études post-mortem avec des agrégats [4]. Un essai clinique réalisé en France a récemment été réalisé mais les résultats ne sont pas encore connus [24].

La MH étant une maladie génétique, il est donc également intéressant de se pencher sur la solution de la thérapie génique, qui permettrait la suppression de l'expression de la Htt mutante et/ou le changement de sa séquence nucléotidique. Plusieurs études montrent le potentiel thérapeutique sur des modèles de la MH [33], [34]. Néanmoins pour l'instant une barrière subsiste, celle de la vectorisation du modificateur génétique dans des zones aussi larges et peu accessibles comme le cerveau humain.

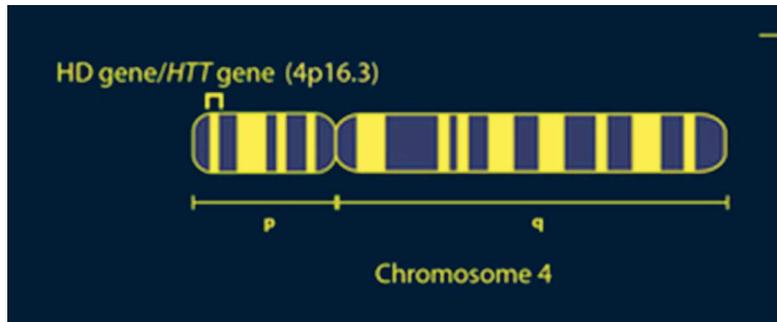
1.1.3. Aspect moléculaire

Le gène *HTT*, anciennement appelé IT15, code pour une protéine : la Huntingtine (Htt). Lorsque ce gène est muté, la Htt produite est anormale. Dans ce chapitre, nous allons nous intéresser à la structure de cette protéine dans des conditions physiologiques et pathologiques de MH mais également à la séquence du gène et à son évolution au cours de l'Histoire.

1.1.3.1. Le gène : *HTT*

Chez l'Homme, le gène *HTT* est un gène localisé en 4p16.3, c'est à dire dans le locus 16.3 du petit bras du chromosome 4 (Figure I-9).

Figure I-9 Représentation du chromosome 4 humain.



Emplacement du gène HTT en 4p16.3. Extraite de : <https://ghr.nlm.nih.gov/condition/huntington-disease>

Ce locus est particulièrement large, il s'étend sur 180 kb et plus précisément de la base 3076237 à la base 3245692 sur le brin codant. Il est composé de 74 introns et 67 exons. L'épissage alternatif peut donner 22 isoformes différentes avec notamment 5 isoformes récemment mises en évidence par l'équipe de Ruzo *et al* [35], la protéine complète étant d'environ 3144 acides aminés.

La Htt, est une protéine ubiquitaire, exprimée dans de nombreux tissus, les neurones ne sont pas les seules cellules touchées. La Figure I-10, tirée de « *HUGO Gene Nomenclature Committee* » montre ce caractère ubiquitaire de la protéine. Cette figure représente la quantité d'ARNm dans chaque organe, normalisée avec le RPKM (« *Reads per kilo base per million mapped reads* »).

Figure I-10 Taux d'expression de HTT dans l'organisme.

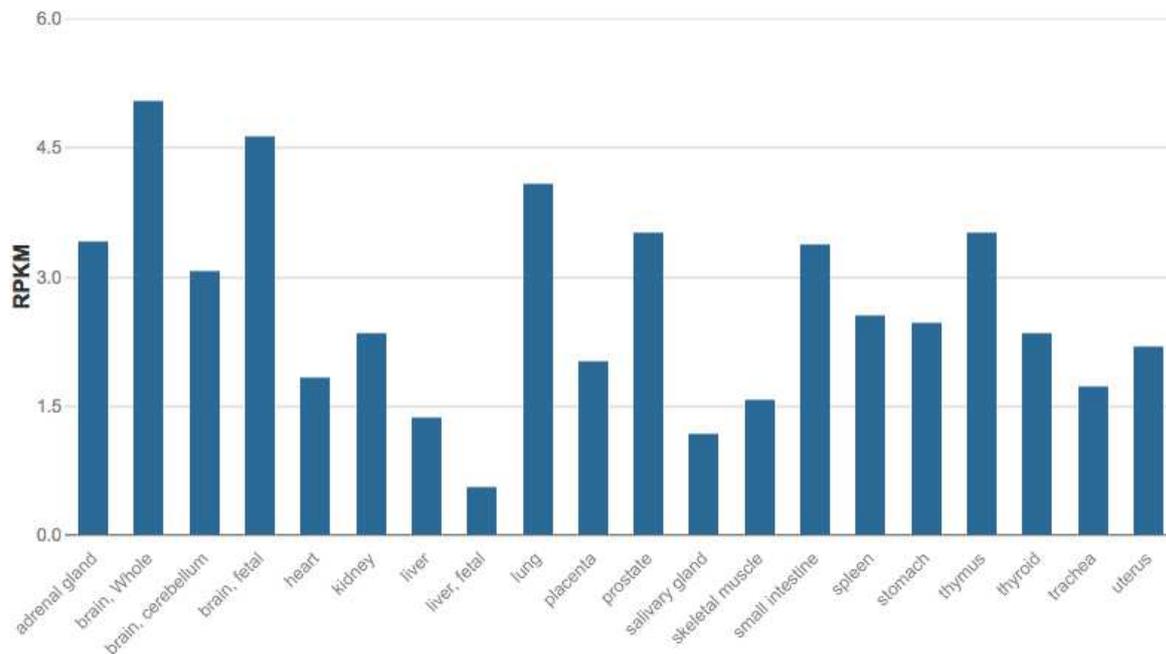
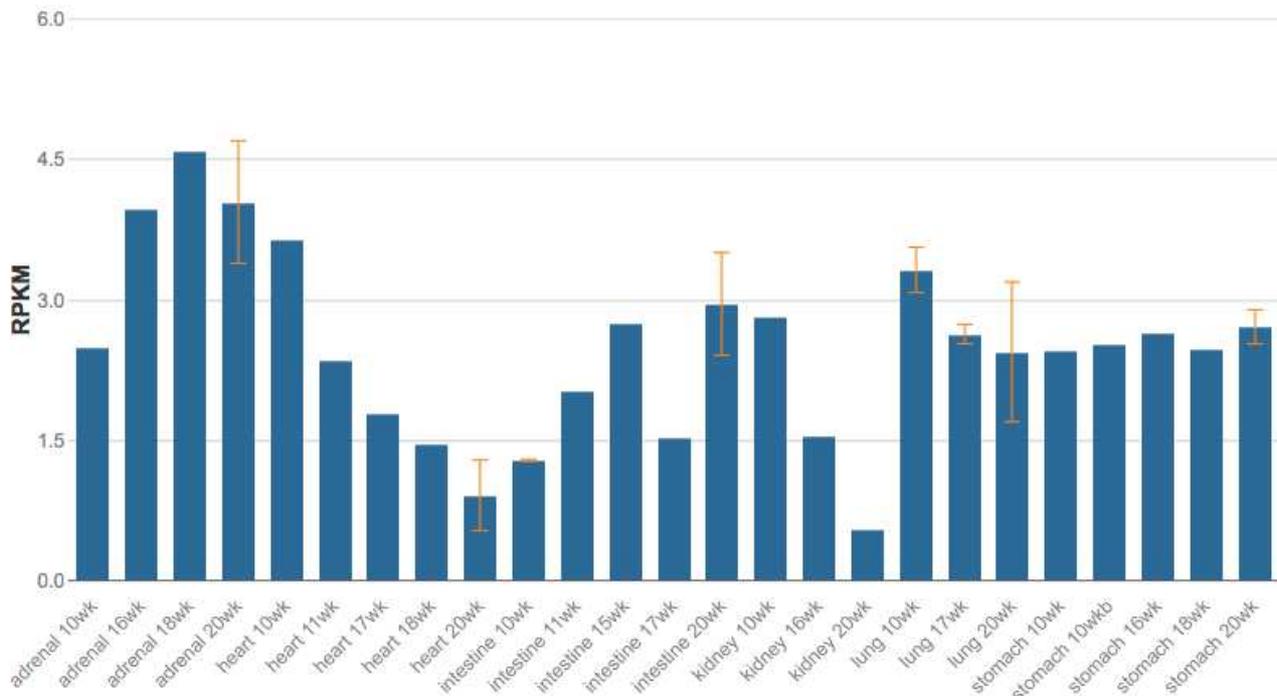


Figure extraite de HUGO Gene Nomenclature Committee présentée par aceview (NCBI)

Le cerveau n'est que l'une des structures exprimant le plus le gène *HTT*. En effet, on trouve dans les mêmes ordres de grandeur, entre 6 et 9 RPKM, plusieurs autres structures comme les testicules, la peau, la rate, les ganglions lymphatiques et dans une moindre mesure de nombreux autres organes avec entre autres, les poumons, les reins, le tissu adipeux et les différents segments de l'intestin. Le NHPRTR, pour « *Nonhuman Primate Reference Transcriptome Resource* », a collecté des informations sur les taux de transcrits de *HTT* et les résultats corrélerent avec les résultats d'HUGO. Néanmoins, ils observent également un taux très important dans le muscle squelettique, près de deux fois les taux d'ARNm présents dans le cerveau. Le NHPRTR met également en évidence que le gène *HTT* est exprimé de manière plus importante que l'expression d'un gène moyen.

HTT a aussi un pattern d'expression différent en fonction du stade de développement. La Figure I-11 montre l'évolution de la transcription dans différents organes durant le développement foetal entre 10 et 20 semaines.

Figure I-11 Evolution de l'expression de HTT au cours du développement*Figure extraite de HUGO Gene Nomenclature Committee présentée par aceview (NCBI)*

Il est intéressant de noter que les dynamiques d'expression ne sont pas les mêmes en fonction des organes. Ainsi, on observe que dans les glandes surrénales et l'intestin, le taux de *HTT* ARNm augmente du simple au double voir au triple pour l'intestin entre la 10^{ème} et la 20^{ème} semaine, contrairement au cœur et aux reins qui voient leur taux d'ARNm diviser par trois au cours de cette période du développement. En revanche, les poumons et l'estomac ont des taux relativement stables au cours du développement. Malheureusement, aucune donnée n'est présentée sur le cerveau.

De plus, lors de sa transcription, la polyadénylation peut se faire à au moins cinq endroits différents donnant 5 ARNm différents [36]. Notamment on observe un transcrit court de 7,9 kb qui ne semble pas être traduit *in fine*, contrairement aux deux plus grands ARNm [36]. L'un est d'environ 10,3 kb et est exprimé de manière ubiquitaire, tandis que le transcrit le plus long d'environ 13,7 kb est exprimé de manière plus spécifique dans le cerveau. Dans différents modèles de MH il est noté que le ratio des deux plus grandes formes varie au même titre que le ratio d'environ 11% des gènes ayant des formes alternatives suite à des variations de polyadénylation [36]. Ceci suggérant que cette variation ne semble pas être une cause de la MH mais plutôt une conséquence.

1.1.3.2. La protéine : Huntingtine

Le gène *HTT* code pour une protéine, la huntingtine (Htt). La Htt est une protéine particulièrement grosse d'environ 3144 acides aminés et est retrouvée dans de nombreux organismes.

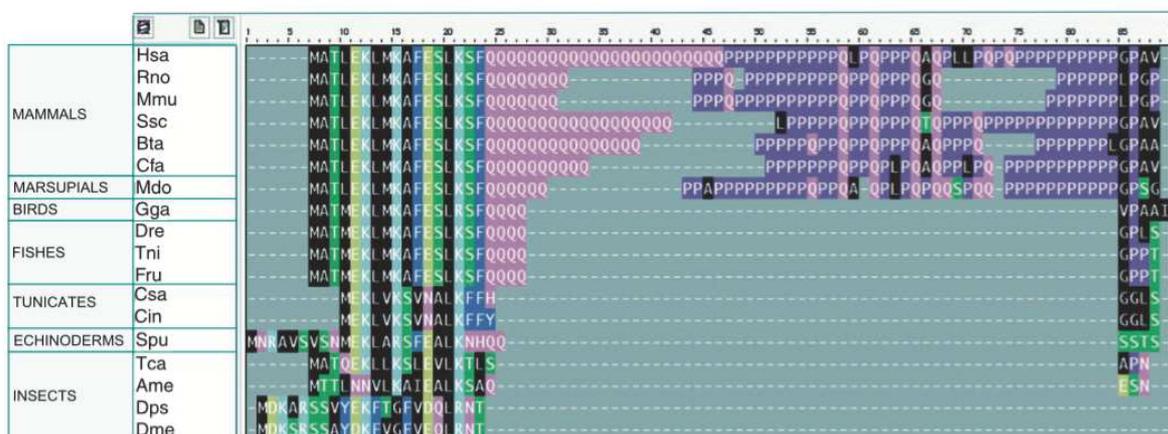
1.1.3.2.1. Structures

La séquence d'acides aminés qui compose la Htt présente de nombreux domaines ou motifs procurant à la protéine ces nombreuses fonctions.

1.1.3.2.1.1. Evolutions et conservations.

Au sein des vertébrés, la Htt est particulièrement bien conservée, comme illustrée sur la Figure I-12 extraite des travaux de Zuccato *et al* [6].

Figure I-12 Représentation des séquences des gènes de *HTT* chez l'Homme et de ses homologues dans différentes espèces



Les différentes séquences d'acides aminées proviennent des espèces suivantes : *Homo sapiens* (Hsa); *Rattus norvegicus* (Rno); *Mus musculus* (Mmu); *Sus scrofa* (Ssc); *Bos taurus* (Bta); *Canis familiaris* (Cfa); *Monodelphis domestica* (Mdo); *Gallus gallus* (Gga); *Danio rerio* (Dre); *Tetraodon nigroviridis* (Tni); *Fugu rubripes* (Fru); *Ciona savignyi* (Csa); *Ciona intestinalis* (Cin); *Strongylocentrotus purpuratus* (Spu); *Tribolium castaneum* (Tca); *Apis mellifera* (Ame); *Drosophila pseudoobscura* (Dps); et *Drosophila melanogaster* (Dme). La figure est extraite des travaux de Zuccato *et al* (2010).

En effet sur cette figure, on peut observer dans différents groupes de vertébrés : mammifères, marsupiaux, oiseaux et poissons que la Htt présentent de nombreuses homologies entre les espèces. A titre d'exemple entre la Htt présente chez l'Homme et

l'espèce de vertébrés la plus divergente, le fugu, il existe une conservation de séquence proche de 80%. À titre de comparaison, on retrouve entre 20 et 50% d'homologie avec l'homologue de la Htt présent chez *Drosophila melanogaster*.

D'après les travaux de Kauffman *et al* [37], la Htt semble être présente dans des espèces relativement anciennes de deutérostome, et notamment dans les oursins. De plus, des travaux plus récents semblent mettre en évidence le fait que la région C-ter de la protéine soit la plus conservée au cours de l'évolution, alors que la partie N-ter semble avoir évolué plus rapidement [38]. Tartari *et al* suggèrent que la partie C-ter présente dans des organismes avec un système nerveux rudimentaire mais aussi dans des organismes avec un système nerveux très développé, jouerait un rôle dans la fonction de la Htt en tant que protéine nécessaire aux fonctions de base d'un système nerveux, contrairement à la partie N-ter qui semble moins conservée et évoluée avec la complexification du système nerveux et qui pourrait tenir un rôle dans des fonctions relativement nouvelles apparues au fil de l'évolution.

Le domaine PolyQ présent dans la partie N-ter est notamment sujet à des modifications au cours de l'évolution. La Figure I-12. montre que l'oursin (*Spu*) semble être une des espèces les plus anciennes présentant ce qui pourrait être l'ancêtre du domaine PolyQ chez l'Homme. En effet, sur l'homologue de la Htt de l'oursin près de la région N-ter est présent un doublé de glutamines. Au fur et à mesure de l'évolution le domaine PolyQ s'accroît. D'un doublet de glutamines chez l'oursin jusqu'à une répétition de plus de 20 glutamines chez l'Homme. Il est intéressant également de se focaliser sur l'évolution du PolyQ chez les vertébrés. En effet, au fur et à mesure que l'on converge vers l'Homme, la taille du domaine PolyQ semble augmenter. Zuccato *et al* notent cependant une exception chez les espèces murines, contenant de 7 à 8Q. Ainsi on retrouve par exemple un PolyQ d'environ 18Q, de taille similaire à celui de l'Homme, chez le sanglier (*Ssc*). Au vu de ces résultats phylogénétiques, Zuccato *et al* suggèrent que le PolyQ aurait un rôle important dans les fonctions de la Htt dans les systèmes nerveux complexes. Néanmoins, une donnée qui n'est pas présentée dans les travaux de Zuccato *et al* est la taille du PolyQ chez des primates non humains. À l'aide du programme COBALT mis à disposition par le NCBI, j'ai observé les homologies de séquences de la Htt chez l'humain et deux espèces de primates non humains : *Pongo abelii* et *Callithrix jacchus* plus communément appelés respectivement l'orang-outan et le ouistiti. Les séquences sont présentées dans la Figure I-13 et l'arbre phylogénique est présenté dans la Figure I-14.

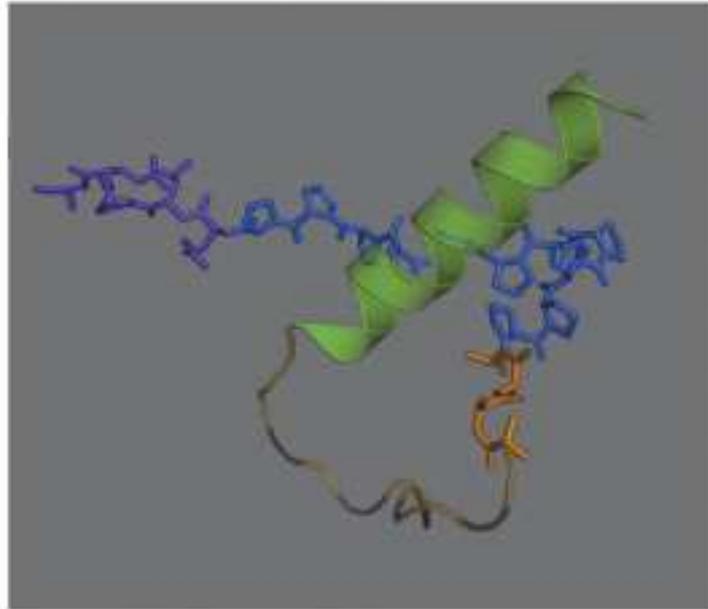
sénescence accompagnée d'une augmentation du taux d'ATP dans les fibroblastes. En revanche, la distribution subcellulaire de la Htt ne semble pas affectée. Ces résultats montrent donc que le PolyQ n'est pas nécessaire à l'apparition d'un système nerveux complexe fonctionnel.

Un autre élément important présent dans la région N-ter est une région riche en proline (PRR) présent juste après le domaine PolyQ. Ce domaine PRR apparaît d'un point de vue évolutif, contemporain à l'augmentation de la taille du PolyQ. Ainsi, on observe que chez les poissons et les oiseaux qui ont un domaine PolyQ de 4 glutamines, que ce domaine PRR n'est pas présent. Cependant, les mammifères possèdent ce domaine PRR. De plus, Steffan *et al* [39] montrent *in cellulo* qu'une Htt exprimée avec un large domaine PolyQ et un domaine PPR est plus soluble qu'une même Htt exprimée sans le domaine PRR. Le PRR semble donc maintenir la Htt dans un état soluble, expliquant la concomitance de son apparition avec celle de l'élargissement du domaine PolyQ.

1.1.3.2.1.2. Structures primaires, secondaires, tertiaires et quaternaires

Depuis 1993 et la découverte du gène [1] la Htt a été largement étudiée. Néanmoins, peu d'analyses ont pu être réalisées pour observer la conformation de la protéine, notamment à cause de la taille très importante de celle-ci, rendant difficile les approches cristallographiques et de spectroscopie de masse. Pour pallier à ce problème, certaines équipes s'intéressent à des fragments de la Htt, comme Kim *et al* [40] montrant les différentes structures de l'exon 1 de la Htt avec 17Q. L'exon 1 transcrit les 67 aa premiers acides aminés. Ces travaux semblent montrer que le domaine PolyQ est entouré par deux hélices, alpha coté N-ter et poly-proline côté C-ter. Le domaine PolyQ semble avoir plusieurs conformations. En effet, le domaine PolyQ forme des conformations de plusieurs types : hélice alpha, boucles et pelotes aléatoires. Ces conformations semblent dépendre du contexte protéique. D'autres études semblent montrer que la taille du PolyQ ne semble pas particulièrement changer les propriétés structurales de ce domaine [41]. La Figure I-15 extraite des travaux de Kim *et al* [40] révèle la structure 3D de l'exon 1 de la Htt.

Figure I-15 Représentation 3D de la structure de l'exon 1 de la Htt.

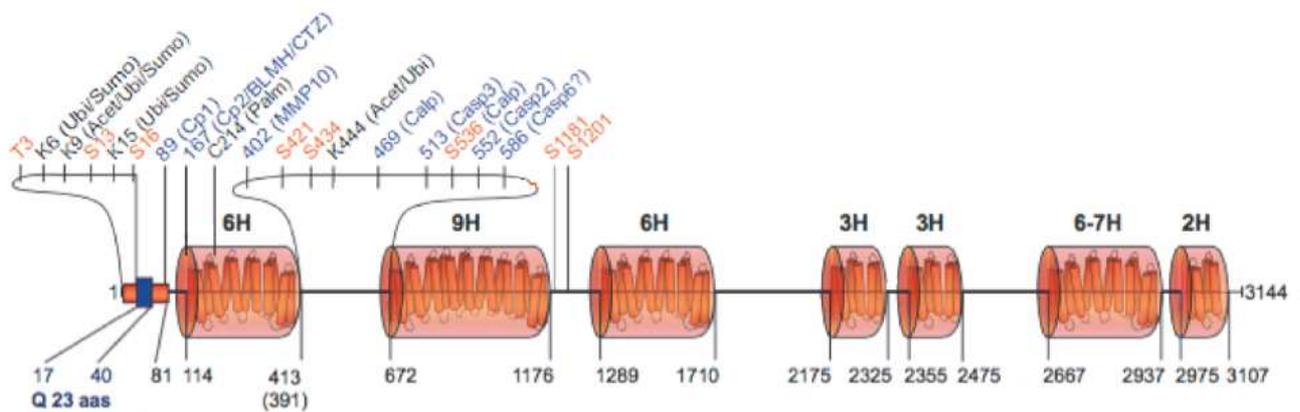


En vert est représenté l'hélice composée des 17 premiers acides aminés. En orange est représenté le PolyQ de 17 glutamines. En bleu est représenté la partie N-ter de l'hélice PRR (en modèle baton). En violet est représenté la partie C-ter de l'hélice PRR. Figure adaptée des travaux de Kim et al (2009).

De plus, il semblerait que l'hélice alpha en amont du PolyQ est nécessaire et suffisante à l'accrochage de la Htt à la mitochondrie et à sa co-localisation avec l'appareil de Golgi et avec le réticulum endoplasmique [42].

La structure primaire de la Htt est plus connue. La Htt est une protéine qui présente de nombreux sites de clivages, de modifications post-traductionnelles, et des interactions avec d'autres protéines. La Htt et ses différents sites sont représentés dans la Figure I-16, extraite des travaux de Saudou et Humbert [5].

La Htt présente de nombreux sites de clivages représentés en bleu sur la figure. Trois sites de clivages à la calpaïne sont recensés en position 469 et 536. Plusieurs sites de clivages par différentes caspases sont également connus : 513 caspase 3, 552 caspase 2 et 586 caspase 6. Tous ces sites sont situés à moins de 150 acides aminés d'intervalle rendant cette région particulièrement sujette au clivage. Cependant, d'autres sites ont récemment été découverts. Notamment en position 89, 167 et 402, où des sites de clivage à la cathepsine Z et à la stromelysin-2 sont retrouvés.

Figure I-16 Structure de la Htt

Les régions cylindriques oranges représentent des régions riches en domaines HEAT. Au-dessus de chaque région est représenté le nombre de domaines HEAT (ex. : 9H ; 9 domaines HEAT). Les acides aminés en noir représentent les sites de modifications post-traductionnelles suivantes : Ubi, ubiquitinylation; Sumo, sumoylation; Acet, acétylation; Palm, palmytation. Les acides aminés en bleu représentent des sites de clivage. Les acides aminés en orange représentent des sites de phosphorylation. La figure est adaptée des travaux de Saudou et Humbert (2016).

Malgré ces nombreux sites, certains travaux comme ceux de Saudou et Humbert [5] font état du fait que pour le moment aucune preuve n'a été apportée que le clivage de la Htt soit un événement nécessaire à son fonctionnement en condition physiologique, et suggèrent que le clivage de la forme sauvage semble plutôt être un événement se produisant en condition pathologique et/ou de mort cellulaire. Néanmoins, Wellington *et al* [43] montrent que le clivage de la Htt intervient même en condition sauvage.

La Huntingtin est composée de nombreux acides-aminés, pouvant être le site de modifications post-traductionnelles. Ces modifications peuvent être de plusieurs natures : phosphorylation (ajout d'un groupe phosphate, sur une sérine principalement), acétylation (incorporation d'un groupe acétyle sur une lysine), palmytation (greffe d'un acide gras sur une cystéine), ubiquitinylation (fusion d'une ubiquitine sur une lysine), et sumoylation (fusion d'une protéine SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier) également sur une lysine). Tandis que la phosphorylation et l'acétylation peuvent avoir de nombreuses conséquences en fonction de la cible, l'ubiquitinylation entraîne en général la dégradation de la protéine. La sumoylation, bien qu'ayant un mécanisme de fusion proche de l'ubiquitinylation, semble avoir un rôle sur le fonctionnement de la protéine [44]. Enfin, la palmytation aurait un rôle dans l'encrage de la protéine dans les membranes ou dans l'adressage de la protéine dans les différents

compartiments cellulaires. La Htt présente de nombreux sites de phosphorylation représentés en orange sur la figure. La phosphorylation de la sérine434 (S434) diminue le clivage par la caspase 3, tandis que la phosphorylation de la S536 diminue le clivage par la calpaïne [45]. De manière intéressante, la phosphorylation de S13 et S16 augmente l'élimination de la protéine sauvage ou mutante [46]. Gu *et al* [47] ont observé l'effet qu'avait la substitution de ces sérines par des acides aspartiques (phospho-mimétique) ou des alanines (non phosphorylable) dans une mHtt exprimée chez des souris. L'expression d'une mHtt avec des acides aspartiques a pour conséquence d'abolir complètement les phénotypes pathologiques induits par la présence de la mHtt. La phosphorylation de S421, S1181 et S1201 semble agir sur le transport de vésicules le long des axones. La phosphorylation de S421 augmente le transport antérograde, tandis que la phosphorylation de S1181 et S1201 augmentent les déplacements de manière générale. L'acétylation de certaines lysines est également observée, et semblerait avoir un rôle dans la dégradation de la protéine [5]. Un long domaine PolyQ altérerait l'ubiquitinylation de la protéine et diminuerait l'efficacité du protéasome, entraînant *in fine* une moins bonne élimination de la mHtt [6]. En condition mutante, des déficits du mécanisme de palmytation sont notés [5]. Ces déficits provoquent des problèmes sur l'adressage et l'encrage de nombreuses protéines. Quant à la sumoylation, Steffan *et al* [39] montre que celle-ci empêche l'agrégation de mHtt et augmente sa toxicité.

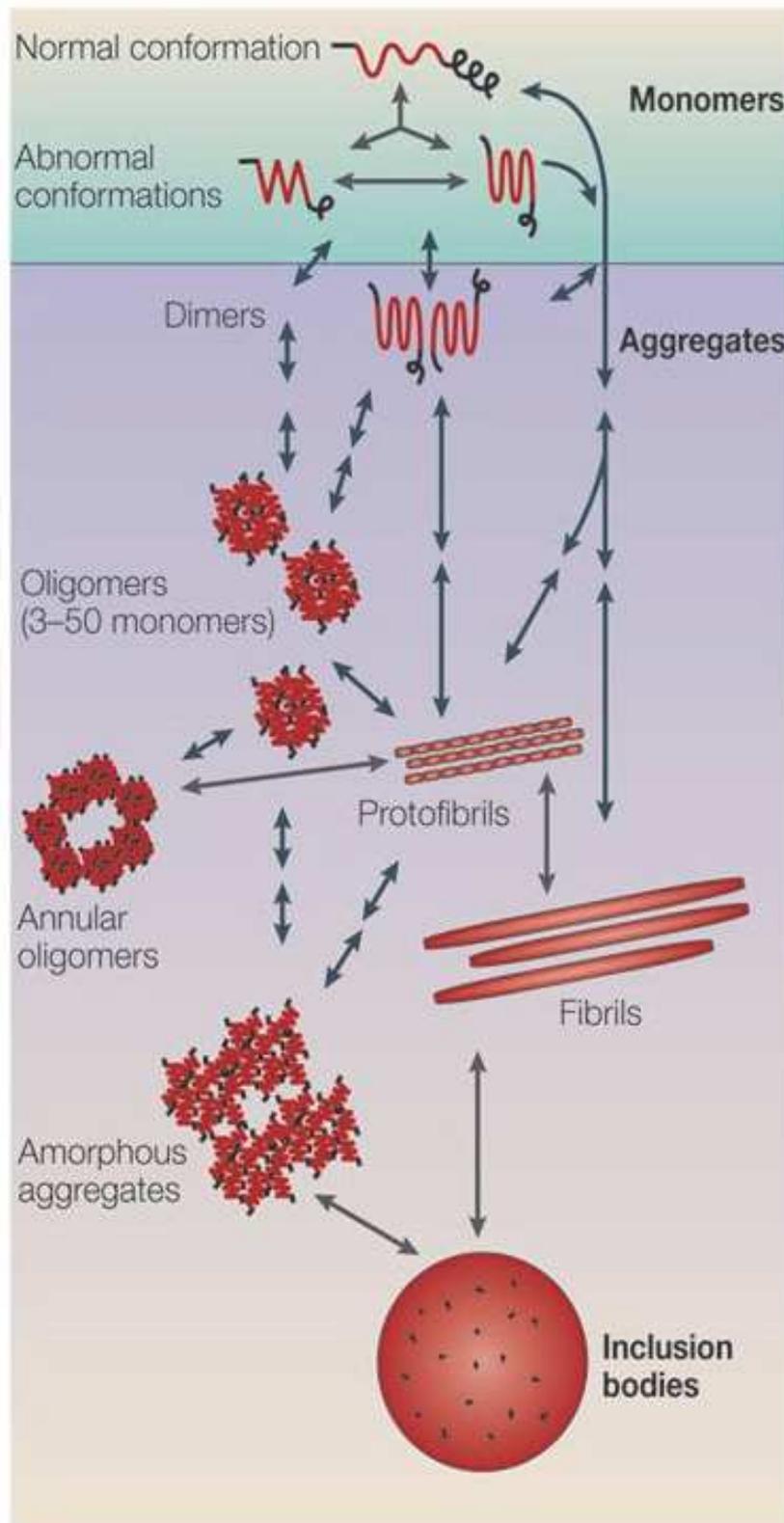
La Htt présente également vers sa partie C-ter des domaines NES (nuclear export signal) et NLS (nuclear localisation signal), servant au transport de molécules du noyau vers le cytoplasme [6]. Cornett *et al* [48] montrent qu'en N-ter, une région de la Htt interagit avec TPR (translocated promoter region), permettant l'export de protéines du noyau vers le cytoplasme. Cornett *et al* [48] observent également que sans ce domaine, la Htt s'accumule dans le noyau. Plus précisément Maiuri *et al* [38] montrent que le remplacement de la S16 par un phospho-mimétique bloque l'exportation. La Htt, présente dans le noyau et le cytoplasme, aurait donc un rôle *via* ces domaines dans le transport de molécules à travers la membrane nucléaire.

De plus, la Htt présente plusieurs régions riches en domaines importants pour les interactions protéine-protéine : les domaines HEAT, dont le nom provient des 4 protéines qui présentent ce motif : Huntingtin, Elongation factor 3, protéine phosphatase 2A et TOR1 [49]. Non seulement ces domaines sont importants pour l'interaction de la Htt avec d'autres protéines, mais il semblerait aussi que ces domaines HEAT puissent interagir entre eux [50], permettant éventuellement l'homodimérisation ou le repliement d'un monomère. Enfin, les domaines HEAT sont des domaines très conservés entre les espèces [50].

Finalement il est important de parler de la capacité de la mHtt à s'agréger. En effet, la mHtt adopte une conformation particulière permettant leur interaction. Plusieurs types de

structures sont ainsi produites. De la plus petite : l'homodimère, à la plus grande, la formation d'agrégats visibles en microscopie optique également appelé corps d'inclusion. En plus des variations de taille, ces structures peuvent prendre différentes conformations [51]. Ainsi on peut retrouver les amas de mHtt former des structures annulaires ou des fibrilles. Les corps d'inclusions observables en microscopie optique, sont composés de différentes formes de mHtt, des mHtt entières mais également tronquées, et de structures différentes, oligomères ou fibrilles. La Figure I-17 représente ces différentes formes.

Figure I-17 Représentation des différentes conformations de la Htt



La figure est extraite des travaux de Ross et Poirier (2005).

Il est intéressant de mettre en relief ce phénomène d'agrégation avec les travaux de

Steffan *et al* [39] sur le PRR et le PolyQ et de remettre ces observations dans un contexte phylogénique. En effet, il semble intéressant de constater qu'une anormale, et rapide (au cours d'une génération) augmentation du PolyQ sans évolution du PRR provoque des problèmes conformationnels de la Htt. Le phénomène d'agrégation est seulement présent chez l'Homme, alors que des espèces comme le sanglier ont des PolyQ d'environ 18 glutamines. Le PRR ne varie que très peu au sein des mammifères. Tandis que les poissons et les oiseaux ont seulement 4 glutamines dans leur PolyQ. On peut donc penser qu'avec 4 glutamines ou moins sur le PolyQ, le PRR n'est pas nécessaire à la solubilisation de Htt. Entre 5 et environ 35 glutamines le PRR présent chez les mammifères est suffisant pour solubiliser la Htt. En revanche, chez l'Homme où la Htt peut avoir un PolyQ plus grand supérieur à 35, le PRR n'est plus capable d'assurer la solubilité de la mHtt, entraînant l'apparition d'agrégats de différentes tailles et différentes formes.

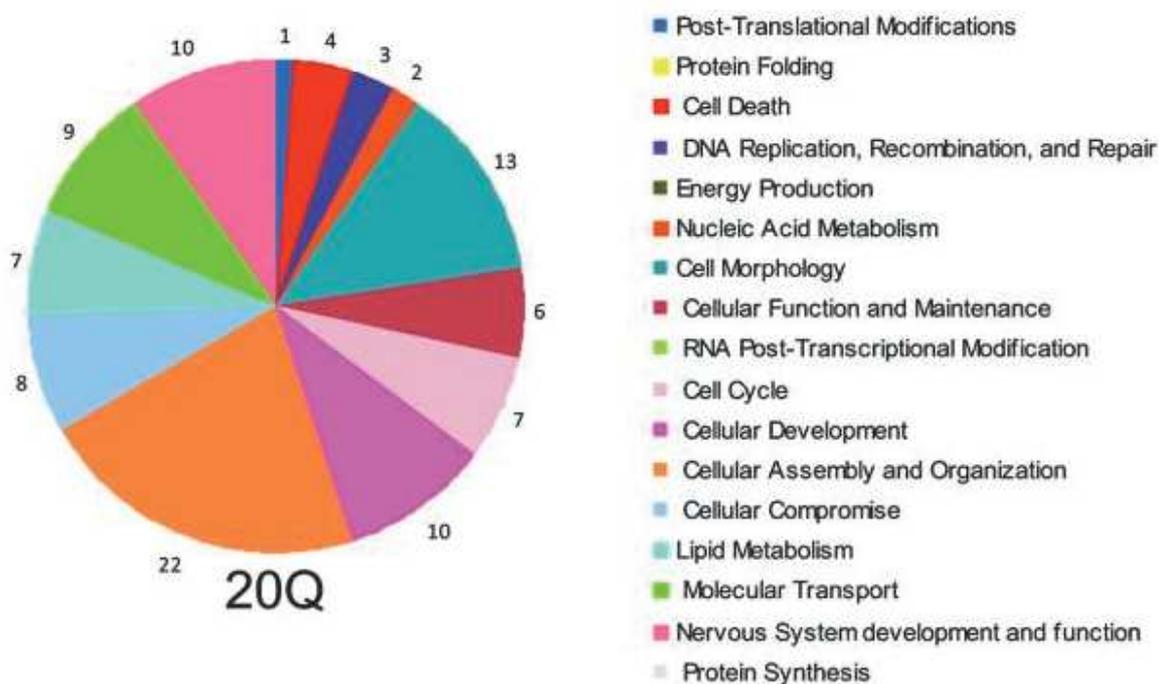
1.1.3.2.2. Fonctions

La Huntingtin est une protéine qui interagit avec de nombreuses protéines et donc, a un rôle dans de nombreuses fonctions cellulaires.

1.1.3.2.2.1. Interactomes

Plusieurs interactomes ont été établis suggérant le rôle de la Htt dans de nombreux mécanismes cellulaires [52], [53]. La Figure I-18 extraite des travaux de [52] représente un interactome de la Htt qui donne un bon aperçu du nombre de partenaires qu'a la Htt.

Figure I-18 Interactome de la Htt



La figure est extraite des travaux de Ratovitski et al (2012).

Cet interactome classe les différentes interactions de la Htt physiologique en fonction de leur rôle dans différents mécanismes cellulaires : mort cellulaire, repliements protéiques, cycle cellulaire, transport moléculaire, *etc.* On observe que la Htt va interagir avec de nombreuses protéines ayant un rôle dans la morphologie (indigo) et l'organisation (orange) de la cellule. Egalement, de manière intéressante, Ratovitski *et al* [52] compare l'interactome d'une Htt avec un PolyQ de 20 glutamines et un interactome avec une mHtt de 50 glutamines et observe que la mHtt va beaucoup plus interagir avec des protéines impliquées dans la mort cellulaire. Ces travaux sont réalisés sur des cultures de neurones striaux STHdH Q7/7 développés par Surya *et al* [54] transfectés, exprimant une huntingtin de 586aa soit avec 20Q soit avec 50Q. Bien que le striatum soit une structure particulièrement importante dans la MH, la Htt est ubiquitaire, cet interactome est donc à relativiser par rapport au fait qu'il ne concerne que des neurones du striatum. De plus, la Htt n'est pas entière et des domaines HEAT présents en amont du 586^{ème} acides aminés sont notamment manquants. D'autres interactomes ont été réalisés notamment par Shirasaki *et al* [53]. Ces travaux présentent des résultats en spectroscopie de masse obtenus sur des cerveaux de souris BAC-HD, exprimant une Huntingtin complète mais avec un domaine PolyQ élargi. Shirasaki *et al* observent alors que les interactions de la mHtt avec les autres protéines varient d'une structure à l'autre du cerveau mais également au cours du développement. Ces différentes recherches sur les

interactomes de la Htt montrent que la Htt est une protéine interagissant avec de nombreux partenaires, près de 350 [55] et jouerait un rôle dans de nombreux mécanismes. Néanmoins d'autres études montrent que les variations d'interactomes entre la Htt et la mHtt pourraient être causées par l'agrégation de mHtt et non pas par la mHtt elle-même [56]. En effet, Devranche *et al* s'intéressent à l'interaction de Htt et de mHtt avec SH3GL3, une protéine connue pour avoir une affinité plus faible avec la mHtt que la Htt [57]. *In vitro*, dans des conditions où la mHtt ne forme pas d'agrégat, Devranche *et al* montrent de manière intéressante que l'affinité entre mHtt/SH3GL3 et Htt/SH3GL3 est la même.

Dans le chapitre qui suit, nous allons nous intéresser aux différents rôles qu'a la Htt à travers ces partenaires.

1.1.3.2.2.2. Développement

Depuis l'identification du *HTT*, de nombreux modèles développant la MH mais aussi des modèles surexprimant ou empêchant l'expression de la Htt ont été créés. L'étude de ces modèles a permis de mieux identifier les différentes fonctions de la Htt.

Encore récemment, la Htt a été montrée être une protéine nécessaire à des stades précoces de la vie [58]. En effet, Wang *et al*, à l'aide d'un modèle de souris knock-out (KO) Htt inductible, ont pu observer l'effet qu'avait l'absence de Htt au cours du développement et notamment durant la formation du système nerveux. L'effet de l'absence de Htt pendant le développement embryonnaire, était déjà connu [59], [60]. Pendant le développement embryonnaire, l'absence totale de Htt entraîne la mort de l'embryon avant le 9^{ème} jour. Les analyses post-mortem semblent montrer notamment une mort cellulaire anormalement élevée au niveau de l'ectoderme. D'autres études [59] montrent que la présence de moins de 50% de la Htt endogènes provoque de sévères malformations du système nerveux et le décès des souris est observé peu de temps après leur naissance. De plus, il semblerait que l'absence de Htt pendant le développement semble pouvoir être pallié par la présence de mHtt et également que la mHtt n'interfère pas de manière drastique dans le développement bien que certains marqueurs cellulaires de la pathologie soient observables [61].

La létalité à l'état embryonnaire des souris KO n'avait jusqu'à relativement récemment pas permis d'observer ce que pouvait engendrer l'absence de Htt chez l'adulte. Wang *et al* observent de manière intéressante que lorsque l'expression de *HTT* est bloquée chez des jeunes souris de 2 mois, elles meurent au bout de 10 jours. Wang *et al* observent que la cause de la mort serait d'origine pancréatique et constatent en particulier une importante inflammation de cette structure. En revanche, lorsqu'ils bloquent l'expression de *HTT* chez

des souris plus âgées, 4 et 8 mois, respectivement 70% et 95% survivent et ne présentent pas de phénotype pathologique particulier. Aucun effet sur la survie des neurones n'est observé. Ces résultats sont cependant contradictoires avec d'autres études qui montrent un rôle de la Htt dans de nombreux mécanismes cellulaires et notamment un effet pro-apoptotique de l'inhibition de l'expression de la Htt [5], [6], [62], [63]. En effet, les phénotypes observés par Wang *et al* comme le poids et le rotarod ne sont le reflet que d'une petite partie des phénotypes dépendants de la Htt. Des études sur l'état cognitif, comme des tests de mémoire et/ou des analyses de la plasticité synaptique, permettrait d'observer d'un autre point de vue et de voir potentiellement des effets de l'absence de Htt.

De manière intéressante, d'autres études similaires ont été réalisées mais cette fois-ci sur la drosophile [60]. L'inhibition de l'expression de la Htt endogène ne semble pas empêcher le développement jusqu'à l'âge adulte. En revanche à l'âge adulte des désordres au niveau de plusieurs fonctions sont notés, notamment des déficits au niveau de la mobilité et sur la longévité, d'un point de vue cellulaire des déficits au niveau des boutons synaptiques sont présents.

Ces observations semblent montrer que la Htt endogène chez la drosophile qui ne contient pas de PolyQ ne soit pas nécessaire au développement du système nerveux mais par contre contribue à son bon fonctionnement. En revanche chez les souris la Htt est nécessaire au développement du système nerveux. Néanmoins Neveklovska *et al* semblent montrer que ni le PolyQ et ni le PRR ne soient nécessaires au bon développement [64].

Plusieurs équipes ont cherché à comprendre quels sont les mécanismes moléculaires et cellulaires qui pourraient être impactés à la Htt au cours du développement. Barnat *et al* [65] ont observé que la Htt était présente dans des régions du néocortex où les neurones de projection passaient d'un état multipolaire à bipolaire. Pour comprendre le rôle de la Htt dans cette partie du cerveau, ils ont bloqué par électroporation l'expression de Htt spécifiquement dans cette zone. De ces expériences, ils ont observé que la Htt était nécessaire à la maturation du néocortex lors du passage des neurones d'une forme multipolaire à une forme bipolaire et également que la Htt était nécessaire dans le maintien de la forme bipolaire pendant leur migration de la zone ventriculaire vers la plaque corticale. Cet effet serait dû à une mauvaise régulation de Rab11, ce qui entraînerait un mauvais adressage de la Cadherine-2. En revanche ce phénotype n'est pas sauvé par la présence de la mHtt [65].

Egalement, Godin *et al* [66] montrent que la Htt régule les complexes de Dynéine durant la mitose et est donc essentielle à la bonne polarisation du fuseau mitotique et par conséquent à la division des cellules progénitrices du cortex.

Finalement Keryer *et al* [67] observent dans la souris que la Htt régule également l'apparition des cils notamment importants dans les épendymocytes au cours du

développement. En effet, la Htt semble interagir à travers HAP1 (huntingtin associated protein 1) sur le transport de PCM1 (pericentriolar material 1 protein) ce qui diminuerait la formation des cils, entraînant à terme un phénomène d'hydrocéphalie. Karam *et al* confirment également l'importance de la Htt dans la formation des cils de cellules ciliées [68]. Godin *et al* montrent que l'expression de mHtt ne semble non seulement pas compenser l'absence de Htt mais qu'en plus la mHtt provoquerait également une accumulation de PCM1 dans le centrosome et entraînerait la formation de cils plus long et *in fine* des problèmes de circulation du liquide céphalo-rachidien.

La Htt est donc nécessaire dans le développement du système nerveux et la mHtt bien qu'entraînant quelques effets toxiques semble pouvoir remplir les fonctions fondamentales de la Htt pour le développement du système nerveux.

I.1.3.2.2.3. Survie cellulaire

La survie cellulaire est particulièrement affectée par l'absence de Htt et la présence de mHtt. Ce phénomène est particulièrement visible chez l'Homme. Notamment en histologie *post-mortem* lorsqu'on observe la taille des ventricules, qui est le reflet de la taille du cerveau et en particulier du striatum. L'importante mort cellulaire impacte la taille mais également le poids total du cerveau chez les patients atteints, avec une diminution de plus de 20% [21].

De nombreux travaux ont montré le lien entre la Htt et la survie cellulaire. Tout d'abord, la surexpression de Htt a un effet protecteur contre des effets de différents agents toxiques y compris la mHtt. Les travaux de Rigamonti *et al* [69] montrent qu'une augmentation de la Htt n'a pas d'effet sur la survie en soi mais permet de protéger des effets pro-apoptotiques passant par une augmentation de l'activité de certaines caspases, induites par la privation de sérum, l'application de 3-NP (3-nitropropionic acid), une toxine mitochondriale, et également Bik et Bak deux protéines pro-apoptotiques de la famille des Bcl-2. De plus, Rigamonti *et al* [69] observent que la partie de la Htt comprise entre 63aa et 548aa semble suffisante à cet effet protecteur, excluant donc le polyQ situé en amont de cette région. D'autres équipes se sont justement intéressées aux effets protecteurs de la Htt contre les effets toxiques induits par la mHtt. L'équipe de Ho *et al* [70] observe que l'expression de Htt réduit de manière significative la mort cellulaire induite par l'expression d'une mHtt. En réalisant cette expérience sur des cellules neuronales et non-neuronales, Ho *et al* montrent que non seulement le mécanisme de mort cellulaire induit par la mHtt n'est pas spécifique des cellules nerveuses mais que le sauvetage induit par la Htt ne l'est pas non plus. L'excitotoxicité induite par une dérégulation de la voie glutamatergique est un phénomène

également présent dans la MH et qui entraîne la mort cellulaire par l'activation de la protéolyse dépendante de certaines caspases. Leavitt *et al* [62] observent que les effets toxiques induits par l'injection d'agonistes des récepteurs NMDA du glutamate chez des souris Wt (*wild-type*), sont bloqués chez des souris surexprimant la Htt. En revanche, cet effet protecteur n'est pas présent chez des souris exprimant la mHtt [62].

De plus, l'absence de Htt augmente la mort cellulaire sans stimuli extérieur [63], [66]. Dragatsis *et al* [71] montrent grâce au système Cre/LoxP l'effet de la délétion de Htt sur des souris de 5 jours. Dragatsis *et al* observent sur ces souris une importante dégénérescence des neurones, des troubles moteurs et une mortalité précoce. Egalement, Yu Zhang *et al* [63] observent que l'absence de Htt augmente l'apoptose cellulaire, *in cellulo* mais aussi *in vivo* chez un modèle de souris.

Mugat *et al* ont aussi montré une dégénérescence de cellules pigmentées dans l'œil de drosophile causée par l'expression de mHtt, et de manière intéressante ils ont également observé que ce phénotype était sauvé par la surexpression de la Htt de drosophile de 620 acides aminés [29].

Différentes études ont cherché à comprendre comment la Htt agissait exactement sur la survie cellulaire, et plusieurs mécanismes ont été mis en évidence. Rigamonti *et al* [69] montrent que l'effet de la Htt ne semble pas bloquer la libération de Cytochromes c mais inhiberait directement l'activité de la Caspase-9. De plus, dans les mêmes travaux Rigamonti *et al* montrent que la mHtt semble entraîner une libération basale de Cytochromes c par les mitochondries, augmentant notamment l'activité de la Caspase-9 et a donc un effet pro-apoptotique. De plus, Yu Zhang *et al* [63] observent que la Htt interagit directement avec la Caspase-3, et notent qu'en condition d'inhibition de l'expression de Htt, la Caspase-3 est plus active. La Htt qui interagit avec la Caspase-3 semble donc inhiber son activité pro-apoptotique. De manière intéressante, Yu Zhang *et al* montrent que la mHtt a une plus faible affinité pour la Caspase-3, expliquant ainsi l'augmentation d'activité de la caspase-3 et donc de l'apoptose cellulaire en condition de la MH. La Htt aurait donc un effet anti-apoptotique à la fois à travers une interaction avec la Caspase-3 et la Caspase-9, qui bien que toutes les deux dépendantes du Cytochrome c, entraînent des mécanismes d'apoptose potentiellement indépendants [72].

Le striatum est une structure où la mort cellulaire est particulièrement importante en condition de MH. Plusieurs études se penchent sur les mécanismes expliquant pourquoi cette structure est particulièrement affectée [6], [73]. Galvan *et al* étudient notamment le rôle de la DCLK3 (doublecortin like kinase 3) une protéine particulièrement exprimée dans les neurones du striatum et sous-exprimée en condition de MH. Cette protéine semble avoir un rôle dans la transcription de très nombreux gènes *via* une interaction avec SAGA (Spt-ada-

Gcn5 acetyltransférase), un important régulateur de la transcription. La sous-expression de DCKL3 entrainerait donc des perturbations au niveau de la transcription de nombreux gènes ce qui, *in fine*, favoriserait l'apoptose des neurones du striatum [73].

De nombreuses études ont également porté sur l'interaction entre la Htt et le BDNF et son récepteur TrkB, des éléments très importants dans la survie neuronale [74], [75]. La voie BDNF/TrkB, qui agit entre autres, *via* les voies PI3K/Akt et ERK, est particulièrement affecté dans la MH [6], [76]–[79]. La physiopathologie complète de la voie BDNF/Trkb en condition de MH est traité en détail dans le chapitre suivant mais il est cependant intéressant de noter que la Htt joue des rôles importants sur la voie du BDNF : dans la transcription du BDNF, *via* une action sur le répresseur de la transcription : REST (RE1-Silencing Transcription factor) qui comme son nom l'indique inhibe la transcription *via* RE1 (Repressor Element 1 sequence) une séquence contenue dans le promoteur du BDNF [80], mais la Htt joue aussi un rôle sur le transport du BDNF et l'adressage de son récepteur TrkB dans les différents compartiments cellulaires [6].

1.1.3.2.2.4. Transport vésiculaire

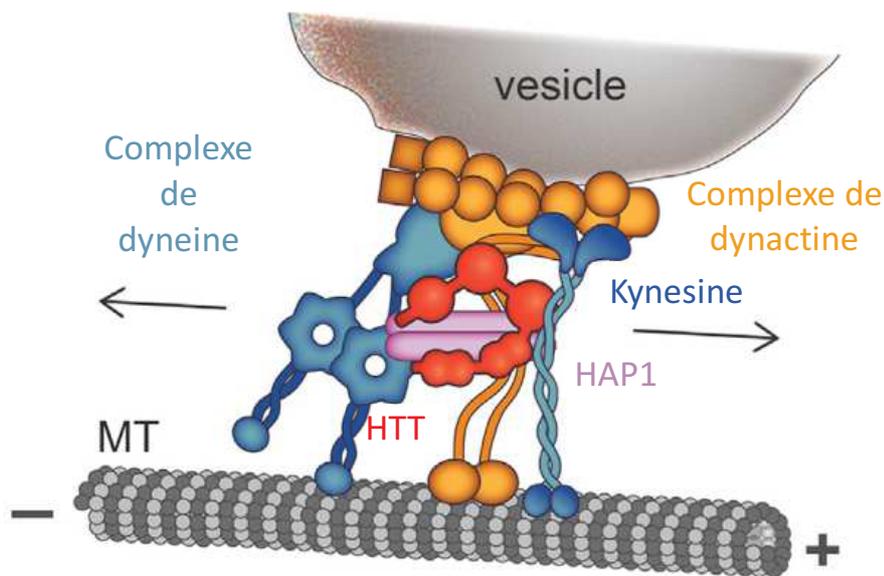
La Htt ne touche pas spécifiquement le transport du BDNF, elle est impliquée dans le transport de nombreux éléments le long des neurites. En effet, plusieurs équipes ont analysé des déficits dans le transport de plusieurs molécules dans des modèles de MH. Gauthier *et al* [81] montrent *in cellulo* que la surexpression de la Htt augmente le transport du BDNF. En effet, la vitesse de déplacement des vésicules contenant le BDNF augmente alors que le nombre de vésicules statiques diminue. En revanche l'utilisation de siRNA diminuant l'expression de Htt entraîne l'inverse, une diminution de la vitesse et une augmentation des vésicules immobiles. De plus, Gauthier *et al* observent le transport du BDNF également dans des cultures primaires de neurones corticaux provenant de souris knock-in (KI) présentant un ou deux allèles de *HTT* avec un domaine polyQ de 109 glutamines. Il est noté que la présence d'un allèle mutant entraîne des déficits du transport de BDNF et de manière intéressante que le déficit est le même avec un ou deux allèles mutants, et même en absence d'allèle sauvage. En revanche, l'expression du Htt permet de protéger des effets toxiques induits dans ces neurones KI. Liot G *et al* [78] montrent également que la Htt interagit avec TrkB et la Dynéine et que la diminution de la Htt diminue le transport de TrkB. En effet, dans des cultures de neurones du striatum où la Htt endogène est diminuée, Liot *et al* observent que le transport rétrograde de TrkB dans les dendrites est diminué, provoquant une baisse de l'activation de ERK et de la transcription de certaines protéines comme c-Fos. Des problèmes au niveau du déplacement de différentes organelles impliquées dans la dégradation de déchets

dans le cytoplasme sont également observés. Caviston *et al* montrent que l'absence de Htt entraîne un mauvais adressage des endosomes et lysosomes dans la cellule mais contrairement à l'étude de Gauthier *et al*, ici le problème ne viendrait pas de la cinétique du déplacement le long des microtubules mais plus de l'attachement/détachement des endosomes/lysosomes des microtubules. Egalement, Wong *et al* mettent en évidence que la Htt joue un rôle dans le transport des autophagosomes en montrant que l'absence de Htt ou la présence de mHtt entraîne des déficits de ce transport. Ceci conduirait à des problèmes de maturation des autophagosomes et *in fine* à une mauvaise élimination entre autres de la mHtt et des mitochondries dysfonctionnelles. Colin *et al* [82] observent que le transport de VAMP7 est dépendant de la Htt. VAMP7 est une protéine transmembranaire connue pour être localisée sur les endosomes et les lysosomes. McGuire *et al* [83] montrent également que la Htt va jouer un rôle dans le transport de vésicules contenant APP (amyloid precursor protein), protéine à l'origine de la formation des plaques amyloïdes. Egalement le transport des récepteurs GABA-A est affecté en condition de MH [84] dérégulant ainsi les mécanismes d'inhibition des courants synaptiques. Zala *et al* en 2013 [85] montrent que le transport de la Synaptotagmine, une protéine impliquée dans l'adressage des vésicules dans les boutons synaptiques et leur fusion avec la membrane, est également altérée. Dragatsis *et al* [71] observent chez des souris sous-exprimant la Htt une importante dégénérescence des axones, et en particulier des boutons synaptiques pouvant être dû entre autres à un dysfonctionnement de protéines comme la Synaptotagmine nécessaire au fonctionnement de la synapse. De plus, Zala *et al* observent chez la drosophile que la diminution de l'expression de la dHtt (*drosophila* Htt) diminue le transport de vésicules contenant la Synaptotagmine. Ces travaux montrent également que l'expression d'un fragment de la dHtt, les 620 premiers acides aminés, dans des neurones de mammifères dont l'expression de Htt endogène est bloquée permet de rétablir partiellement le transport axonal. Zala *et al* observent notamment que dans ces conditions le transport du BDNF est restauré, recoupant ainsi les observations faites par Gauthier *et al* [81]. De plus, d'autres équipes observent des déficits dans le transport de mitochondries le long des axones en condition de MH [86] Ces différentes études montrent que la Htt a un rôle dans le transport des vésicules mais également dans le recrutement de certains cargos le long des microtubules et que l'élément responsable de cette fonction dans la Htt est commun à la dHtt et à la Htt présente chez les mammifères.

Comment la Htt est impliquée dans le transport a fait l'objet de plusieurs travaux. Les résultats observés chez la drosophile [87] montrent que les 620 premiers acides aminés contiennent la séquence nécessaire au transport axonal, et de plus, les études phylogéniques montrent que ni le PolyQ ni le PRR, absent chez la drosophile, ne remplissent cette fonction.

Plusieurs études [82], [85] montrent que la phosphorylation de la S421 a un rôle primordial dans la régulation du transport axonal et notamment dans l'interaction entre la Htt et les protéines formant les complexes moteurs Dyneine/Kinésine. Ainsi Zala *et al* [87] montrent que la phosphorylation de cette Serine permet de restaurer l'interaction de la Htt avec P150, une sous unité de la Dynéine, et confirment l'interaction P150 et Htt et le rôle de cette association dans le transport des vésicules, montré par Gauthier *et al* [81]. Twelvetrees *et al* [84] montrent que les vésicules contenant les récepteurs GABA-A interagissent avec KIF5 (Kinesine family motor protein 5), protéines motrices indirectement à travers HAP1 (Huntingtin-associated protein 1), une protéine qui interagit avec la Htt, et que cette interaction est diminuée en condition de MH. Ces résultats ont été également montrés par Colin *et al* [82]. Wong *et al* [88], étudiant le transport des autophagosome, montrent également que HAP1 est déterminant dans le fonctionnement de la Htt dans le transport axonal. Caviston *et al* [89] confirment que la Htt interagit au sein même du complexe moteur notamment à travers une interaction avec la Dyneine. Un modèle représentant le complexe moteur et la position de la Htt et HAP1 est présenté par Saudou et Humbert [90], dont un extrait est présenté dans la Figure I-19.

Figure I-19 Représentation de la Htt et de ses interactions dans le complexe moteur



La figure est extraite des travaux de Saudou et Humbert (2016).

Plus récemment Zala *et al* [87] montrent que la Htt permet la fixation de GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) sur les vésicules circulantes le long de microtubules. La GAPDH est une enzyme permettant de fournir localement de l'énergie, sa présence dans les complexes moteurs Dynéine/Kinésine permettrait leur bon fonctionnement.

1.1.3.2.2.5. Régulation de la transcription

Comme nous l'avons précédemment vu dans la partie 1.1.3.2.2.2, la Htt a un effet anti-apoptotique en inhibant la répression de la transcription du BDNF [6] mais ceci n'est qu'une petite partie de la régulation de la transcription par la Htt. En effet, la Htt agit sur plusieurs voies importantes dans la régulation transcriptomique.

Pour REST, le rôle de la Htt est assez clair [91]. REST est un régulateur de la transcription qui va bloquer la transcription *via* RE1, un fragment d'ADN de 21-23 paires de base. RE1 est présent dans plusieurs promoteurs. En bloquant ce site de liaison, la transcription des gènes contenant ces séquences de régulation est bloquée, ce qui est le cas pour *BDNF*. La Htt, à travers HAP1, séquestre REST dans le cytoplasme, l'empêchant de rentrer dans le noyau et de bloquer la transcription *via* RE1. En condition mutante la mHtt ne peut plus retenir REST. REST rentre alors dans le noyau et bloque la transcription de ses cibles, empêchant leur répression. Parmi ces gènes, on note le BDNF, mais aussi entre autres Syn1 (Synapsin-1) impliqué dans l'exocytose et Chrm4 (M4 muscarinic receptor), un autorécepteur inhibiteur de la libération l'acétylcholine dans le striatum [92], [93]. De manière intéressante, Aigner *et al* [94] soulignent le fait que l'expression de BDNF augmente la transcription de REST, mettant en évidence une boucle de régulation de transcription du BDNF.

D'autres travaux montrent la régulation d'autres facteurs de transcription par Htt. Marcora *et al* [95] montre que Htt interagissant avec HAP1 (Huntingtin Associated Protein 1) va permettre l'activation, *via* MLK2, de ND (NeuroD) un facteur de transcription essentiel au développement des neurones et à leur survie, facteur également présent dans le pancréas.

De manière intéressante, Saudou *et al* soulignent le fait que les problèmes de transcription dus à la dérégulation de certains facteurs de transcription, en particulier ceux affectés par la Htt dans le cytoplasme, comme REST mais aussi NeuroD [95], pourraient être dus à des problèmes de transport, présentés dans le chapitre précédent.

Li *et al* [96] observent que la mHtt soluble, mais pas agrégée, va se fixer à Sp1 un facteur de transcription de notamment NGFR (nerve growth factor receptor). Résultats également montrés par Dunah *et al* [97] la même année, mais qui observent que la Htt se fixe au coactivateur de Sp1 : TAFII130, résultats confirmés plus tard par Ravache *et al* [98].

Steffan *et al* [99] mettent en évidence d'autres interactions entre la Htt et des éléments régulateurs de la transcription et notamment : le coactivateur CBP (CREB (C-AMP Response Element-binding protein) Binding Protein), le corépresseur mSin3a, ainsi que le facteur de transcription p53. En effet, dans ces travaux on observe que l'exon 1 de la mHtt est capable de rentrer dans le noyau et de s'agréger avec ces protéines diminuant leur activité transcriptionnelle. CBP permet *via* CREB la transcription de nombreuses protéines, importantes pour les neurones et leur fonction comme la plasticité, et parmi lesquelles on notera le BDNF, c-Fos mais également plusieurs neuropeptides. Egalement CBP et mSin3a interagissent et régulent directement p53 et son activité de facteur de transcription qui lui interviendrait dans la transcription de gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, de l'autophagie et de l'apoptose [100].

Cette fois-ci la dérégulation est due à des fragments de la mHtt protéolysée qui entreraient dans le noyau et interfèreraient avec la machinerie transcriptionnelle.

D'un point de vue structurel, il est intéressant de noter que les répétitions de CAG sont un motif courant dans les facteurs de transcription [101] et que le PRR est aussi un motif important dans la signalisation cellulaire [102]. Ainsi, on peut penser que le PolyQ et le PRR qui ne semblent pas influencer le rôle de la Htt dans le transport, ont plutôt un rôle dans les fonctions de la régulation de la transcription de la Htt.

1.1.3.2.2.6. Autres fonctions

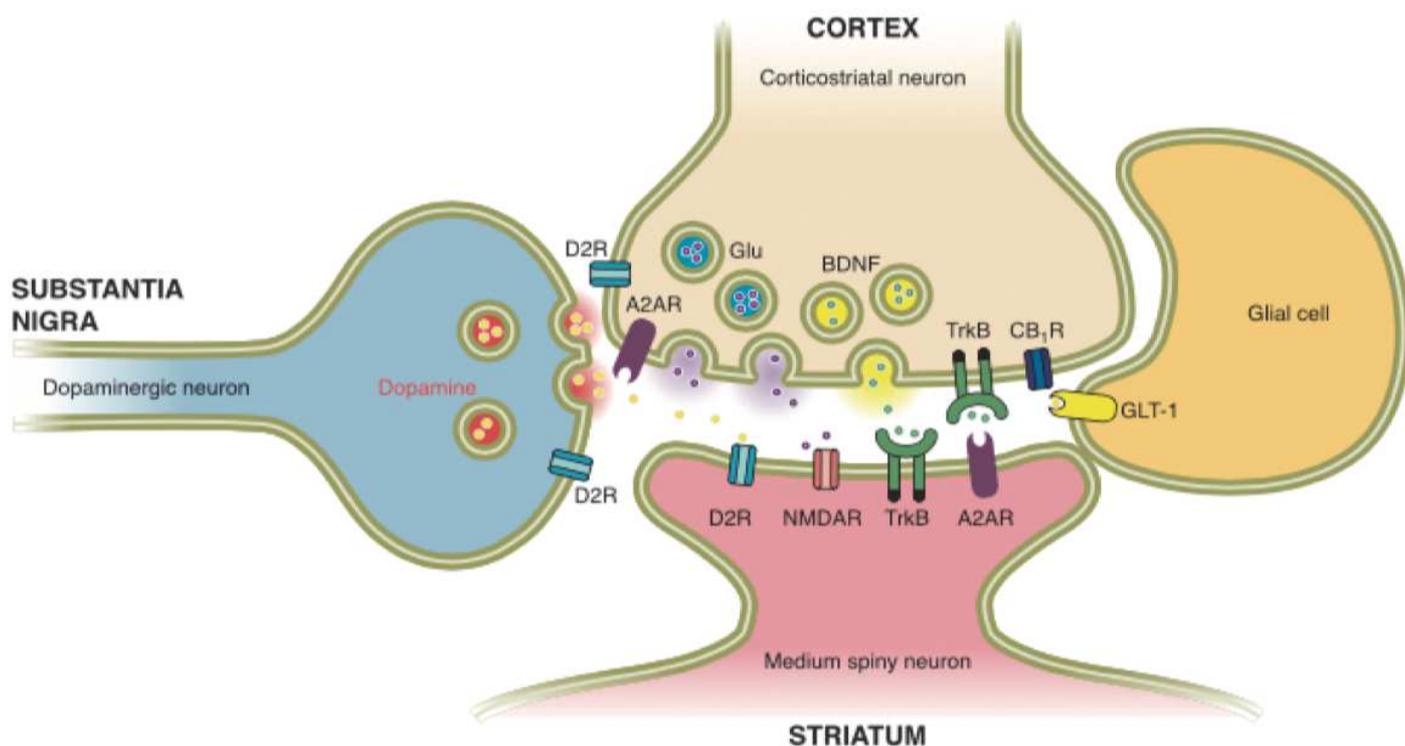
Notamment de par ses interactions avec les facteurs de transcription et son rôle important dans le transport le long des microtubules, la Htt est connue pour avoir un effet dans de nombreux mécanismes cellulaires.

La physiologie des mitochondries est particulièrement affectée en condition de MH que ce soit d'un point de vue structurel ou fonctionnel. En effet encore récemment [103] il a été montré qu'en condition de MH la structure des mitochondries est altérée conduisant à des mitochondries plus petites et sphériques. De nombreux travaux ont également montré que d'un point de vue fonctionnel de nombreux déficits mitochondriaux étaient observables en condition de MH et en particulier une diminution de l'activité de tous les complexes de la chaîne respiratoire [104]. Plusieurs études soulignent en particulier des déficits dans la régulation des courants calciques des mitochondries [104], [105]. Choo *et al* [105] montrent que l'incubation de mitochondries normales avec une mHtt induit les troubles calciques mitochondriaux observés dans des modèles de HD, soulignant ainsi le fait que l'interaction de la mHtt avec la membrane extérieure des mitochondries provoquerait ces déficits de régulation du calcium. Il est intéressant de noter également que l'utilisation de 3-NP (acide 3-

nitropropionic), inhibiteur du complexe II de la chaîne respiratoire, la Succinate Dehydrogénase, est régulièrement utilisée pour simuler *in cellulo* des conditions de MH et que la surexpression de la Succinate Dehydrogénase rétablit l'activité mitochondriale dans des modèles de HD [69], [106]. En condition de MH, la transcription de nombreux gènes est dérégulée dont des gènes impliqués dans la biogénèse et le fonctionnement de la chaîne respiratoire [107]. Egalement, il semblerait qu'il y ait des déficits dans le transport des mitochondries [81] et dans la fission et la fusion des mitochondries, mécanismes importants dans la dégradation des mitochondries dysfonctionnelles [103].

Comme on a pu le voir précédemment, Htt joue un rôle dans le transport des récepteurs GABA-A, mais les voies gabaergiques ne sont pas les seules voies de neurotransmetteurs affectées. En effet, la Htt va aussi avoir un effet dans les voies glutamatergiques et dopaminergiques, éléments particulièrement importants le long de la liaison corticostriatale comme le montre la Figure I-20 extraite des travaux de Zucatto *et al* [6].

Figure I-20 Représentation de la liaison corticostriatale



La figure est extraite des travaux de Zucatto et al (2010).

La Htt est impliquée à plusieurs niveaux le long de la voie glutamatergique. En condition de MH, il va y avoir une diminution de GLUT1 le transporteur du glutamate présent

sur les astrocytes [108], ce qui entraîne une moins bonne élimination du glutamate de la fente synaptique et augmente l'effet excitateur de la libération de glutamate. De plus, cet effet excitateur est également amplifié par le fait que sur l'élément post-synaptique, les récepteurs NMDA du glutamate sont plus sensibles en condition de MH [109]. En effet, la Htt joue un rôle notamment à travers PSD95 sur la ré-internalisation de ce récepteur, rôle qui n'est plus aussi bien assuré en condition pathologique de MH. La libération du glutamate par les neurones corticaux est dépendante des entrées dopaminergiques [110]. Les neurones de la substance noire compacte libèrent de la dopamine (DA) dans le striatum. Cette dopamine a un effet sur la libération du glutamate par l'élément pré-synaptique à travers l'activation des récepteurs D2 de la dopamine. Or, ces éléments que ce soit les récepteurs de la dopamine ou la libération de dopamine sont altérés en condition de MH, provoquant des libérations de glutamate anormales [110]. De plus, l'activation de récepteurs de l'adénosine [111] et cannabinoïdes [112] influent sur la libération de glutamate, et ces deux acteurs sont altérés en condition de MH. En condition de MH, il y a donc une moins bonne élimination du glutamate au niveau de la fente synaptique par les astrocytes et des récepteurs NMDA plus sensibles sur l'élément post-synaptique, ceci entraînant une importante excitotoxicité. Les récepteurs aux cannabinoïdes ont également un rôle dans la libération de BDNF au niveau de l'élément présynaptique vers l'élément postsynaptique, mécanisme également altéré en MH [112].

De plus la Htt qui est une protéine ubiquitaire et a également des fonctions dans d'autres types cellulaires. Notamment, elle est exprimée dans les cellules importantes dans le système immunitaire. De récents travaux [113] montrent que l'expression de mHtt dans les cellules myéloïdes provoquerait un taux anormalement élevé de cytokines.

Comme nous l'avons vu dans la partie précédente, la mHtt peut s'agréger et former différentes structures : de la plus petite : le dimère, à la plus grande : le corps d'inclusion, en passant par des structures comme de petits agrégats de plusieurs mHtt (entières ou tronquées) et des structures plus complexes comme des fibrilles. Dans le chapitre sur la transcription, nous avons vu la capacité de ces petits fragments de mHtt à rentrer dans le noyau et à déréguler l'activité transcriptomique [99], [100]. Le rôle des agrégats est en revanche plus ambigu. En effet, il semblerait que les petits agrégats de quelques dizaines de mHtt soient toxiques [113] alors que les gros corps d'inclusions observables en microscopie optique ne soient pas corrélés avec la toxicité induite dans des modèles de MH [51]. Néanmoins, plusieurs travaux utilisent ces agrégats comme biomarqueurs de la MH et corréler leur absence avec une diminution de la toxicité [28], [114].

Pour conclure ce chapitre, il est important de noter qu'en condition de MH, il y a à la fois des pertes de fonction de la Htt sauvage et des gains de fonction toxiques de la Htt

mutant, dérégulant ainsi plusieurs mécanismes cellulaires comme le transport et l'acheminement de protéines et de vésicules dans la cellule mais aussi la transcription de nombreux gènes, provoquant des troubles dans le développement, la transmission synaptique, le système immunitaire, la division cellulaire et la survie des neurones.

Partie 2. Physiopathologie de la voie de signalisation BDNF/TrkB

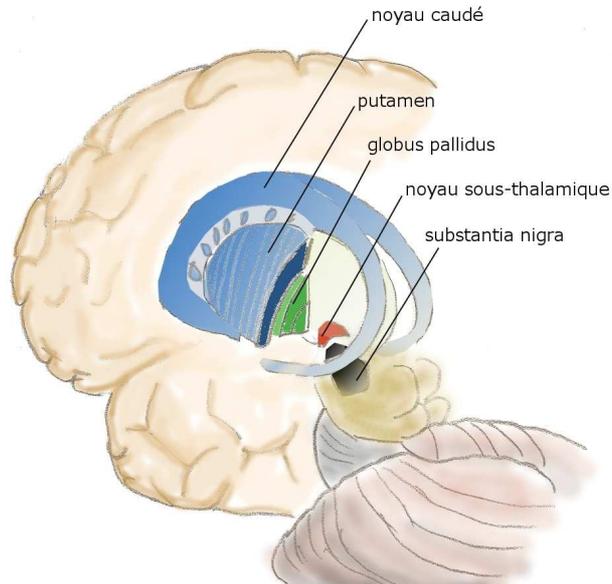
Dans la partie précédente, nous avons vu que la voie de signalisation BDNF/TrkB est particulièrement importante dans la MH, et en particulier autour de la liaison cortico-striatale. Dans cette partie, nous allons décrire plus précisément la physiopathologie de cette voie autour de cette liaison cortico-striatale.

1.2.1. Le striatum et les ganglions de la base

Le striatum est une structure sous-corticale du système nerveux central. Il joue un rôle dans plusieurs fonctions cérébrales comme la régulation de l'activité motrice et certaines formes de cognition [115].

D'un point de vue anatomique chez l'Homme et les autres mammifères supérieurs, le striatum est composé de plusieurs structures, le noyau caudé et le putamen. Le putamen et le noyau caudé sont séparés par la capsule interne (Figure I-21).

Figure I-21 Illustration du striatum



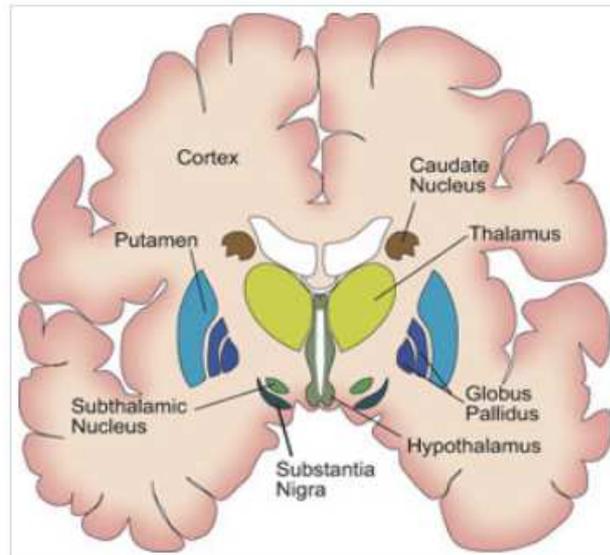
Extraite de <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Noyau-gris-centraux3.jpg>

De plus, le striatum appartient à un plus grand ensemble : les ganglions de la base. Les ganglions de la base sont composés du striatum mais aussi de la substance noire compacte

(SNc), la substance noire réticulée (SNr), du globus pallidus lui-même composé du globus pallidus externe (GPe) et interne (GPi) et des noyaux sous-thalamiques (NST). L'anatomie des ganglions de la base est présentée dans la Figure I-22.

D'un point de vue fonctionnel, les ganglions de la base sont en étroite communication avec le cortex et le thalamus, formant des boucles thalamico-corticales, représentées dans la Figure I-23.

Figure I-22 Schéma anatomique des ganglions de la base



Extraite de : <https://tpecerveauetemotion.wordpress.com>

Figure I-23 Schéma du fonctionnement des ganglions de la base

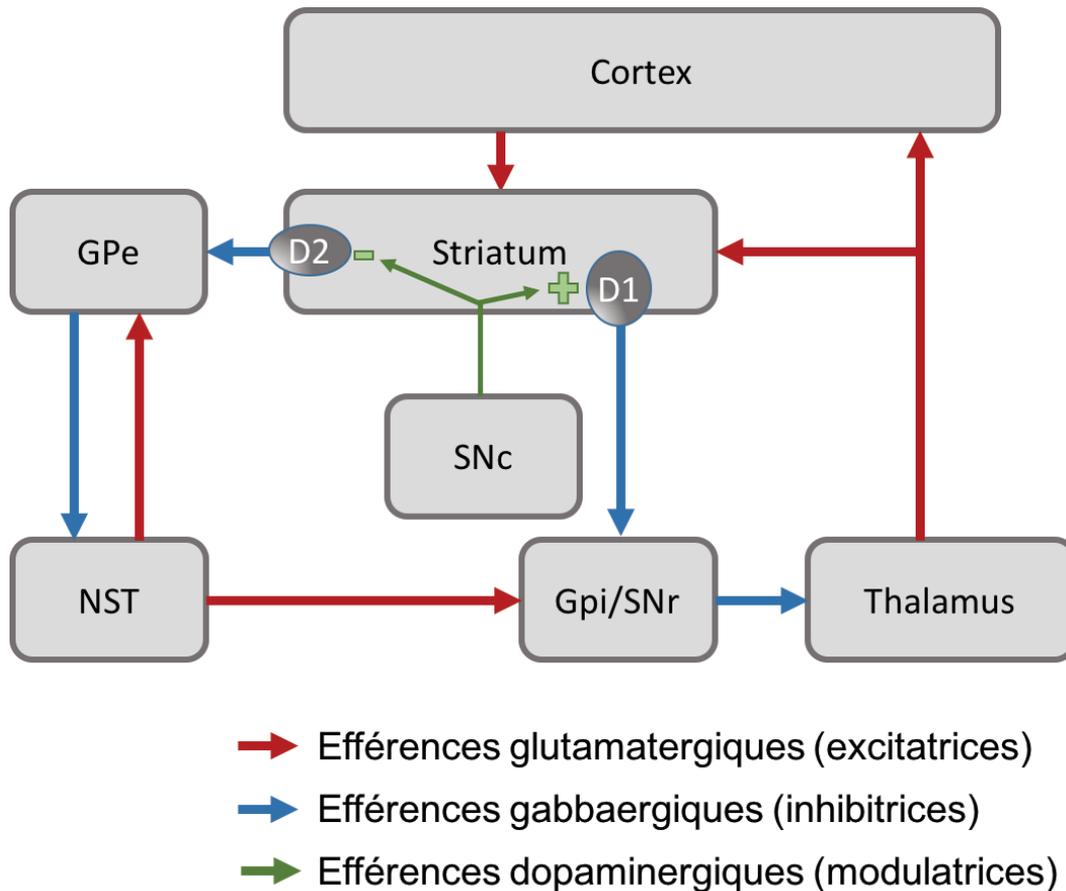


Schéma représentant le fonctionnement des ganglions de la base. Gpe : Globus pallidus externe, GPi : Globus pallidus interne ; NST : Noyau sous-thalamique ; SNr : Substance noire réticulée ;

On peut y observer deux boucles : une directe passant par le GPi/SNr, facilitant les mouvements volontaires, et une indirecte passant par le GPe puis le NST, inhibant les mouvements involontaires [115] [115], [116]. Le striatum a un rôle central au cœur de ces boucles. Le striatum tient ce rôle notamment grâce à la variété de neurones qui le composent. En effet ces différents types de neurones qui reçoivent et envoient des informations venant et allant dans de nombreuses structures du cerveau sont à la base du fonctionnement des ganglions de la base. Les MSN sont les plus nombreux en représentant 95% des neurones du striatum. Ce sont des neurones GABAergiques, c'est à dire qu'ils vont produire le neurotransmetteur GABA (Gamma-AminoButyric Acid) [115]. Le GABA est le principal neurotransmetteur inhibiteur du système nerveux central. Les MSN sont divisés en deux groupes en fonction des types de récepteurs à la dopamine qu'ils expriment, D1 ou D2. Les entrées dopaminergiques proviennent en grande partie de neurones de la substance noire compacte (SNc) [117]. Les MSN présentant les récepteurs à la dopamine de type D1

(MSND1) sont excités par les entrées dopaminergiques. L'activation des récepteurs D1 va en effet augmenter le taux d'AMP cyclique (cAMP) et activer la PKA. Ces MSND1 sont également connus pour exprimer des récepteurs à l'adénosine A1 et sécréter la substance P, un autre neuropeptide. Les MSND1 vont surtout avoir des projections efférentes dans le GPi/SNr. Les MSN présentant des récepteurs de type D2 (MSND2) vont au contraire être inhibés lors de l'activation de ces récepteurs par la dopamine. L'activation des récepteurs D2 va en effet inhiber l'activité de l'adényl-cyclase, une enzyme essentielle à la conversion d'ATP en cAMP, activant la PKA [117]. Ces MSND2 sont également connus pour exprimer des récepteurs à l'adénosine de type A2A et sécréter de l'enkephaline. Ces neurones projettent directement dans le GPe. Le striatum est également composé d'interneurones soit cholinergiques, libérant de l'acétylcholine, soit GABAergique, libérant donc du GABA. Ces interneurones contribuent également à la régulation de l'activité des MSN. Cette dualité entre les MSN permet de projeter soit dans le GPi/SNr soit dans le GPe. Le striatum va également recevoir de très importantes afférences glutamatergiques excitatrices venant du cortex et dans une moindre mesure du thalamus. Tous les MSN présentent des récepteurs au glutamate [117].

Dans le cas d'une entrée glutamatergique, les MSND1 et les MSND2 vont être activés. Dans la boucle directe : Les MSND1 GABAergiques innervent les neurones du GPi/SNr. Les neurones du GPi/SNr sont principalement GABAergiques et innervent le thalamus. Le thalamus projette des neurones glutamatergiques activant les neurones dans le cortex. L'activation des MSND1 libère du GABA dans le GPi/SNr et l'inhibe. L'inhibition du GPi/SNr, diminue l'inhibition du thalamus. La diminution de l'inhibition du thalamus augmente l'excitation du cortex, et favorise ainsi l'activité motrice [118].

En revanche, dans la boucle indirecte : Les neurones MSND2 GABAergiques innervent le GPe. Les neurones du GPe principalement GABAergiques, innervent le noyau sous-thalamique (NST). Les neurones NST eux sont principalement glutamatergiques et innervent le GPi/SNr. Lors d'une entrée de glutamate dans le striatum, les MSND2 vont être excités. L'excitation des MSND2 entraînent une inhibition des neurones du GPe. L'inhibition du GPe entraîne une diminution de l'inhibition des neurones NST. En levant l'inhibition des neurones NST on augmente l'excitation des neurones GPi/SNr. Lesquels diminuent l'activité du thalamus L'inhibition du thalamus diminue l'excitation du cortex et ainsi diminue l'activité motrice [118].

En résumé l'activation de la boucle directe favorise le mouvement et l'activation de la boucle indirecte l'inhibe.

De plus, la SNc libère de la dopamine qui va avoir un effet modulateur dans le striatum. Lors d'une entrée de dopamine dans le striatum il va y avoir une excitation des MSND1 et une inhibition des MSND2, ce qui favorise grandement l'activité motrice [118].

Au sein de ces boucles existent des boucles plus petites de rétrocontrôle entre deux structures. On note par exemple que les neurones du NST ont des projections glutamatergiques dans le GPe ainsi lorsque le GPe est inhibé, les NST le sont moins, et libèrent plus de glutamate dans le GPe, excitant ce dernier, lui permettant de libérer plus de glutamate.

La défaillance d'une des structures qui compose ces boucles entraîne de graves problèmes moteurs comme c'est le cas dans la MH où on détecte une importante dégénérescence du striatum. Dans la MH, les neurones à enképhaline, les MSND2, impliqués dans la boucle indirecte, inhibitrices des mouvements involontaires, dégèrent d'abord. Cette dégénérescence entraîne notamment le symptôme de chorée. De plus, plus tard dans le développement de la MH, les neurones de la substance P contenant les récepteurs D1 dégèrent également, entraînant une diminution de l'excitation du thalamus, ce qui se traduit par un symptôme de bradykinésie [6]. Les ganglions de la base sont également affectés dans d'autres maladies neurodégénératives, comme la maladie de Parkinson où les neurones dans la substance noire compacte dégèrent et ne sont plus capables de réguler correctement l'activité du striatum [118].

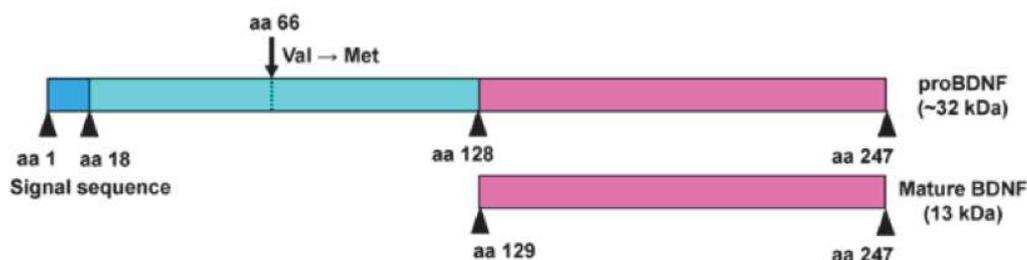
Le striatum reçoit donc des afférences de plusieurs parties du cerveau, entre autres, l'amygdale, le thalamus, l'hippocampe, la substance noire, et le cortex. Ces afférences connectent la partie dorsale et la partie ventrale du striatum de manière différente. De par ces connexions différentes, les MSN composant la partie ventrale et dorsale, dont les populations ne sont pas fondamentalement différentes, vont intervenir dans différentes situations. La partie dorsale ayant des afférences principalement corticales interviendra dans la régulation des boucles thalamico-corticales, décrites plus haut, permettant la régulation des mouvements volontaires ou automatiques. La partie ventrale est plus reliée au système limbique et va être impliquée dans les circuits responsables de la prise de décision et de récompense. De plus, notamment *via* l'interaction des ganglions de la base avec le thalamus, ces derniers jouent un rôle dans des processus plus cognitifs. Mais de manière globale, l'afférence la plus importante du striatum provient du cortex, pas seulement d'un point de vue fonctionnel mais également d'un point de vue de la survie des neurones. De nombreux neurones pyramidaux des couches II à VI du cortex projettent leurs axones dans la partie dorsale du striatum formant la liaison corticostriatale [115], [118]. La liaison corticostriatale est particulièrement importante pour le fonctionnement des ganglions de la base avec l'acheminement de signaux porteurs d'information sur l'activité motrice grâce notamment à la libération du glutamate, principal

neurotransmetteur excitateur du cerveau. De plus, les neurones corticaux sont également essentiels pour la survie même du striatum. En effet, le striatum est une structure qui nécessite mais produit peu de BDNF, un facteur neurotrophique très important dans l'activité des neurones et des réseaux synaptiques mais également dans le développement et le maintien des neurones [6].

1.2.2. BDNF/TrkB

Le BDNF est une protéine très importante pour le système nerveux central. En effet bien que le BDNF soit exprimé dans d'autres organes c'est surtout dans le cerveau que l'on va retrouver cette protéine [75]. Le BDNF fait partie de la famille des neurotrophines, au même titre que le NGF (nerve growth factor), NT3 et NT4 (Neurotrophin-3 et 4). Le gène qui code pour le BDNF est composé de plusieurs exons, 11 chez l'Homme et 9 chez la souris. Mais *in fine*, seul l'exon 9 sera traduit [75], [119], [120]. En revanche, en fonction des structures et du contexte physiopathologique, différents ARNs vont être présents, soit à cause d'épissages alternatifs soit à cause de l'activation de certains promoteurs plutôt que d'autres. En effet, plusieurs promoteurs sont présents dans le gène et sont activés par différentes molécules. On constate par exemple la présence du promoteur II sur l'exon II qui comprend le motif RE1 reconnu par REST [121]. Alors que le promoteur IV est connu pour être sensible aux ions calciques, notamment à cause des motifs CaRE (Calcium Responsive Element) [122], ce promoteur permet donc la transcription du BDNF en réponse à de nombreux stimuli intra et extracellulaires dont le BDNF lui-même. Le promoteur III présente lui un motif CRE (CREBS Response Element) dont l'activité est notamment diminuée en condition de MH [120]. L'exon 9 code pour le pre-proBDNF, une forme immature du BDNF représenté dans la Figure I-24 extraite des travaux de Yoshida *et al* [123].

Figure I-24 Schéma de la maturation du BDNF



La figure est extraite des travaux de Yoshida et al (2012).

Le pre-proBDNF de 247aa perd rapidement sa séquence signal, correspondant aux 18 premiers acides-aminés, lors de son passage dans le réticulum endoplasmique, donnant ainsi le proBDNF. Puis, le proBDNF de 229aa est clivé en BDNF mature de 118aa, soit dans la cellule soit après sa sécrétion où il est clivé dans le milieu extracellulaire. Cette figure présente également un SNP (single nucléotide polymorphisme) en position 66 que l'on présentera dans le chapitre suivant.

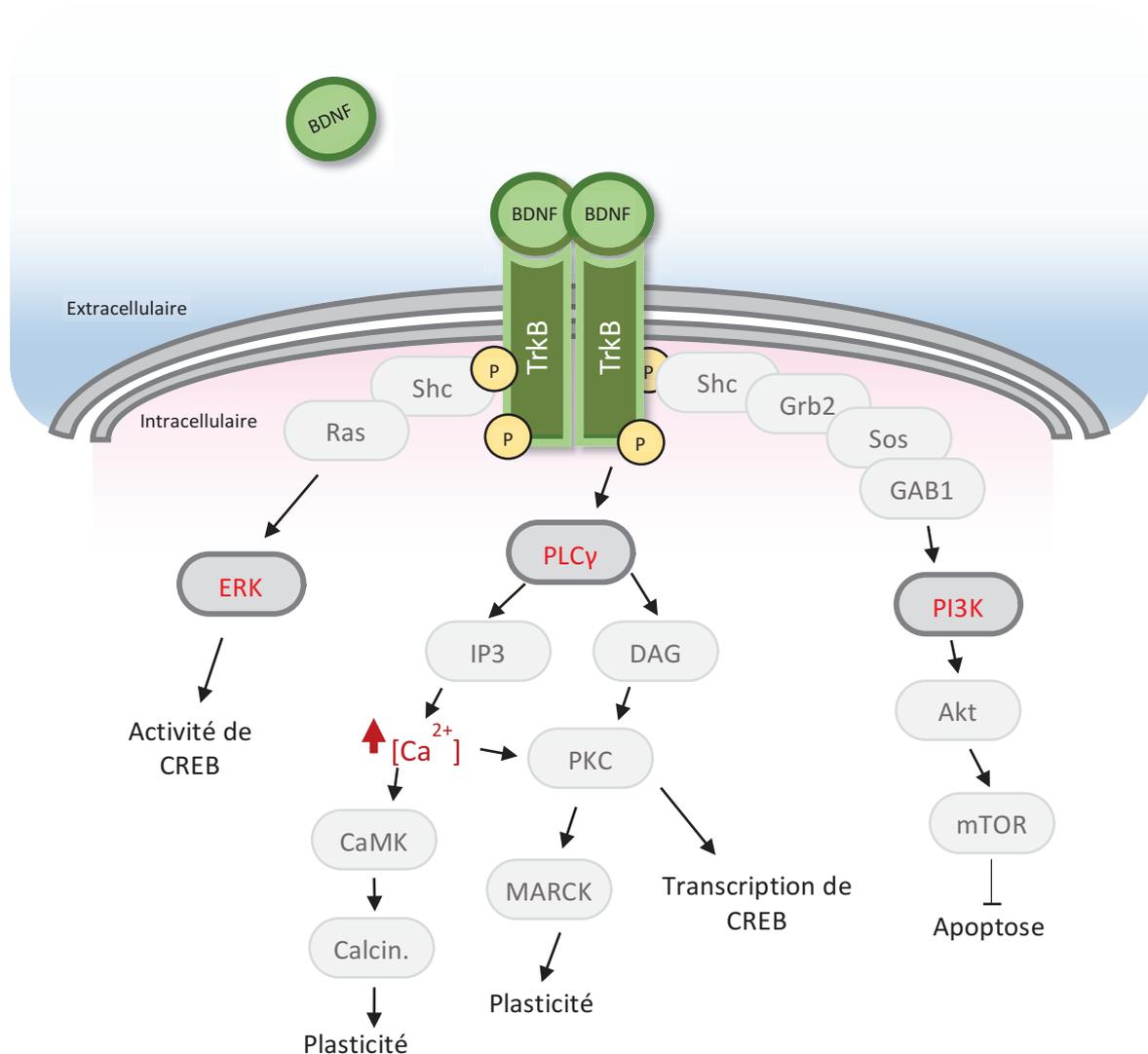
Le BDNF a plusieurs fonctions et est impliqué dans plusieurs mécanismes cellulaires, comme la survie des neurones, la transmission et la plasticité synaptique et la neurogenèse. Egalement, le BDNF a été décrit comme essentiel dans le mécanisme de mémoire notamment à travers son rôle dans la plasticité. Toutes ces fonctions sont possibles grâce à l'activation de son récepteur principal TrkB. TrkB, est un récepteur relativement spécifique du BDNF. C'est par l'activation de TrkB par le BDNF que les effets neurotrophiques sont déclenchés. L'autre récepteur du BDNF est p75, un récepteur qui peut être activé par d'autres neurotrophines mais aussi par le proBDNF. p75 aurait des effets opposés à l'activation de TrkB et serait plutôt impliqué dans la mort cellulaire. L'activation de TrkB enclenche son homodimérisation avec un autre TrkB activé, et permet une autophosphorylation sur deux sites éventuels entraînant l'activation des voies des PLC γ (phospholypase-C gamma), PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase), ou ERK (Extracellular signal-Regulated Kinases).

La phosphorylation de la tyrosine en C-ter, Y785, active la voie des PLC γ qui produit IP3 et DAG. IP3 entraîne la libération d'ions calciques qui activent CaMK, un activateur de la calcineurine (Calcin), qui à son tour active différents facteurs de transcription. De son côté, DAG et la libération d'ions calciques entraîne l'activation de PKC impliqué dans plusieurs mécanismes cellulaires. L'activation de cette voie PKC va entraîner la transcription de CREB, mais aussi le détachement de MARCKS des filaments d'actine permettant son activation. MARCKS est une protéine impliquée dans la morphologie de la cellule et éventuellement dans la plasticité [124]. En effet, la mutation de cette tyrosine entraîne notamment la diminution de LTP [125].

La phosphorylation de la tyrosine 515 sur TrkB va permettre la fixation de Shc, qui active la voie PI3K *via* l'interaction entre Shc, Grb2, Sos et Gab1. Ceci provoque l'activation d'Akt qui augmente la traduction protéique *via* mTOR. L'activation de cette voie permet d'inhiber l'expression de gènes pro-apoptotiques [126]. L'appariement de Shc à TrkB permet également d'activer la voie Ras/ERK qui favorise l'action de CREB.

Les différentes voies de signalisation induites par l'activation de TrkB sont présentées dans la Figure I-25 .

Figure I-25 Les cascades de signalisation activées par TrkB



La liaison du BDNF sur TrkB entraîne l'activation de trois voies. La voie des PLCγ (phospholypase-C gamma), PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase et ERK (extracellular signal-regulated kinases).

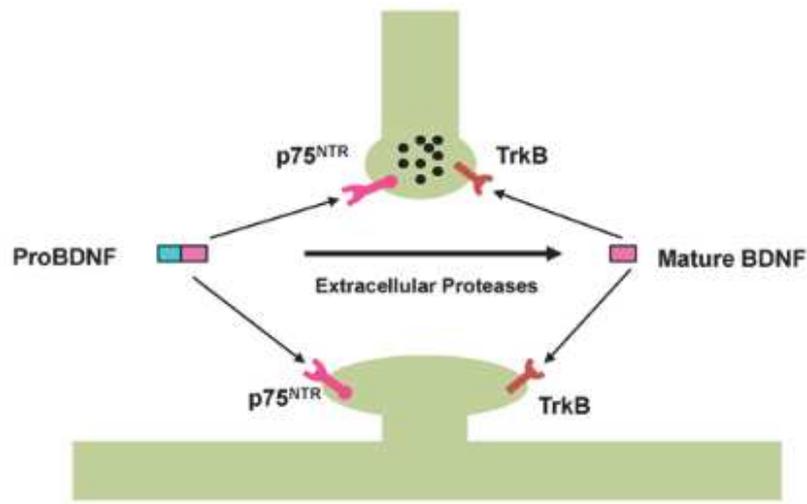
TrkB a également deux isoformes moins connues. Ces isoformes sont des protéines TrkB tronquées de la région intracellulaire. L'affinité avec le BDNF est donc la même mais la cascade de signalisation diffère. Peu d'études portent sur ces isoformes pourtant abondantes dans le système nerveux [127]. Il a été néanmoins trouvé que leur absence entraînait une

diminution de l'arborisation dendritique dans l'amygdale mais pas dans l'hippocampe, et des problèmes neuromusculaires [128].

L'activation de p75, se ferait plutôt par le proBDNF et activerait NFκB qui est impliqué dans la transcription de protéines pro-apoptotiques [123].

La Figure I-26 extraite des travaux de Yoshida *et al* [123] représente la double dualité entre ProBDNF/p75 et BDNF/TrkB.

Figure I-26 Dualité ProBDNF/p75 vs BDNF/TrkB



La figure est extraite des travaux de Yoshida *et al* (2012).

De plus, des hétérodimères peuvent se former entre p75 et TrkB augmentant l'affinité de TrkB avec le BDNF [75].

Le BDNF va agir sur plusieurs mécanismes cellulaires impliqués dans la transmission synaptique. Il est notamment en étroite relation avec les voies glutamatergiques. L'activation de TrkB par le BDNF va phosphoryler la sous-unité NR1 des récepteurs NMDA, l'un des récepteurs ionotropiques du glutamate. Néanmoins, cet effet est bloqué lorsqu'on séquestre le BDNF avec un TrkB-IgG [129]. Cet effet sur NR1 semble plus particulièrement dépendant des voies ERK et PKC mais pas PKA [129]. Egalement, l'activation de TrkB a un effet sur une autre sous-unité du NMDA, NR2B et ceci *via* l'activation de Fyn par TrkB [130]. En revanche, aucun effet du BDNF sur la sous-unité NR2A n'est noté [130]. Le récepteur NMDA n'est pas le seul récepteur du glutamate à être impacté par le BDNF. En effet, le récepteur AMPA est également dépendant du BDNF. Caldeira *et al* [131] montrent que le BDNF permet non seulement d'augmenter le taux d'expression de plusieurs sous-unités du

récepteur AMPA : GluR1, GluR2 et GluR3 mais aussi d'augmenter la présence de GluR1 sur la membrane cellulaire. De manière générale, les récepteurs NMDA vont permettre l'entrée de calcium dans la cellule et les récepteurs AMPA l'entrée de sodium, les deux permettant d'augmenter les EPSC (excitatory postsynaptic current). L'augmentation des récepteurs NMDA et AMPA va donc faciliter la dépolarisation, ou l'excitation du neurone lors d'entrées glutamatergiques.

Le BDNF agit donc sur la voie glutamatergique mais le glutamate agit aussi sur la voie du BDNF [132], [133]. En effet, l'activation des récepteurs NMDA entraîne l'activation de différentes cascades ERK, PI3K et PLC, qui entraînent à leur tour l'activation du facteur de transcription CREB et donc l'activation du promoteur IV du BDNF et donc sa transcription. Egalement Jiang *et al* [132] montrent que sur le promoteur IV du BDNF un site d'attachement avec une protéine BHLHB2 est présent. La BHLHB2 bloquerait l'expression du BDNF. Or, Jiang *et al* observent que l'activation des récepteurs NMDA permet de diminuer la présence de BHLHB2 sur ce promoteur et augmente donc la transcription du BDNF. Néanmoins d'autres études semblent montrer que l'inhibition des voies glutamatergiques en conditions pathologiques de MH semble augmenter la transcription du BDNF [134], [135]. En effet, Squitieri *et al* montrent que le traitement de patients atteints de MH par le riluzole, connu pour bloquer les voies glutamatergiques, diminue l'excitotoxicité et induit une augmentation du BDNF. En revanche, l'effet du glutamate sur le BDNF pourrait être indirect et pourrait passer par une diminution de l'excitotoxicité, ce qui entrainerait une amélioration de la physiologie des neurones et donc une augmentation de l'expression du BDNF.

Egalement, le BDNF est reconnu pour avoir un effet sur un autre neurotransmetteur cette fois-ci inhibiteur : le GABA. En effet, Henneberger *et al* [136] montrent que bloquer l'activité de TrkB ou diminuer l'expression du BDNF augmenterait l'activité de la voie GABAergique et les IPSC (inhibitory postsynaptic current). Cet effet semble passer par l'activation de TrkB par le BDNF, ce qui active la voie PKC et diminue l'expression des récepteurs GABA-A.

De plus, le BDNF et TrkB sont également connus pour être impliqués dans le mécanisme de synaptogénèse et de dendritogénèse [137]–[139]. Fernando Aguado *et al* [137] montrent que la surexpression du BDNF augmente le nombre de synapses. Egalement Yoshii *et al* [139] montrent que le BDNF augmente le transport de PSD-95 dans les dendrites et Penzes *et al* [138] montrent l'interaction de PSD-95 et Kalirin-7 qui augmente le nombre et la taille des dendrites dans des cultures de neurones corticaux.

Tous ces rôles du BDNF en font un acteur principal pour la plasticité. En effet, de nombreuses études montrent que le BDNF *via* une activation de TrkB est un élément essentiel dans le mécanisme de LTP qui est le reflet de la plasticité synaptique et qui est à la base de la

mémoire [125], [140]–[143][144]. Korte *et al* [144] furent une des premières équipes à montrer que la délétion d'une ou deux allèles du BDNF entraîne une diminution de l'amplitude de la LTP. Quelques années plus tard Minichiello *et al* [125] montrent que des souris KO pour TrkB ont d'importants troubles de la mémoire corrélés avec des amplitudes de LTP plus petites que leurs homologues sauvages. Finalement Bekinschtein *et al* [145] montrent dans des modèles où il y a des déficits de mémoire que rétablir la voie BDNF/TrkB permet de récupérer ces déficits.

Le BDNF *via* TrkB agit sur de nombreuses voies de signalisation dont des voies qui activent la transcription du BDNF. De manière intéressante, plusieurs études se penchent sur l'effet de la voie BDNF/TrkB sur la transcription du BDNF [133], [146], [147].

Zheng *et al* notent que l'activation des voies ERK, PI3K, PLC, par le glutamate active la transcription du BDNF, or ces voies sont également activées par TrkB. Le BDNF va donc, à travers TrkB, activer l'expression du BDNF. En revanche, des études plus anciennes montrent que des taux trop élevés de BDNF pourraient diminuer le taux de TrkB [146], [147]. On observe donc tout comme pour la régulation du BDNF par la voie glutamatergique que dans certaines conditions l'activation de la voie BDNF/TrkB entraîne une augmentation du BDNF et dans d'autres une inhibition, mettant en évidence des boucles de rétrocontrôles.

Finalement il est aussi intéressant de parler des cas de polymorphisme nucléotidique du BDNF, en particulier de celui concernant le 66^{ème} acide aminé. En effet, environ 25% des personnes présentent un allèle du gène qui code pour le BDNF avec sur la protéine, la Valine 66 remplacée par une Méthionine. 4% des gens sont homozygotes pour cette mutation. Ce polymorphisme est situé dans la partie « pro » du proBDNF et ne semble donc ni affecter la fonction, ni le taux de transcription du BDNF mais plutôt sa maturation en altérant le transport du proBDNF [90]. Del toro *et al* [148] montrent qu'en condition de MH, le transport post-Golgi du BDNF est altéré mais pas celui de la forme Val66Met.

1.2.3. La voie BDNF/TrkB dans la maladie de Huntington

Un des éléments clef de la maladie de Huntington est la voie BDNF/TrkB le long de la liaison corticostriatale. En effet, le striatum est la structure la plus gravement et précocement affectée dans la MH. De nombreuses études mettent en évidence que la voie de signalisation BDNF/TrkB défectueuse dans la MH semble être au cœur de cette dégénérescence [74], [75], [78], [81] et sa restauration une cible thérapeutique [30], [149]. En effet, comme on l'a observé dans le chapitre précédent de nombreuses études montrent qu'en condition de MH, la transcription du BDNF [91] mais aussi son transport le long de la liaison corticostriatale [81], [99], [150] sont altérés. De plus, non seulement le BDNF est affecté dans la MH mais aussi

son récepteur TrkB. En effet, dans la MH le niveau de protéine de TrkB est diminuée [77], mais également son transport le long des dendrites [78].

Ces déficits sont la cause de nombreux dysfonctionnements dans la MH, ceci est appuyé par le fait que leur restauration permet de récupérer de nombreux phénotypes pathologiques induits dans la pathologie [6]. De nombreuses études sur différents modèles de MH ont montré que la restauration de la voie BDNF/TrkB permettait de récupérer les troubles de la cognition, de la coordination motrice et de plusieurs autres marqueurs défectueux dans le cadre de la MH [30], [135], [151]–[155]. Notamment, Canals JM *et al* montrent que l'application de BDNF exogène sur un modèle de souris développant la MH permet de rétablir des troubles de coordination motrice. De manière intéressante Ryu *et al* [154] montrent de plus que la greffe de cellules souches neuronales humaines sauvages dans un modèle de rat développant la MH a un effet bénéfique sur plusieurs phénotypes pathologiques comme les troubles moteurs et la neurotoxicité du striatum, et que cet effet passe par le BDNF. D'autres équipes [152], [155] et notamment Hockly *et al* [153] utilisent des environnements ultra-enrichis, qui ont pour effet d'augmenter le taux de BDNF, et observe des améliorations dans de nombreux phénotypes pathologiques induits dans la MH. Le Tacrolimus ou FK506 est une molécule qui semble restaurer le transport du BDNF en condition de MH [156] et a des effets bénéfiques sur plusieurs modèles de cette maladie [156]. Ces différentes études montrent qu'en restaurant la physiologie du BDNF, on peut améliorer des déficits de la MH, qui sont également associés à la physiologie de TrkB. Les résultats obtenus lorsqu'on augmente un de ces paramètres sont prometteurs mais montrent également le grand intérêt de trouver un agent thérapeutique permettant d'augmenter plusieurs de ces paramètres à la fois.

Partie 3. Présentation du peptide P42

Dans ce chapitre sera présenté ce qu'est P42, comment il a été isolé, et quel est son effet sur notamment des souris R6/2 développant la MH.

1.3.1. P42

P42 est un peptide de 23 acides aminées dont la séquence est directement tirée de la Htt. P42 a été montré comme ayant des propriétés protectrices contre de nombreux phénotypes pathologiques induits dans différents modèles de MH [29].

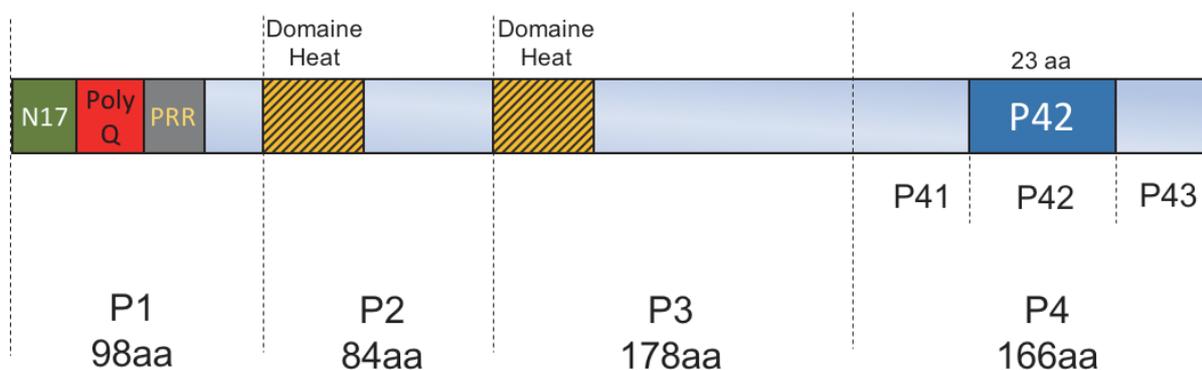
Comment cette séquence a-t-elle été identifiée ?

L'histoire commence avec les travaux de l'équipe de Florence Maschat [29] sur la drosophile. Dans cette étude, il est mis en évidence que EN (Engrailed), un facteur de transcription augmente la transcription du gène *dhtt*. Cet effet est direct et le site de liaison d'EN au sein de *dhtt* a été identifié, et EN agit comme un activateur de *dhtt*. Mugat *et al* observent également l'effet de la surexpression de EN dans un modèle de drosophile exprimant une Htt humaine de 171aa avec un domaine PolyQ de 138Q. Ce modèle développe, entre autres, le phénotype pathologique d'agrégats cytoplasmiques, notamment observé dans les cellules géantes des glandes salivaires. Mugat *et al* observent que la surexpression de EN diminue de manière drastique la quantité d'agrégats et permet de retrouver une distribution plus physiologique de la Htt, le long des microtubules. De plus Mugat *et al* émettent alors l'hypothèse que l'expression de EN agit sur les agrégats à travers l'augmentation de l'expression *dhtt*. Pour conforter cette hypothèse ils testent l'effet de l'expression d'une dHtt de 620aa dans ces mêmes drosophiles. Les résultats observés sont similaires à ceux obtenus avec EN c'est à dire que la présence de dHtt permet de diminuer drastiquement le phénomène d'agrégation. De manière intéressante Mugat *et al* montrent également que l'inhibition de l'expression de *dhtt* endogène *via* l'expression de RNAi contre *dHtt* augmente le phénotype d'agrégation. De plus, la même équipe montre que cet effet protecteur est également présent lorsqu'on l'on exprime une hHtt normale de 548aa sans PolyQ. Des expériences similaires ont été réalisées mais cette fois-ci, sur le phénotype pathologique de toxicité dans les photorécepteurs de l'œil de drosophile. Le constat est le même, la présence d'une Htt avec un large domaine PolyQ entraîne une toxicité, mais ce phénotype est diminué avec la présence d'une Htt sans PolyQ, humaine ou de drosophile. Mugat *et al* observent également ce phénotype lors de l'expression du *dHtt* RNAi, et de manière intéressante que ce phénotype est sauvé avec la coexpression de hHtt sans PolyQ. Ces résultats soulignent ainsi que le ratio Htt et mHtt est crucial dans le phénomène d'agrégation et que la dHtt est capable d'avoir un effet

sur la mHtt humaine. De plus, le dernier résultat montre que la dHtt et la Htt humaine ont des propriétés biologiques communes. Finalement Mugat *et al* observent que l'expression d'un PolyQ seul, de 75Q, entraîne le phénotype de toxicité dans l'œil et de manière intéressante que la coexpression de hHtt sans PolyQ ne diminue pas ce phénotype. Ceci soulignant le fait que l'effet protecteur semble dépendant du contexte du PolyQ, dans notre cas la Htt.

Fort de ces résultats, la même équipe a cherché et trouvé la partie de la hHtt qui présente des homologies avec la dHtt et qui est nécessaire à cet effet protecteur [27]. Cette partie est P42. En effet, Arribat *et al* dans un premier temps effectuent un criblage sur les 553 premiers acides aminés représenté dans la Figure I-27.

Figure I-27 Schéma de la Htt



Segmentation de P42 lors de l'identification de P42

Pour cela, ils ont utilisé des cellules HeLa, transfectées avec une Htt de 171aa contenant un PolyQ de 138Q entraînant l'apparition d'agrégats. Puis, par découpage en 4 de cette région Nter (P1, P2, P3 et P4 sur la figure) et expression partie par partie de la Htt, ils ont finalement observé que seule une séquence de 23 acides aminés, P42, était nécessaire à l'effet antiagrégant. La séquence de P42 présente des homologies de séquences avec la dHtt. Puis de la même façon que ce qu'avait montré Mugat *et al* sur la drosophile, Arribat *et al* observent que l'expression de P42 empêche drastiquement la formation d'agrégats, confirmant ainsi les résultats obtenus dans les cellules HeLa. De plus, de manière intéressante ils montrent l'effet protecteur de P42 sur d'autres phénotypes pathologiques induits dans des drosophiles exprimant une hHtt avec un large domaine PolyQ, notamment sur le fonctionnement des axones. En effet, des études ont montré que la présence de mHtt entraînait des déficits dans le transport de vésicules le long des axones [157]. Arribat *et al* observent

ainsi le transport de vésicules contenant le NPY marqué à la GFP dans plusieurs conditions. En présence d'une Htt de 548aa avec un domaine PolyQ de 128Q, il est noté une diminution de la vitesse de déplacement, du nombre de vésicules, et une augmentation du temps passé par les vésicules dans un état statique. En revanche lors de la coexpression de cette mHtt et de P42 il y a un sauvetage partiel de ces phénotypes. Arribat *et al* ont également observé de la même façon que P42 empêche la présence d'amas de vésicules le long de l'axone. De plus, la locomotion de la larve et la viabilité moyenne des adultes semblent également augmenter en présence de P42, dans des drosophiles exprimant une mHtt. En revanche dans cette même étude Arribat *et al* n'observent pas d'effet de P42 sur les phénotypes pathologiques induits dans le cadre d'autres maladies à PolyQ, confirmant ainsi ce qui avait été montré par Mugat *et al*, que l'action de la Htt, en l'occurrence P42 est dépendante du contexte protéique du PolyQ, et est propre à la MH.

Ces résultats ont permis de penser que P42 était non seulement capable d'empêcher la formation d'agrégats induits par la présence de mHtt mais également que P42 avait un effet positif sur plusieurs phénotypes pathologiques induits en condition de MH.

Suite aux résultats obtenus sur P42 dans les cellules et les drosophiles, l'équipe de Florence Maschat a développé l'idée d'utiliser P42 en tant qu'agent thérapeutique. Pour cela ils ont optimisé P42 pour traiter un modèle de souris développant la MH, le modèle R6/2. Dans ce chapitre nous allons présenter les résultats de ce traitement.

1.3.2. Le modèle : Souris R6/2

Les souris R6/2 font partie des nombreux modèles souris de MH, passés en revue par Pouladi *et al* [158]. On peut classer ces modèles en trois catégories. Les souris « N-ter » transgéniques, exprimant une partie N-ter plus ou moins longue de la Ht avec ou sans un domaine PolyQ pathologique et sous le contrôle de différents promoteurs. Les souris « *Full Length* » transgéniques, exprimant la Htt entière avec ou sans un domaine PolyQ pathologique. Les souris KI dans lesquelles est inséré dans le gène *HTT* endogène une séquence plus ou moins longue de CAG, entraînant l'expression physiologique d'une Htt endogène avec un domaine PolyQ pathologique.

En fonction de la question posée on va juger un modèle plus ou moins opportun. Lors du choix d'un modèle deux critères sont pris en compte. La validité de structure et la validité apparente. La validité de structure est un critère qui dépend de la taille de la Htt exprimée, du taux d'expression, mais également de l'espèce dont est tirée la séquence et dans laquelle elle est exprimée. La validité apparente représente la capacité du modèle à développer les symptômes proches de ce que l'on observe chez l'Homme. Dans le cadre d'une étude sur la

MH, maladie progressive, il est important d'avoir la même variété de symptômes que ceux observés chez l'Homme mais également de prendre en compte l'évolution et la période d'apparition des symptômes au cours du temps. Dans notre cas où on voulait observer l'effet thérapeutique de P42, qui au vu des résultats passe potentiellement par une action sur le fragment N-ter contenant un domaine PolyQ élevé, le modèle de souris R6/2 semblait le plus opportun. En effet, ce modèle de souris développe des phénotypes pathologiques proches des symptômes observables chez l'Homme. Dans ce modèle, les phénotypes sont induits par l'expression de l'exon 1 humain avec environ 120 répétitions de CAG.

Les souris R6/2 développent la MH de manière drastique [8]. Créés par une équipe dirigée par Gilian P. Bates[8] quelques années après la découverte du gène *HTT*, ces souris ont été l'un des premiers modèles de la MH. Ces souris transgéniques expriment la partie N-ter de la Htt humaine, les 67 premiers acides aminés, avec une importante répétition de glutamine dans le PolyQ, de 120 à 145. Ce transgène sous le contrôle du promoteur de Htt humaine a un taux d'expression d'environ 75% par rapport à la Htt endogène. Ce modèle présente quelques défauts notamment du fait qu'il ne présente pas de neurodégénérescence à proprement parlé. En effet, pas de diminution drastique du nombre de neurone n'est observée [159]. Ceci peut être potentiellement dû au fait que la mort neuronale n'est qu'une conséquence du dysfonctionnement des neurones et que la mort des souris arrive de manière trop précoce, vers la 13^{ème} semaine, pour observer une neurodégénérescence significative. Malgré ces défauts, la souris R6/2 est un des modèles le plus utilisé notamment parce que les souris présentent un large panel de symptômes et que leur évolution, bien que fulgurante, et assez représentative de ce que l'on observe chez l'Homme. En effet, d'un point de vue comportemental, ces souris vont développer des troubles moteurs et cognitifs à partir de la 3^{ème} semaine. Ainsi, Li *et al* [159] observent autour de la 3^{ème} semaine une hyperactivité qui se mue ensuite en hypoactivité vers la 8^{ème} semaine mais aussi des troubles de la coordination motrice notamment observés par le temps passé sur une roue en rotation, le Rotarod, avant de tomber. Egalement, régulièrement utilisé comme un marqueur de la maladie, le réflexe de clasping présent chez ces souris, qui correspond au fait qu'une souris R6/2 suspendue par la queue se recroquevillera sur elle-même au lieu de tendre ces membres comme le ferait une souris sauvage. Une perte de poids et une atrophie musculaire importante sont également notables. Des crises d'épilepsie sont également notées [159]. D'un point de vue cognitif, des troubles de la mémoire sont observables [8]. Geralt *et al* [160] montrent également que les R6/2 ont des problèmes d'anxiété. La mort intervient entre la 13^{ème} et la 14^{ème} semaine. Malgré le nombre d'études sur les R6/2 peu portent sur les raisons du décès, et celles-ci ne semblent pas être clairement identifiées. Plusieurs hypothèses ont néanmoins été avancées,

notamment sur les problèmes de nutrition, et sur les crises d'épilepsie qui pourraient s'avérer fatales [159].

D'un point de vue histologique, le cerveau des R6/2 présente de nombreux phénotypes pathologiques. Ainsi, on observe à la 12^{ème} semaine une diminution de la masse d'environ 20% par rapport aux souris sauvages du même âge [159]. La taille des ventricules est également plus importante [160]. Néanmoins, pas de diminution flagrante du nombre de neurones ; cette diminution de la masse du cerveau et cette augmentation de la taille des ventricules serait plutôt dû à une atrophie individuelle des neurones [161].

D'un point de vue cellulaire de nombreuses fonctions sont affectées, comme la transmission synaptique [133] mais également de nombreux taux de protéines, comme celui du BDNF et de son récepteur TrkB, sont impactés dans ce modèle [162].

Tous ces effets font des souris R6/2 un modèle idéal pour l'étude de P42.

1.3.3. P42TAT et la technologie Aonys®

P42 est un peptide avec une séquence de 23 acides aminés, et de ce fait son utilisation a des avantages et des inconvénients. Le principal avantage est que lors de sa dégradation dans un organisme un peptide est transformé en acides aminés et sera potentiellement peu toxique. En revanche, de par sa nature peptidique, P42 va avoir des problèmes pour diffuser dans l'organisme et passer les membranes cellulaires et en particulier la barrière hémato-encéphalique, ce qui sera nécessaire dans le cadre de la MH. De plus, un peptide a une durée de vie relativement faible dans l'organisme et est dégradé assez rapidement. Mais ces inconvénients peuvent être outrepassés. Afin de stabiliser P42 et d'optimiser sa diffusion dans l'organisme, plusieurs méthodes ont été utilisées. Tout d'abord P42 a été conjugué à TAT, un CPP (*Cell Penetrating Peptide*). La région de TAT utilisée correspond à un peptide de 11aa dont la séquence est directement issue du VIH. Plusieurs études ont montré l'efficacité de l'utilisation de TAT [163]. Ce CPP facilite le passage de P42 dans le cytoplasme et dans le noyau. Afin de vérifier que la conjugaison avec TAT n'affectait pas l'efficacité de P42, le produit de conjugaison a été testé sur des cellules HeLa. Arribat *et al* indiquent que P42TAT appliqué de manière exogène est retrouvé dans les cellules et permet de diminuer le phénomène d'agrégation lorsque ces cellules sont transfectées avec une mHtt [28]. De plus, P42TAT a été placé dans des microémulsions eau-dans-huile développées par Medesis Pharma sous le nom de Aonys®. Aonys® [164] permet de passer les muqueuses, tout en protégeant le peptide de la dégradation. Arribat *et al* ont dans un premier temps mesuré la capacité de ce composé P42TAT dans Aonys® abrégé : P42T va se retrouver dans le cerveau suite à une administration buccale. Les résultats montrent que l'administration buccale de

P42T, en prenant en compte la diffusion dans tout l'organisme, est aussi efficace que l'administration locale dans le cerveau par une injection intra-cerebro-ventriculaire (ICV). De plus, des études histologiques montrent plus précisément que le peptide est bien capable de rentrer dans les neurones du striatum, et dans les différents compartiments cellulaires.

1.3.4. Effet d'un traitement en pré-symptomatique

Après avoir identifié que le mode de distribution permettait de retrouver P42 dans le cerveau et plus précisément dans les neurones, Arribat *et al* (2014) ont analysé l'effet qu'avait le traitement P42T sur les souris R6/2. Pour cela, ils ont traité des souris R6/2 soit avec un placebo (Aonys[®] vide) (R6/2 NT), soit avec P42T (R6/2 P42T) et des souris sauvages soit avec P42T (Wt P42T) soit avec un placebo (Wt NT). L'administration de P42T est effectuée à raison de 600µg/ml/kg par injection par voie buccale et rectale, quotidiennement, 5 jours par semaine. Les traitements ont commencé à partir de la deuxième semaine après la naissance des souris jusqu'à leur sacrifice à la semaine 11. Le traitement a donc démarré à un moment où les souris R6/2 n'ont pas encore développé de symptômes visibles, dans une phase pré-symptomatique.

Plusieurs paramètres ont été suivis. Arribat *et al* observent, à l'aide d'un rotarod, que le transgène porté par leurs souris R6/2 NT va drastiquement affecter la coordination motrice. A la semaine 6 le score des souris R6/2 NT est très en-dessous du score des Wt. En revanche, toujours à la semaine 6 les souris R6/2 P42T obtiennent les mêmes scores que les souris Wt mais leurs scores diminuent par la suite. Le score de rotarod des R6/2 P42T à la semaine 9 est équivalent au score des R6/2 NT à la semaine 6. Le traitement par P42T a eu un effet protecteur et a permis de retarder l'apparition des troubles de la coordination motrice. De plus, les souris R6/2 NT sont sujettes de manière importante au claspings, ce qui n'est pas le cas des R6/2 P42T. Egalement, il est noté qu'entre la semaine 8 et 11, une importante perte de poids des souris R6/2 NT est observée, alors que les R6/2 P42T ont une augmentation. Pour ce qui est des paramètres histologiques, Arribat *et al* observent une importante augmentation de la taille des ventricules chez les souris R6/2 NT âgées de 11 semaines, alors que les souris R6/2 P42T du même âge ont des tailles de ventricules proches de celles observées chez les souris Wt. En ce qui concerne les agrégats, il est noté une baisse significative du nombre d'agrégats dans le cortex et dans le striatum dans les souris R6/2 P42T par rapport aux souris R6/2 NT. Toutes ces observations ont permis de conclure que le traitement par P42 avait un effet positif sur de nombreux phénotypes pathologiques induits dans la MH. En revanche, son mécanisme d'action reste encore à déterminer.

En conclusion la découverte du peptide P42 par l'équipe de Florence Maschat au cours de ces premières études montrent que ce peptide qui est contenu dans la séquence de la Htt a un rôle très important pour corriger des défauts déjà décrits dans la MH que ce soit chez la drosophile, les cellules humaines en culture ou même dans le modèle murin R6/2. Il empêche la formation d'agrégats, il corrige la dégénérescence dans l'œil, il permet de récupérer de la coordination motrice, et du poids et de nombreux autres phénotypes pathologiques induits dans la MH. Cette région de la Htt semble donc très importante pour agir sur la maladie. Il s'agit maintenant de comprendre son mécanisme d'action et de comprendre quelles sont les voies biologiques touchées par son action afin de corriger ces symptômes. Ma thèse sera donc un travail qui tentera de répondre à cette question.

Chapitre II. Résultats

Les travaux de ma thèse s'articulent autour de deux axes principaux : la compréhension des mécanismes d'action de P42 et le développement et l'optimisation de son effet thérapeutique.

Le premier axe est sous divisé en deux parties. La première partie, correspond à l'étude de l'effet de P42 sur la voie de signalisation BDNF/TrkB sur des souris R6/2. Nous observons que P42 en condition mutante de MH semble agir à différents niveaux de la liaison corticostriatale, à la fois sur le BDNF et sur TrkB que ce soit au niveau transcriptomique ou protéique. Les conséquences de cet effet se reflètent sur des phénotypes affectés dans la MH et connus pour être dépendants de la voie de signalisation BDNF/TrkB. Notamment nous observons un effet protecteur de P42 sur les souris R6/2 sur des phénotypes comportementaux, comme la mémoire et l'anxiété et également sur des mécanismes cellulaires comme la plasticité synaptique. La deuxième partie correspond à l'étude de l'effet de P42 sur le transport de l'homologue du BDNF chez la drosophile : DNT1. En condition pathologique induite par l'expression d'un fragment de mHtt, nous observons une augmentation du nombre de vésicules immobiles au détriment des déplacements antérogrades et rétrogrades. Avec la coexpression de mHtt et de P42, nous avons un sauvetage partiel du nombre de vésicules immobiles et de vésicules se déplaçant de manière antérograde. De plus, la coexpression de P42 avec la mHtt permet aussi de restaurer en partie les vitesses de déplacement des vésicules.

Ensemble ces résultats montrent que P42 est capable d'agir à la fois sur la production de BDNF et de TrkB mais aussi sur le transport de DNT1, l'homologue du BDNF chez la drosophile. Une partie de ces travaux a été publié dans *Human Molecular Genetics* [165] dont une copie de l'article est disponible à la fin de ce manuscrit.

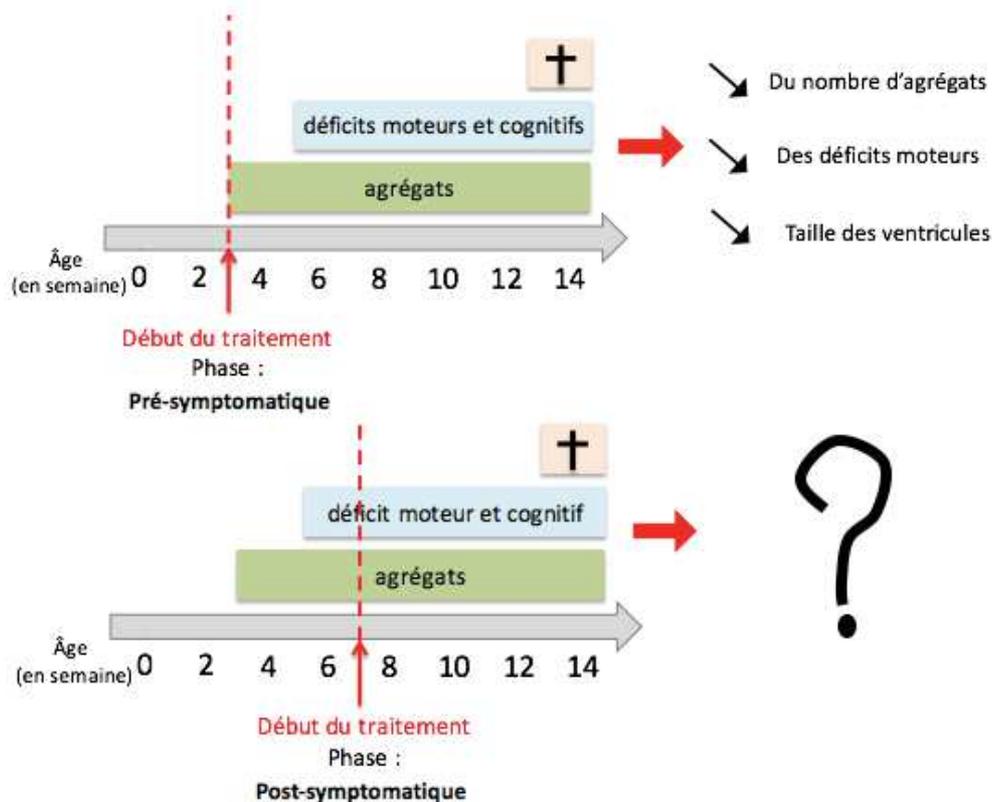
Le deuxième axe est aussi divisé en deux parties. La première partie correspond à l'utilisation d'un test multi-comportemental longitudinal : Le Hamlet test[®]. Le Hamlet permet de suivre, quotidiennement, sur plusieurs semaines l'évolution de la MH et l'effet du traitement par P42. La seconde partie correspond à l'étude de l'effet d'une bithérapie P42/P3. P3 est un peptide développé par un de nos collaborateurs : Edwin Ho Chang (Université de Hong Kong). P3 est capable d'agir sur l'effet toxique induit par l'ARN polyQ. Une bithérapie P42/P3 permettrait donc d'agir au niveau protéique mais également au niveau transcriptomique. L'ensemble des résultats sur P3 et de son impact sur l'effet bénéfique qu'il

apporte dans une bithérapie a été peu convaincant. Néanmoins des résultats obtenus *in cellulo* en imagerie calcique semblent montrer qu'une autre formulation de P3 le rendrait plus actif. Ce deuxième axe a permis à la fois le développement d'un test innovant permettant le suivi longitudinal de l'évolution de la MH et d'un traitement et la potentielle optimisation de l'effet thérapeutique de P42.

Partie 1. Amélioration de la voie du BDNF par P42 dans la maladie de Huntington

Les précédents travaux du laboratoire [28] ont montré que P42T a un effet lorsqu'il est appliqué de manière pré-symptomatique sur des souris R6/2 âgées de 2 semaines. Afin d'utiliser P42 à des fins thérapeutiques, il était important d'analyser quels pourraient être les effets de P42-TAT (P42T) sur des souris R6/2 une fois les premiers symptômes apparus : en phase post-symptomatique (Figure II-1).

Figure II-1 Traitement pré-symptomatique et post-symptomatique

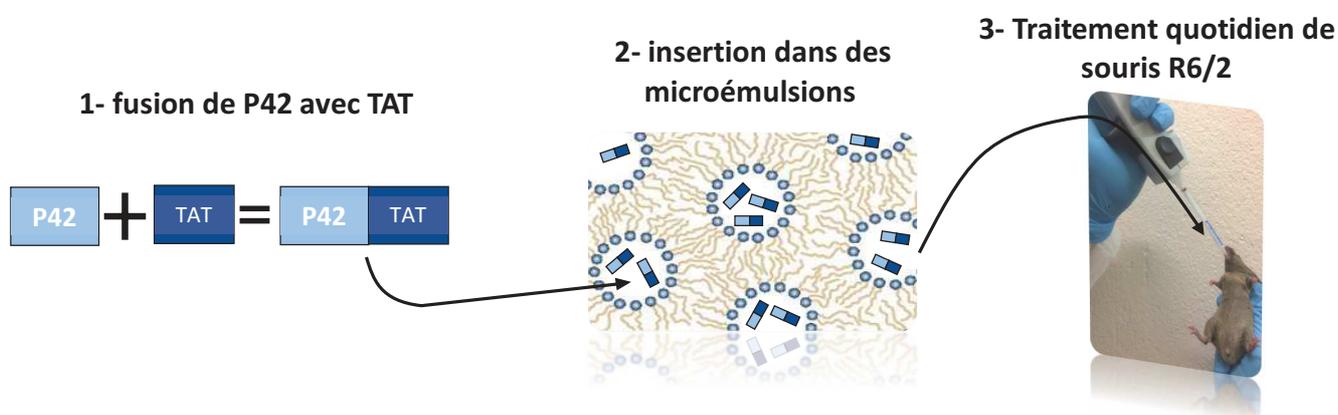


Cette figure représente la chronologie des symptômes et le début d'un traitement pré et post-symptomatique. Les effets d'un traitement pré-symptomatique sur le nombre d'agrégats, les déficits moteurs et la taille des ventricules ont déjà été analysés [28]. Les effets d'un traitement post-symptomatique sont à déterminer.

II.1.1. Effet d'un traitement post-symptomatique

Pour cela, nous avons étudié une cohorte composée de souris R6/2 et sauvages (Wt) que nous avons traité à partir de la 7^{ème} semaine. Les souris sont référencées de la manière suivante : R6/2 P42T pour les souris R6/2 traitées avec des microémulsions contenant P42T et R6/2 NT pour les souris R6/2 traitées par des microémulsions vides. Plusieurs phénotypes ont été étudiés (Figure II-2)

Figure II-2 P42T



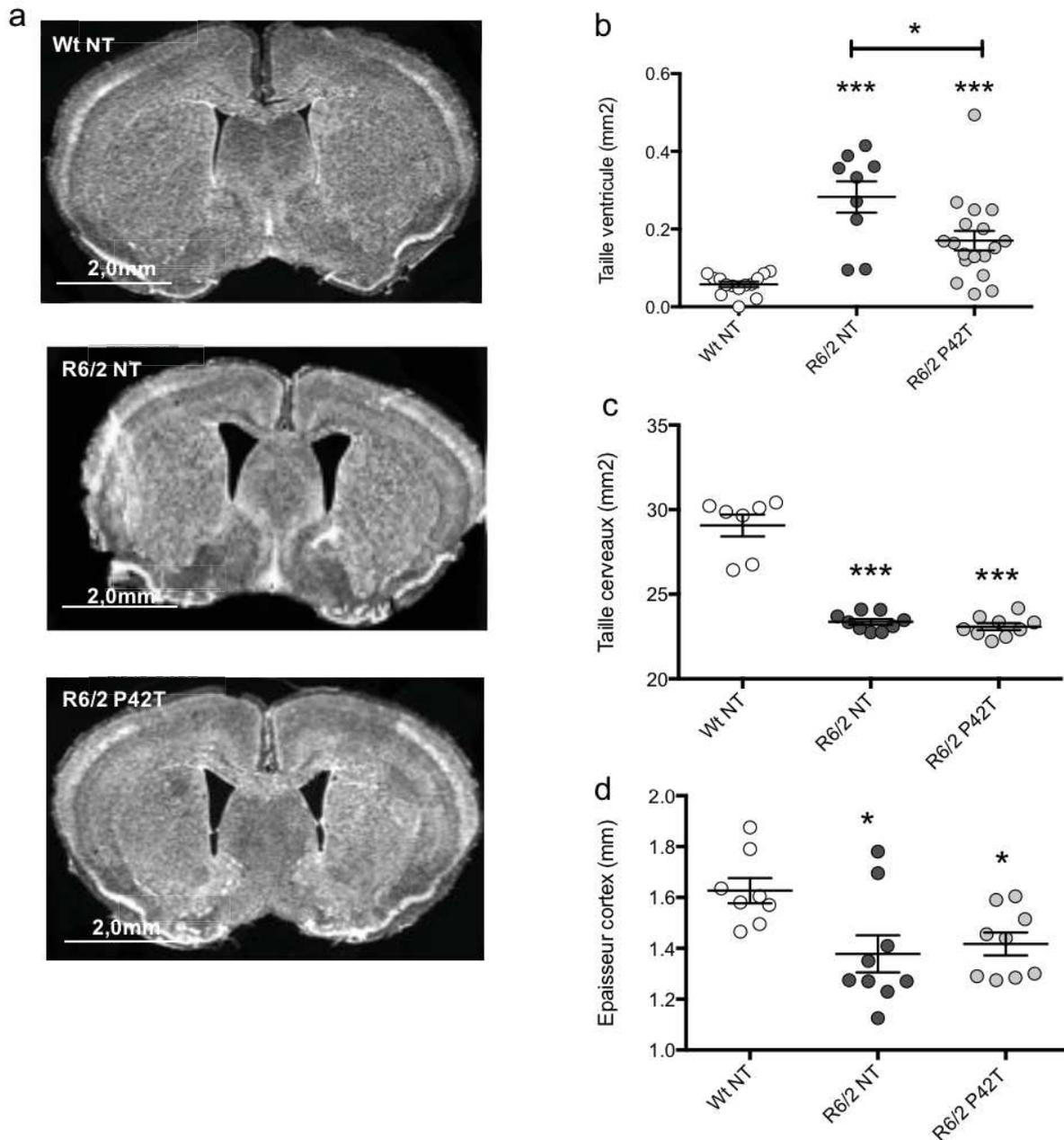
Le traitement par P42 constitue en l'administration quotidienne par les muqueuses buccales et rectales de microémulsions (Aonys[®]) contenant P42 conjugué avec TAT.

II.1.1.1. Taille des ventricules

Un des phénotypes les plus marquants dans la MH est l'augmentation du volume des ventricules induite par une diminution en particulier du volume du striatum [135]. Un phénotype observable chez des patients ou dans des modèles murins de MH et notamment dans les souris R6/2 [159].

Dans notre cas, les souris sauvages présentent des ventricules d'environ 0,06mm² alors que les souris R6/2 NT présentent des ventricules significativement plus grands, d'environ 0,26mm². En revanche, les souris R6/2 P42T en post-symptomatique ont des ventricules d'environ 0,18mm² significativement plus petits que les ventricules des souris R6/2 NT mais également plus grands que ceux des souris Wt NT Figure II-3.

Figure II-3 Etudes histologiques



Analyse de la taille du ventricule : des coupes de cerveau des Wt et R6 /2NT ou R6/2P42T ont été colorées avec du DAPI. a-Des tranches correspondant à 0,6 ou 0,8 mm du Bregma ont été sélectionnées avec le scanner à tranches Nanozoomer Hamatsu et la taille des ventricules, du cerveau ainsi que l'épaisseur du cortex a été mesurée. L'analyse statistique a été réalisée avec le test de Mann-Whitney. b-La taille des ventricules varie dans les différentes conditions (mm²): WtNTvsR6/2NT, $p^{***} < 0.001$; R6/2NTvsR6/2P42T, $p^* < 0.05$; WtvsR6/2P42T, $p^{***} < 0.001$. c-Analyse de la taille du cerveau (mm²). WtNTvsR6/2NT, $p^{***} < 0.001$; R6/2NTvsR6/2P42T, $p=0.1341$; WtvsR6/2P42T, $p^{***} < 0.001$. d-Analyse de l'épaisseur du cortex WtNTvsR6/2NT, $p^{***} < 0.001$; R6/2NTvsR6/2P42T, $p > 0.05$; WtvsR6/2P42T, $p^* < 0.05$

Le traitement par P42T en post-symptomatique permet un sauvetage partiel de la taille des ventricules, ce que l'on retrouve avec un traitement en pré-symptomatique [28].

Egalement, la taille totale du cerveau et l'épaisseur du cortex ont été mesurés. La taille du cerveau et l'épaisseur du cortex des Wt NT est respectivement d'environ 29,06mm² et 1,63mm, et sont significativement plus grandes que chez les souris R6/2 NT : 23,4mm² pour la taille du cerveau et 1,28mm pour l'épaisseur du cortex. Pour les souris R6/2 P42T avec 23,09mm² et 1,42mm, nous avons des mesures statistiquement différentes de celles obtenues chez les Wt NT mais similaires aux mesures obtenues chez les R6/2 NT (Figure II-3a, c et d).

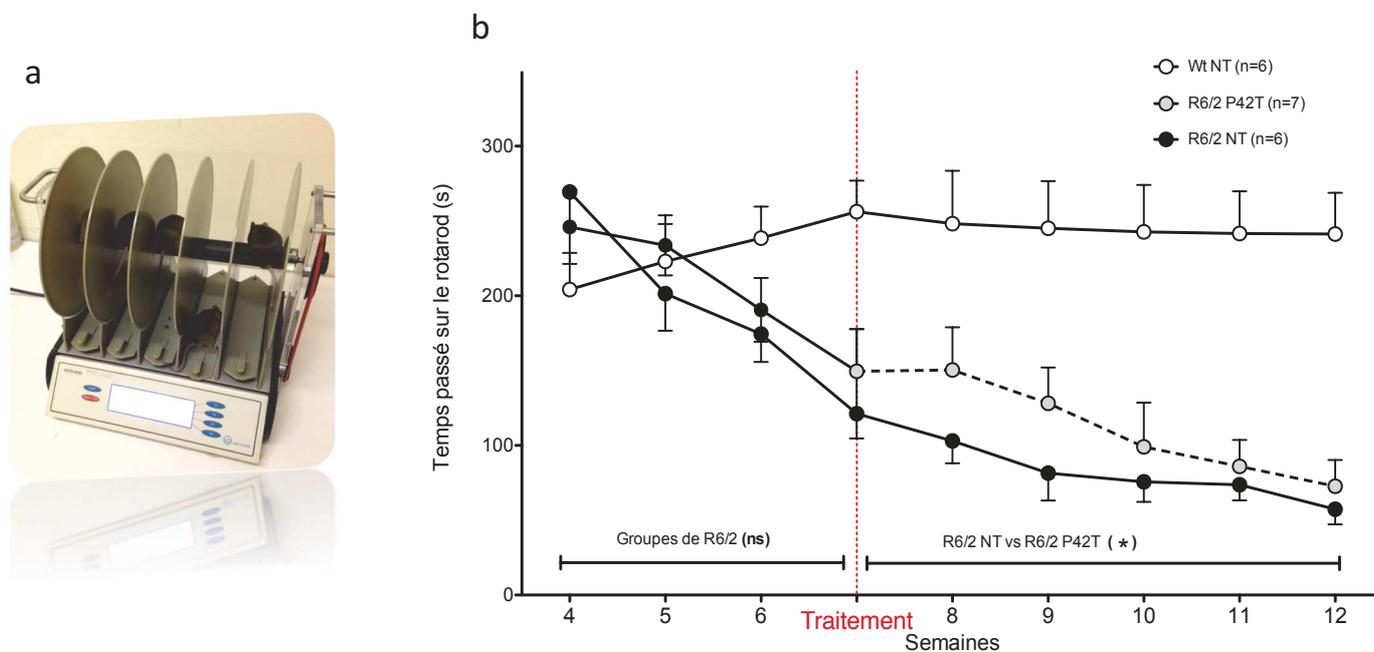
Pour ces deux paramètres, il n'y a pas d'effet significatif ce qui tend à montrer que l'effet positif de P42T semble avant tout jouer sur le striatum plus que sur le cortex.

II.1.1.2. Coordination motrice

Un autre phénotype pathologiquement couramment observé dans la MH, que ce soit chez l'homme ou sur des modèles de MH, est la coordination motrice qui dépend du bon fonctionnement des ganglions de la base.

Chez la souris, le Rotarod (Figure II-4) permet de suivre l'évolution de la coordination motrice au cours des semaines.

Figure II-4 Rotarod : coordination motrice



a-Photo du Rotarod b-Les performances motrices ont été analysées sur des WtNT et R6/2NT ou R6/2P42T. Avant le traitement, les souris R6/2 présentent toutes des performances similaires, two-Way ANOVA, $p=0,56$. Après le traitement un effet significatif du traitement par P42T est détecté avec le temps chez les souris R6/2, two-way ANOVA $p^*= 0.0308$.

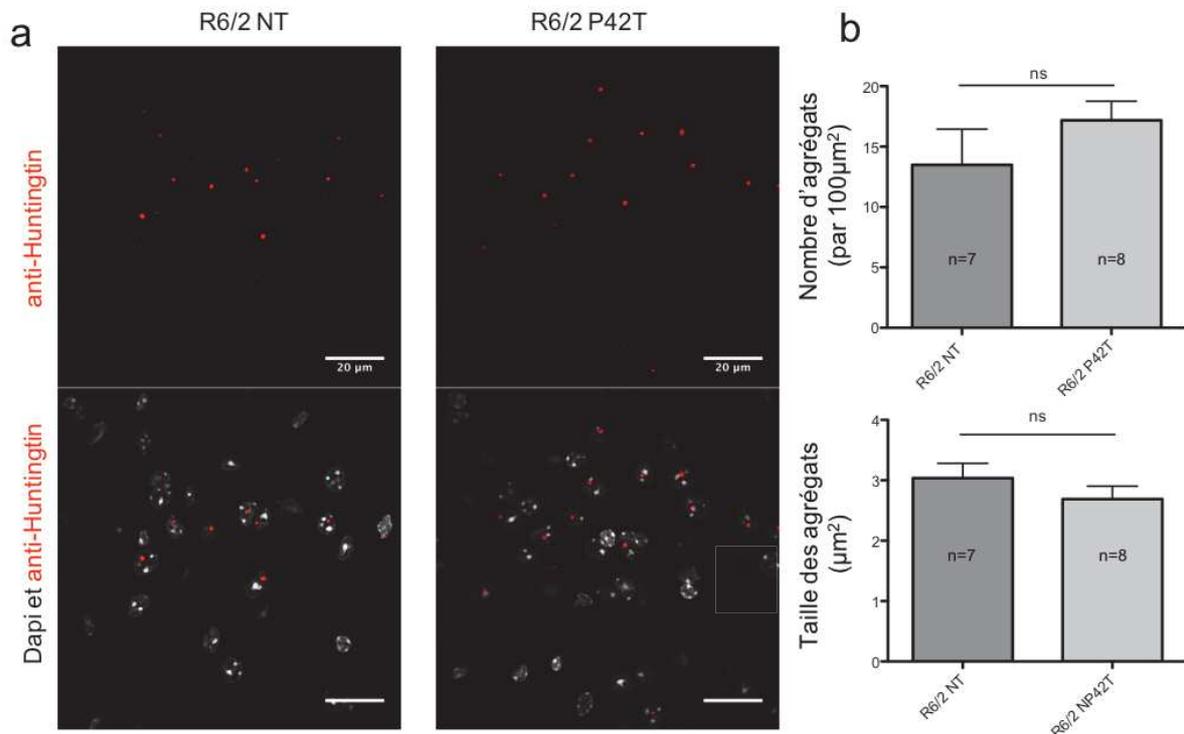
En effet, plus le déficit de coordination motrice va progresser moins longtemps la souris restera sur le Rotarod. C'est ce que l'on observe avec nos souris R6/2 NT qui ont dès la 6^{ème} semaine des scores de rotarod inférieurs aux Wt avec un score de 175 pour les R6/2 NT contre 238 pour les Wt NT. Au cours des semaines, le déficit augmente jusqu'à atteindre à la 12^{ème} semaine un score de 57, alors que le score des Wt ne varie pas et reste à 241 (Figure II-4). Le traitement post-symptomatique par P42T intervient à la 7^{ème} semaine, après l'apparition du déficit de la coordination motrice. Alors qu'avant le début du traitement aucune différence n'est notée entre les deux groupes de souris R6/2 (qui seront ensuite traitées ou non par P42T), une différence se met en place dès le début du traitement et ce de manière statistiquement significative. Notamment à la 8^{ème} semaine où le score des souris R6/2 NT est de 121 contre 150 pour les souris R6/2 P42T.

Comme avec un traitement pré-symptomatique [28], P42T semble pouvoir ralentir le déficit de coordination motrice induit dans les souris R6/2 même après l'apparition des premiers symptômes, corrélant ainsi l'effet positif de P42T observé sur la taille des ventricules.

II.1.1.3. Agrégats

Le nombre et la taille d'agrégats formés par la mHtt est un biomarqueur très utilisé dans le cadre du suivi de l'évolution de la MH [51]. Dans notre cas, nous observons dans le striatum que le nombre d'agrégats est de 13,50 agrégats/ μm^2 pour les R6/2 NT et de 17,18 agrégats/ μm^2 pour les R6/2 P42T, et donc ne varie pas de manière significative (Figure II-5). La taille des agrégats ne varie pas non plus avec 2,80 μm^2 pour les R6/2 NT, et 2,69 μm^2 pour les R6/2 P42T (Figure II-5).

Figure II-5 Nombre et taille des agrégats de mHtt



Analyse des agrégats dans le striatum. a- Les agrégats ont été détectés avec des anti-HTT sur des coupes de cerveau de souris R6/2 âgées de 13 semaines, traitées par placebo (NT) ou avec P42T comme indiqué. b- Les données représentent le nombre des agrégats pour 100µm² (haut) et la taille moyenne des agrégats en µm² (bas). L'analyse a été réalisé avec un test Mann-Whitney. Nombre d'agrégats, R6/2NTvsR6/2P42T, $p=0,098$. Taille des agrégats, R6/2NTvsR6/2P42T, $p=0,145$.

Il n'y a donc pas d'effet sur les agrégats de P42T appliqué en post-symptomatique, c'est à dire après leur apparition. En revanche les précédents résultats du laboratoire [28] montraient un effet de P42T lorsque appliqué en pré-symptomatique, avant l'apparition des agrégats.

En effet, Arribat *et al* [28], suggéraient d'ailleurs que P42T aurait un effet inhibiteur de la formation de nouveaux agrégats mais ne pourrait pas défaire des agrégats déjà formés. Cette différence d'effet entre traitements pré et post-symptomatique semble confirmer cette action de P42.

En revanche, dans le même article Arribat *et al* suggèrent également que l'effet positif qu'a P42T sur certains phénotypes pathologiques pourrait passer par une diminution de la forme d'agrégats entraînant une meilleure élimination de mHtt soluble ou oligomérisée. Néanmoins, nos travaux montrent que malgré l'absence d'effet de P42T appliqué en post-

symptomatique sur les agrégats, des effets positifs importants sont tout de même présents sur d'autres phénotypes pathologiques : Taille des ventricules et coordination motrice.

Ces résultats nous permettent donc de penser que P42T a des effets positifs indépendants de l'agrégation de la mHtt. Nous nous sommes donc intéressés à l'effet que pourrait avoir P42T sur un autre élément important dans la MH, la voie de signalisation BDNF/TrkB.

II.1.2. Effet de P42T sur les taux de transcrite et de protéine du BDNF et de TrkB

L'état de la voie de signalisation BDNF/TrkB dans la liaison corticostriatale est un élément clef dans la MH. En effet, la première et principale structure touchée dans la MH est le striatum. Le striatum est une structure qui nécessite mais produit peu de BDNF. C'est à 95% le cortex qui alimente le striatum en BDNF [76], [166]. En condition pathologique de MH il y a à la fois un souci au niveau de la production du BDNF par le cortex [6] mais également au niveau de son transport le long de l'axe corticostriatal [81]. De plus, le récepteur du BDNF : TrkB est également affecté par la MH [77]. Dans cette partie nous allons notamment observer l'effet de P42T sur des souris R6/2 sur les taux de BDNF et TrkB, transcriptomique et protéique, à la fois dans le cortex et le striatum. Les résultats sont présentés en % par rapport aux Wt NT. Les valeurs obtenues dans les deux cohortes de souris, R6/2 traitées en pré-symptomatique (Pre) et post-symptomatique (Post), sont analysées. Les résultats sur les taux dans le cortex et dans le striatum sont présentés respectivement dans la Figure II-6 et la Figure II-7 suivantes sont également récapitulés dans le Tableau 1. Pour la quantification des protéines, des photos des westerns représentatifs des résultats obtenus et des « *stainfree* » permettant la normalisation et la quantification sont également montrées (Figure II-6 ; Figure II-7 e,f,g).

II.1.2.1. Cortex et Striatum

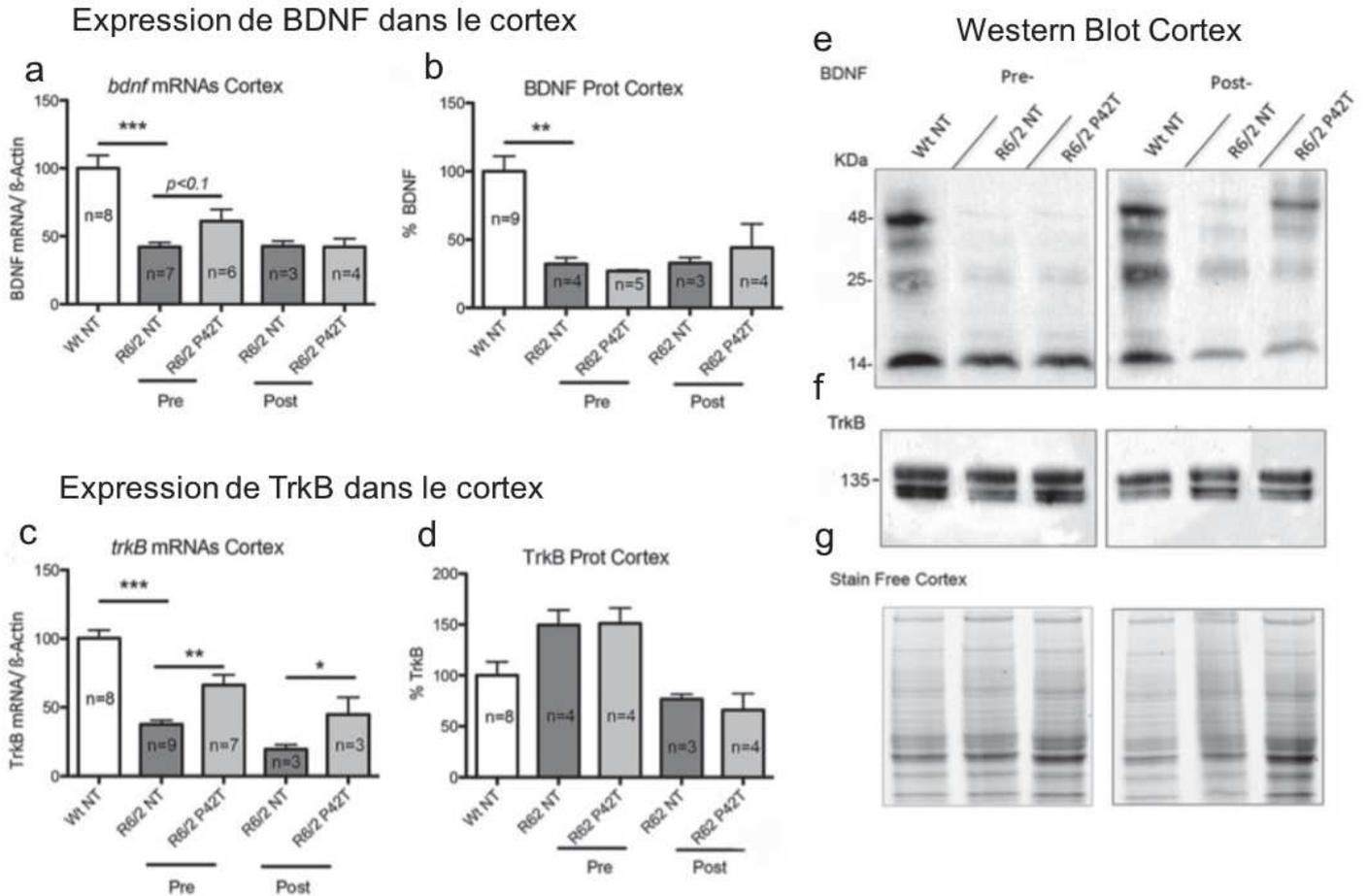
Dans le cortex : Pour le BDNF, le taux d'ARN, dans les deux cohortes, Pre et Post, les souris R6/2 NT présentent des valeurs significativement plus basses que les Wt (100%), respectivement 42,12% et 42,47%. Les souris R6/2 P42T Pre avec un taux de 61,12% tendent à avoir un taux plus important que les souris R6/2 NT Pre. Tandis que les R6/2 P42T Post avec un taux de 42,05% ne présentent pas d'amélioration du taux de transcrits du BDNF (Figure II-6a).

D'un point de vue protéique, tout comme pour les taux de transcrits, dans les deux cohortes, Pre et Post, les souris R6/2 NT présentent des valeurs significativement plus basses que les Wt, avec respectivement 31,77% et 32,90%. En revanche, aucun effet statistiquement notable de P42T n'est observé que ce soit chez les souris R6/2 P42T Pre : 26,98% ou R6/2 P42T Post : 44,14%. (Figure II-6b).

Pour TrkB, dans les deux cohortes, les taux de transcrits sont affectés dans les R6/2 NT, R6/2 NT Pre : 37,53%, R6/2 NT Post : 19,71%. De plus, fait intéressant, dans les deux cohortes également, P42T a un effet positif, R6/2 P42T Pre : 66,16% et R6/2 P42T Post : 44,72%, augmentant ainsi d'environ 30% les taux de transcrits TrkB (Figure II-6c).

D'un point de vue protéique, aucun effet statistiquement significatif n'est induit par la mutation ni par le traitement P42T (Figure II-6d).

Figure II-6 Taux de transcrits et de protéines dans le cortex



Analyse des niveaux d'expression de BDNF et de TrkB. Les taux d'ARNm et de protéines ont été mesurés à partir de cortex disséqués de souris WtNT et R6/2 traitées avec P42 (P42T) ou non (NT). Les traitements étaient pré-symptomatiques (pré) ou post-symptomatiques (post). Des RT-qPCR ont été effectuées sur des ARNm extraits de tissus disséqués. Tous les échantillons ont été normalisés en fonction de la référence (β -actine), et les quantifications ont été effectuées sur des triplicats et exprimées en % par rapport aux souris Wt (100%). Les taux de protéines des mêmes animaux ont été analysés par Western blot. Trois formes majeures du BDNF sont détectées: 48 kDa correspondant au pro-BDNF, 14 kDa correspondant au BDNF mature et 25KDa correspondant à la forme dimère. TrkB présente deux formes autour de 135 kDa. Les niveaux d'expression des protéines ont été quantifiés par rapport aux protéines totales évaluées pour chaque voie par Bio-Rad Stain-Free™ technology pour la normalisation (Données supplémentaires 1). L'analyse statistique a été réalisé avec un test de Kruskal-Wallis et en post Hoc le test de Dunn. a-Niveau d'expression des ARNm *bdnf*. WtNTvs R6/2NT, $p^{***} = 0.0002$; Pré: R6/2NTvsR6/2 P42T, $p = 0.069$. Post: R6/2NTvsR6/2P42T, $p = 0.50$. b-Niveau d'expression des protéines du BDNF WtNTvsR6/2NT, $p^{**} = 0.0056$; Pré: R6/2NTvsR6/2P42T $p = 0.319$. Post: R6/2NTvsR6/2, $p = 0.46$. c- Niveau d'expression des ARNm *trkb*. WtNTvsR6/2NT, $p^{****} < 0.0001$; Pré: R6/2NTvsR6/2P42T, $p^{**} = 0.001$. Post: R6/2NTvsR6/2P42T, $p^* = 0,05$. d-Le niveau d'expression des protéines TrkB. Kruskal-Wallis, $p = 0.055$. e,f,g-Des blots représentatifs pour chaque anticorps (anti-BDNF et anti-TrkB) sont représentés. Les niveaux d'expressions ont été quantifiés par rapport aux protéines totales pour chaque voie, en utilisant la normalisation Stain-free.

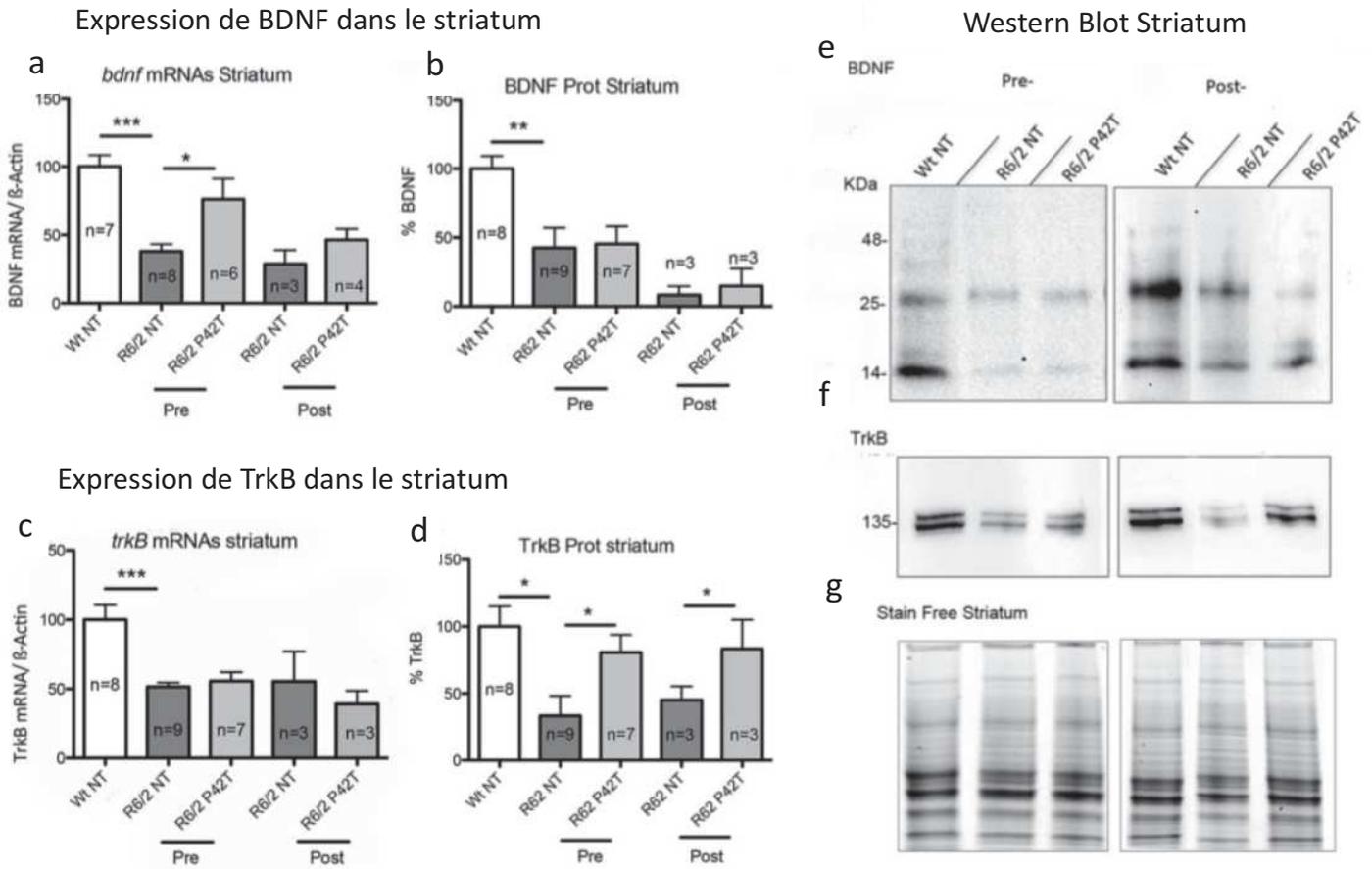
Dans le striatum : Pour le BDNF, d'un point de vue transcriptomique les R6/2 NT des deux cohortes montrent des taux de transcrits diminués (R6/2 NT Pre : 37,92%, R6/2 NT Post : 28,68%). P42T a un effet significatif seulement en pré-symptomatique, R6/2 P42T Pre : 76,02% mais pas en post-symptomatique, R6/2 P42T Post : 46,46% (Figure II-7a).

D'un point de vue protéique, une diminution est notable dans les R6/2 NT des deux cohortes. P42T ne semble avoir aucun effet (Figure II-7b).

Pour TrkB, d'un point de vue transcriptomique, on observe chez les R6/2 NT Pre (51,62%) et Post (55,41%) une diminution. Le traitement par P42T ne semble avoir aucun effet ni en Pre (55,68%) ni en Post (39,17%) (Figure II-7c).

D'un point de vue protéique, il y a une diminution des taux de la protéine TrkB dans les R6/2 NT des deux cohortes : R6/2 NT Pre 33,36%, R6/2 NT Post 45,06%, et de manière intéressante le traitement par P42T que ce soit en Pre ou en Post a un effet significatif positif, avec respectivement des taux augmentant à 80,75% et 83,29% (Figure II-7d)

Figure II-7 Taux de transcrits et de protéines dans le striatum



De la même façon que pour le cortex les taux de protéines et de transcrits du striatum ont été analysés. a- Niveau d'expression des ARNm *bdnf*. WtNTvsR6/2NT, $p^{***} = 0.0002$; Pré: R6/2NTvsR6/2P42T, $p^* = 0.0296$. Post: R6/2NTvsR6/2P42T, $p = 0.1143$. b- Niveau d'expression des protéines du BDNF. WtNT vs R6/2NT, $p^{**} = 0.0081$; Pré: R6/2NTvsR6/2P42T, $p = 0.3651$. Post: R6/2NTvsR6/2P42T, $p = 0.4286$. c- Niveau d'expression des ARNm *trkb*. WtNTvsR6/2NT, $p^{***} < 0.0001$; Pré: R6/2NTvsR6/2P42T, $p = 0.459$. Post: R6/2NT (55.41 \pm 21.61, n = 3) versus R6/2P42T (39.17 \pm 9.49, n = 3): $P = 0.35$ (ns). d- Niveau d'expression des protéines du TrkB. WtNTvsR6/2NT, $p^* = 0.0182$; Pré: R6/2NTvsR6/2P42T, $p^* = 0.0357$. Post: R6/2NTvsR6/2P42T, $p^* = 0.0286$. e, f, g- Des blots représentatifs pour chaque anticorps (anti-BDNF et anti-TrkB) sont représentés. Les niveaux d'expression ont été quantifiés par rapport aux protéines totales pour chaque voie, en utilisant la normalisation Stain-free.

Pour résumer, que ce soit les taux de transcrits ou de protéines, de TrkB ou de BDNF, dans le cortex ou le striatum, ils diminuent dans les souris R6/2 NT, à l'exception du taux de protéines TrkB dans le cortex, comme déjà observé [77]. Ces résultats sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 1 Résumé des observations sur les taux de transcrits et protéines

Cohorte Structure	Post-symptomatique	Pré-symptomatique
Cortex	↑ ARNm <u>TrkB</u>	↑ ARNm <u>TrkB</u> ↑ ARNm BDNF
Striatum	↑ Protéine <u>TrkB</u>	↑ Protéine <u>TrkB</u> ↑ ARNm BDNF

II.1.2.2. Hippocampe

Nous avons également observé les taux de transcrits et de protéines du BDNF et de TrkB dans l'hippocampe (Figure II-8), une structure connue pour être dépendante du BDNF et impactée dans la MH [80].

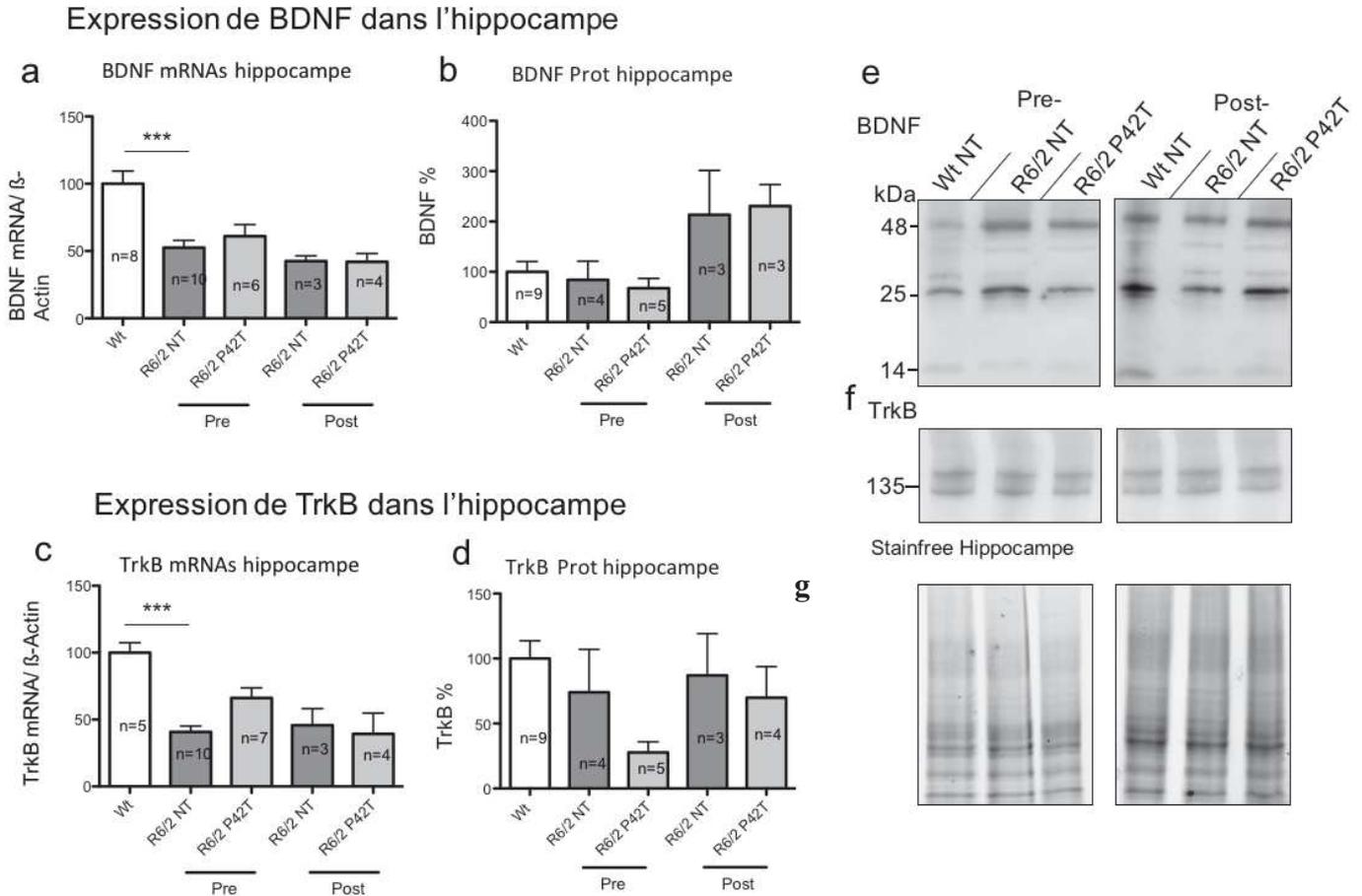
Pour le BDNF, d'un point de vue transcriptomique nous observons une diminution dans les R6/2 NT des deux cohortes : Pre 52,59%, Post 42,57%, et pas de récupération chez les R6/2 P42T : Pre 61,12% et Post 42,05% (Figure II-8a).

D'un point de vue protéique, nous n'observons pas d'effet significatif que ce soit à cause de la mutation ou grâce au traitement (Figure II-8c et e).

Pour TrkB d'un point de vue transcriptomique, pour les deux cohortes nous observons un effet de la mutation avec une diminution du taux : R6/2 NT Pre 40,84% et R6/2 NT Post 45,66% mais là non plus pas de récupération induite par le traitement : R6/2 P42T Pre 66,16% et R6/2 P42T Post 39,35% (Figure II-8b).

D'un point de vue protéique, TrkB ne semble pas être affecté lui non plus ni par la mutation ni par le traitement. En effet, nous retrouvons des taux similaires dans toutes les conditions (Figure II-8d et f).

Figure II-8 Taux de transcrits et de protéines dans l'hippocampe



De la même façon que pour le cortex et le striatum les taux de protéines et de transcrits de l'hippocampe ont été analysés. a-Niveau d'expression des ARNm *bdnf*. WtNTvsR6/2NT, $p^{***} = 0.0089$; b-Niveau d'expression des protéines du BDNF. Kruskal-Wallis, $p = 0.4557$. c- Niveau d'expression des ARNm *trkb*. Kruskal-Wallis, $p = 0.0877$. d-Niveau d'expression des protéines du TrkB. Kruskal-Wallis, $p = 0.06247$. e,f,g- Des blots représentatifs pour chaque anticorps (anti-BDNF et anti-TrkB) sont représentés. Les niveaux d'expressions ont été quantifiés par rapport aux protéines totales pour chaque voie, en utilisant la normalisation Stainfree.

Ces résultats ne permettent pas d'observer d'effet significatif de P42T sur les taux de BDNF et TrkB au niveau de l'hippocampe.

II.1.2.3. Conclusion des résultats sur les taux de transcrits et de protéines.

Les résultats obtenus avec les R6/2 NT correspondent à ceux qui ont été décrits dans la littérature [6], [77]. Plus particulièrement dans les travaux de Ginés et al [77], où l'on retrouve

dans le striatum une baisse de TrkB au niveau protéique et transcriptomique, alors que dans le cortex seulement une baisse du transcrit mais de la protéine sont notées.

De plus, les résultats obtenus avec la cohorte Post montrent des effets de P42T sur le taux de protéine TrkB dans le striatum et le taux de transcrits de TrkB dans le cortex. Tandis que les résultats obtenus avec la cohorte Pre montrent des effets complémentaires sur les taux de transcrits de BDNF dans le striatum et potentiellement dans le cortex, en plus de ceux obtenus dans la cohorte Post sur TrkB.

Ces différences entre les deux cohortes nous laissent envisager deux hypothèses. Premièrement, les différences entre les deux cohortes pourraient éventuellement être dues à des effets de P42T plus précoces que d'autres. En effet, les souris de la cohorte Post ayant été traitées à partir de leur 7^{ème} semaine et sacrifiées pendant leur 13^{ème} semaine ont reçu un traitement qui a commencé 6 semaines avant les analyses post-mortem. Les souris de la cohorte Pre ayant été traitées à partir de leur 2^{ème} semaine et sacrifiées pendant leur 13^{ème} semaine ont reçu un traitement qui a commencé 11 semaines avant les analyses post-mortem. Ceci pourrait expliquer que les effets additionnels observés dans la cohorte Pre (augmentation du BDNF) sont des effets tardifs du traitement qui pourraient être des conséquences des effets sur TrkB (*cf* Tableau 1). Deuxièmement, les effets supplémentaires obtenus dans la cohorte Pre pourrait être due à une diminution de l'agrégation, présente uniquement dans les cohortes traitées en pré-symptomatique, suggérant donc que l'effet observable dans la cohorte post-symptomatique est dû à un effet positif plus direct qui ne passe pas l'inhibition de l'agrégation.

Ainsi on peut penser que l'effet le plus précoce et/ou direct de P42T semble principalement être sur l'augmentation du taux de TrkB soit sur le transcrit dans le cortex, soit sur la protéine dans le striatum. Tandis que l'effet sur les transcrits du BDNF que ce soit dans le cortex ou le striatum semble plus tardif ou indirect.

II.1.3. Effet de P42T sur le comportement

Nous avons ensuite cherché à analyser quelles pouvaient être les conséquences de la restauration de ces taux de transcrits et de protéines. Que ce soit chez l'Homme ou les différents modèles murins de MH, la MH se caractérise par des phénotypes pathologiques comportementaux d'ordre moteurs mais également d'ordres cognitifs et psychiatriques.

Cette partie se concentre en particulier sur les conséquences du traitement par P42T sur différents comportements psychiatriques et cognitifs connus pour dépendre de la voie

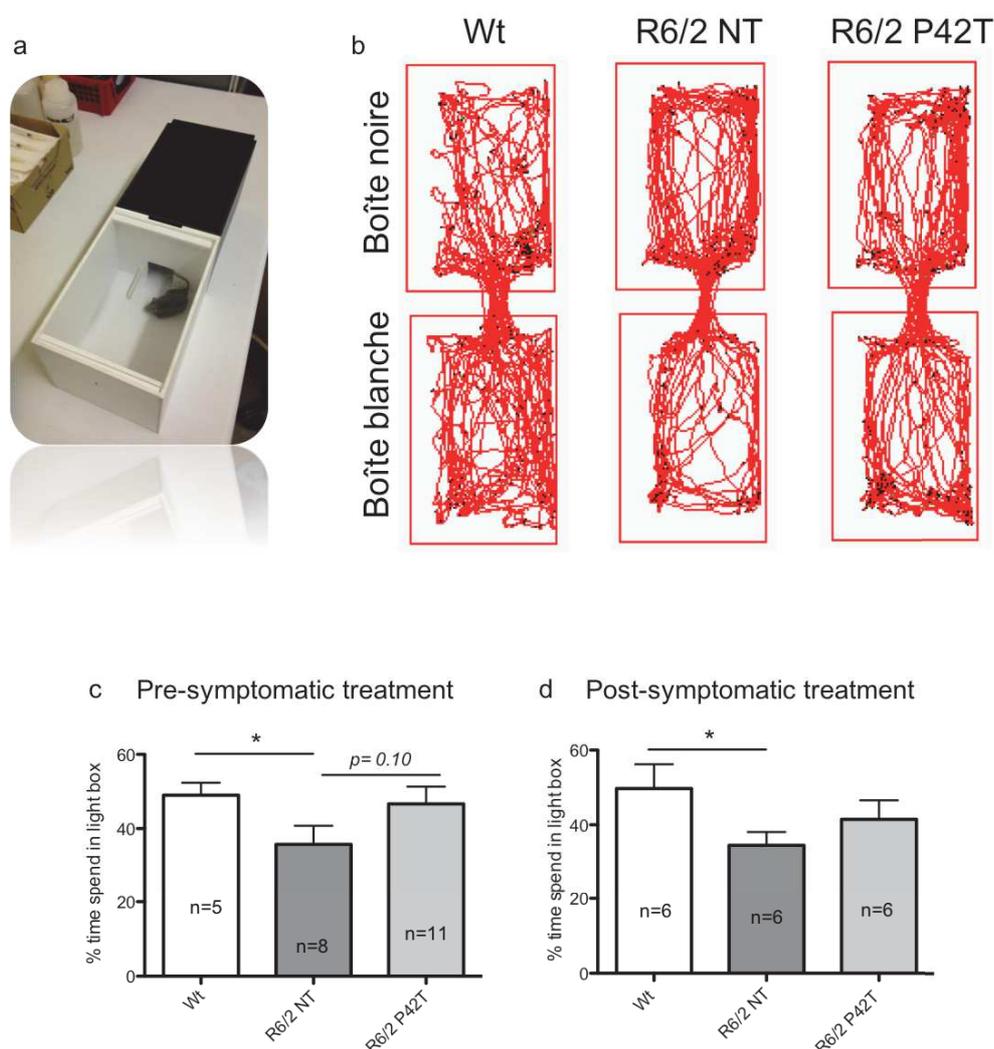
BDNF/TrkB [141] et affectés chez les souris R6/2 [8]. Plus précisément, nous avons analysé l'anxiété et la mémoire.

II.1.3.1. Anxiété

La MH se caractérise par de nombreux phénotypes comportementaux pathologiques, dont des troubles d'ordre psychiatriques que ce soit chez l'Homme [4] ou sur des modèles murins [8]. Notamment des troubles de l'anxiété sont décrits pour être dépendants de la voie BDNF/TrkB [140] et ont été observés dans le modèle R6/2 [8].

Afin de mesurer l'anxiété sur nos différentes cohortes, le test de « boîte noire, boîte blanche » a été utilisé. Ce test est composé d'une boîte noire, sombre, avec une faible intensité lumineuse à l'intérieur et d'une boîte blanche, plus lumineuse. Les deux étant connectées par une petite ouverture (Figure II-9a et b). Le principe de ce test repose sur le fait qu'une souris va préférer rester dans la boîte noire, moins anxiogène que la boîte blanche, mais à des fins exploratoires les souris rentreront quand même dans la boîte blanche. Une souris particulièrement anxieuse passera plus de temps dans la boîte noire et moins dans la boîte blanche qu'une souris sauvage. C'est ce que l'on va mesurer sur nos différentes cohortes âgées de 9 semaines.

Figure II-9 Effet de P42T sur l'anxiété : boîte noire et boîte blanche



Résultats des tests comportementaux avec le test de boîte noire/boîte blanche pour les cohortes PRE et POST. a-Photo du dispositif. b- Traces du déplacement des souris dans le dispositif. c,d-L'indice d'anxiété dans les espaces lumineux correspond au pourcentage de temps passé dans la boîte blanche. Analyses statistiques réalisées avec un test de Mann-Whitney. c- Traitement pré-symptomatique: WtvsR6/2, $p^ < 0.05$. R6/2vsR6/2P42T, $p = 0.10$. Traitement post-symptomatique : WtvsR6/, $p^* < 0.05$. R6/2vsR6/2P42T, $p > 0.10$.*

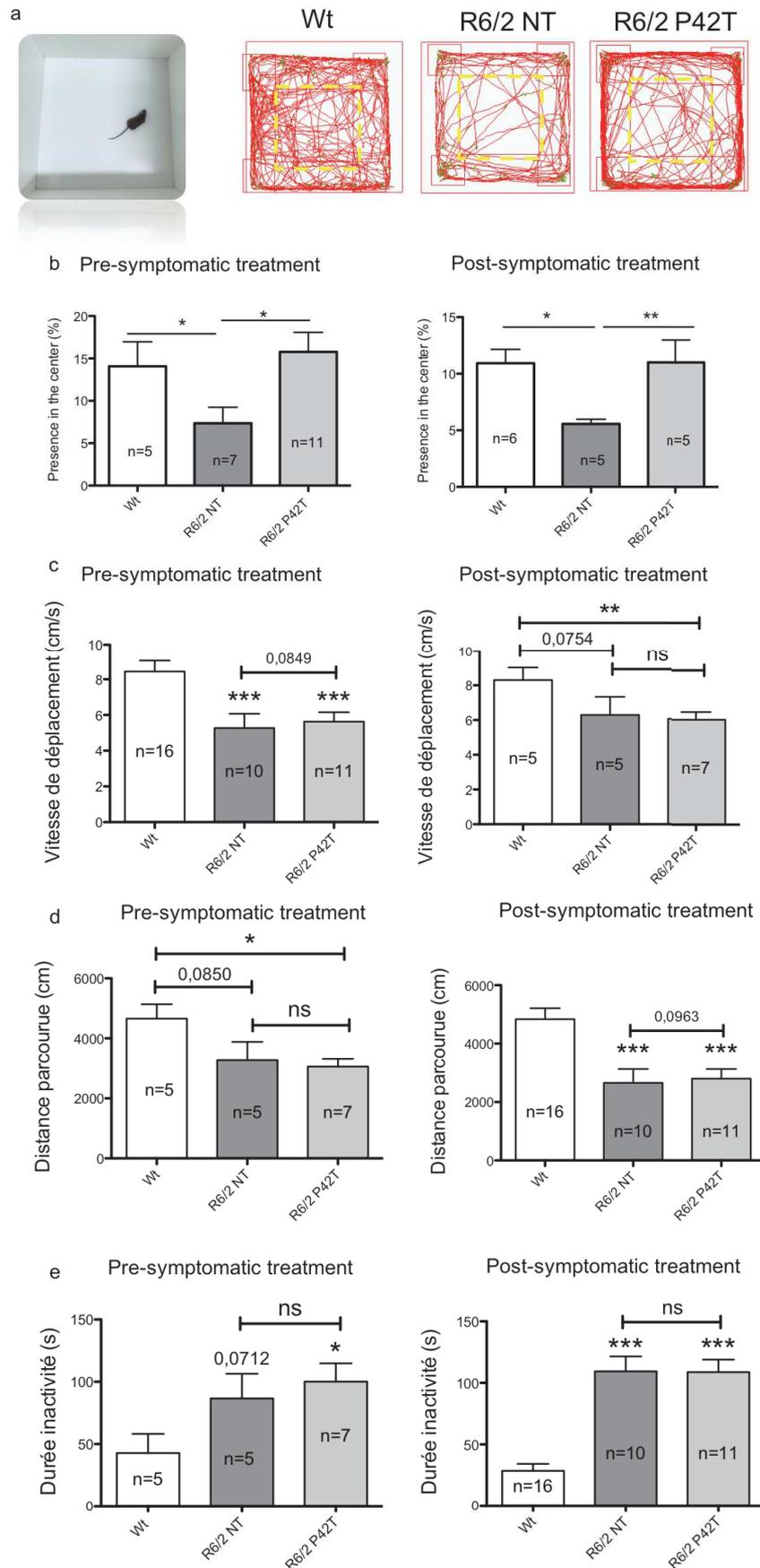
Que ce soit pour la cohorte pré-symptomatique ou post-symptomatique, nous observons que les souris Wt dans nos conditions environnementales vont explorer la boîte blanche pendant 49,0% de leur temps pour les Wt NT Pre et 49,7% de leur temps pour les Wt NT Post. Par contre les souris R6/2 NT, que ce soit les R6/2 NT Pre avec 35,8% ou les R6/2 NT Post avec 34,5% vont de manière significative moins explorer la boîte blanche. Les souris R6/2 P42T Pre (46,7%) ont tendance à aller plus souvent dans la boîte blanche que les R6/2

NT Pre et ne sont plus significativement différentes des Wt NT Pre (Figure II-9b et c). Pour la cohorte Post, nous observons que les R6/2 P42 ont des scores statistiquement similaires à ceux observés chez les Wt NT, en revanche nous ne notons pas non plus de différence entre les R6/2 NT et les R6/2 P42T (Figure II-9d).

Afin de confirmer ou d'infirmer la tendance à l'effet positif de P42T sur l'anxiété induite par la mutation portée par les souris R6/2, nous avons réalisé un autre test.

Nous avons observé la présence au centre d'un champ ouvert lors de son exploration (Figure II-10a) par les souris de nos différentes cohortes à 11 semaines. En effet, lors de l'exploration d'un champ ouvert une souris en condition physiologique va avoir tendance à explorer le centre du champ, plus anxiogène que les bords. En condition pathologique avec une anxiété accrue, une souris passera moins de temps au centre.

Figure II-10 Effet de P42T sur l'anxiété : test en champ ouvert



Résultats des tests comportementaux en champ ouvert pour les cohortes PRE et POST. a- Photo du champ ouvert, et traces des déplacements d'une souris pendant 10min dans ce champs pour les différentes conditions (Wt, souris sauvages traitées avec un placebo ; R6/2 NT, souris R6/2 traitées avec un placebo ; R6/2 P42T, souris R6/2 traitées avec P42TAT). Analyses statistiques réalisées avec un test de Mann-Whitney. b- Temps passé au centre du champ en % de temps par rapport au temps total. PRE : WtvsR6/2, $p^* < 0.05$. R6/2vsR6/2P42T, $p^* < 0.05$. POST : WtvsR6/2, $p^* < 0.05$. R6/2vsR6/2P42T, $p^{***} < 0.01$. c- Vitesse de déplacement des souris en cm/s. PRE : WtvsR6/2NT, $p^{***} = 0,0004$; WtvsR6/2P42T, $p^{****} = 0,0004$; R6/2NTvsR6/2P42T, $p = 0,0846$; POST : WtvsR6/2NT, $p = 0,0754$; WtvsR6/2P42T, $p^{**} = 0,0089$; R6/2NTvsR6/2P42T, $p = 0,5000$. d- Distance parcourue en cm. PRE : WtvsR6/2NT, $p^{***} = 0,0004$; WtvsR6/2P42T, $p^{***} = 0,0001$; R6/2NTvsR6/2P42T, $p = 0,0963$; POST : WtvsR6/2NT, $p = 0,0754$; WtvsR6/2P42T, $p^* = 0,0152$; R6/2NTvsR6/2P42T, $p = 0,500$. e- Temps passé par les souris sans se déplacer. PRE : WtvsR6/2NT, $p^{***} < 0,0001$; WtvsR6/2P42T, $p^{***} < 0,0001$; R6/2NTvsR6/2P42T, $p = 0,4830$; POST : WtvsR6/2NT, $p = 0,0712$; WtvsR6/2P42T, $p^* = 0,0172$; R6/2NTvsR6/2P42T, $p = 0,2652$.

Ce que l'on observe pour la cohorte Pre, c'est premièrement une diminution par deux du temps passé au centre avec les souris R6/2 NT (7,4%) par rapport au Wt NT (14,1%) et deuxièmement une récupération complète de ce phénotype pathologique chez les souris R6/2 P42T (15,8%) (Figure II-10b). Les mêmes résultats sont obtenus sur la cohorte Post. Les souris R6/2 NT (5,6%) vont passer deux fois moins de temps au centre que les souris Wt NT (10,9%). Tandis que les souris R6/2 P42T (11,0%) récupèrent là aussi un % de temps passé au centre équivalent aux souris sauvages.

Afin de s'assurer que l'effet de P42T observé durant ce test passe bien par un effet sur l'anxiété et non à cause d'un déficit de la locomotion spontanée, nous avons également observé des paramètres moteurs. Dans les deux cohortes la vitesse de déplacement est affectée chez les souris R6/2 NT (Pre : 5,28cm/s ; Post : 6,30cm/s) par rapport aux souris Wt NT (Pre : 8,43cm/s ; Post : 8,31cm/s) en revanche le traitement P42T n'a aucun effet sur ce paramètre (R6/2 P42T Pre : 5,63cm/s ; Post 6,08cm/s) (Figure II-10c). La même chose est observée sur la distance totale parcourue pour les deux cohortes. Nous observons chez les souris Wt NT une distance parcourue de 4840cm pour les Pre et 4657cm pour les Post et tout comme les souris R6/2 NT qui parcourent, 2655cm pour les Pre et 3270cm pour les Post, les souris R6/2 P42T avec 2804cm pour les Pre et 3060cm pour les Post parcourue, couvrent aussi une moins grande distance que les Wt NT (Figure II-10d). Nous avons également mesuré la durée d'inactivité de nos souris (Figure II-10e). Les Wt NT, Pre ou Post avec respectivement 28,5s et 42,7s passées immobiles sont deux à trois fois moins immobile que les souris R6/2 NT Pre ou Post avec 82,2s et 86,7s passées immobiles ou les souris R6/2 P42T avec 86,1s pour les Pre et 100,2s pour les Post.

Tous ces résultats nous permettent de conclure que l'effet anxiogène induit par l'expression de la mHtt dans nos R6/2 est renversé par le traitement P42T.

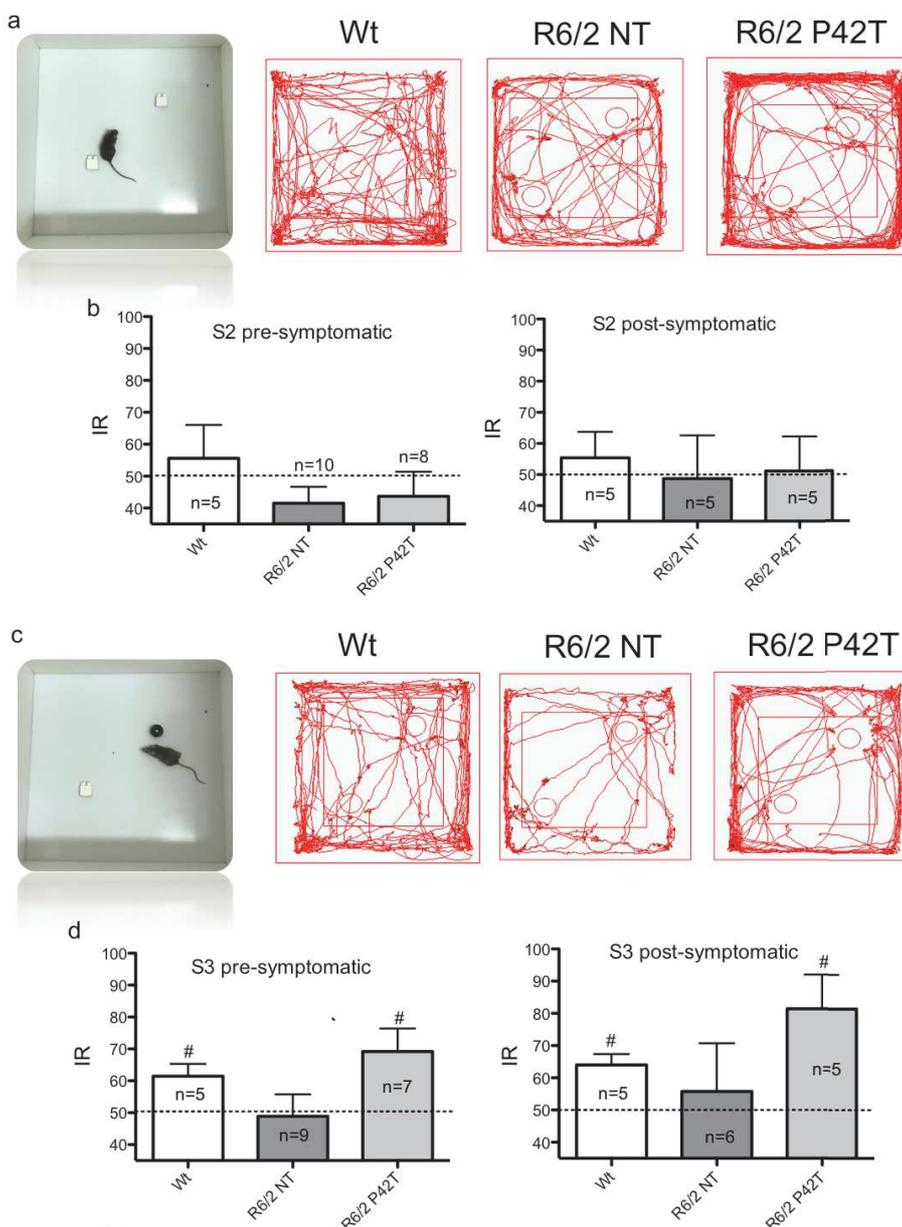
II.1.3.2. Mémoire

Le mémoire, qu'elle soit spatiale ou procédurale, de reconnaissance à court terme ou à long terme, qu'elle dépende de l'hippocampe, du cortex, du striatum ou de l'amygdale est un processus qui est connu pour être dépendant de la voie de signalisation BDNF/TrkB [143] et largement affectée dans la MH [167]. Durant ma thèse, je me suis particulièrement intéressé à la mémoire de reconnaissance et l'effet que pouvait avoir P42T sur cette dernière.

Pour cela le test de reconnaissance d'objet en champ ouvert (ou NOR) a été utilisé. Il consiste en trois phases.

La première phase consiste à habituer la souris à un champ ouvert (Figure II-10a) (étape qui a permis d'analyser en partie l'anxiété et les phénotypes de locomotion présentés dans la partie II.1.3.1). La deuxième étape consiste à placer la souris dans le même environnement avec deux objets identiques (Figure II-11a). Enfin la troisième étape consiste à replacer la souris dans ce même environnement en changeant un des deux objets (Figure II-11c). Le propre du test consiste à observer pendant la troisième étape, le nombre de fois où la souris va explorer les objets, et à calculer l'index de reconnaissance (IR) qui est : le nombre de fois où la souris a exploré le nouvel objet divisé par la somme du nombre d'explorations des deux objets. En effet, une souris en condition physiologique va se souvenir de l'ancien objet et aller explorer de manière préférentielle le nouvel objet. Dans ce cas-là, l'IR sera supérieur à 50%. En condition pathologique avec des troubles de mémoire la souris ne se souvient plus de l'ancien objet et explore autant l'ancien que le nouvel objet. Dans ce cas-là, l'IR sera égal à 50%.

Figure II-11 Effet de P42T sur la mémoire



Mesure de la mémoire de reconnaissance à l'aide du test de reconnaissance d'objet: des souris âgées de 11 semaines ont d'abord exploré librement l'arène pendant 10 min (session 1) et plusieurs paramètres ont été testés, parmi lesquelles le temps passé au centre de l'arène (voir figure précédente). Au cours de la phase d'entraînement (Session 2, S2), les souris ont exploré le même objet dans deux positions. Au cours du test de mémoire (Session 3, S3), les souris ont exploré un objet familier et un nouvel objet en position 2. L'indice de reconnaissance (%) correspond au nombre de visites d'objet en position 2 sur le nombre total de visites. Les analyses ont été réalisées à l'aide d'un t-test par rapport à une valeur hypothétique de 50%. S2 pré-symptomatique : WtNT, R6/2NT et R6/2P42T, tous avec $p > 0.05$ contre 50%. S2 post-symptomatique : WtNT, R6/2NT et R6/2P42T, tous avec $p > 0.05$ contre 50%. S3 pré-symptomatique : WtNT, $p^* < 0.05$ par rapport à 50% ; R6/2NT, $p > 0.05$ par rapport à 50% ; R6/2 P42T $p^* < 0.05$ par rapport à 50%. S3 post-symptomatique: WtNT, $p^* < 0.05$ par rapport à 50% ; R6/2NT, $p > 0.05$ par rapport à 50% ; R6/2 P42T $p^* < 0.05$ par rapport à 50%.

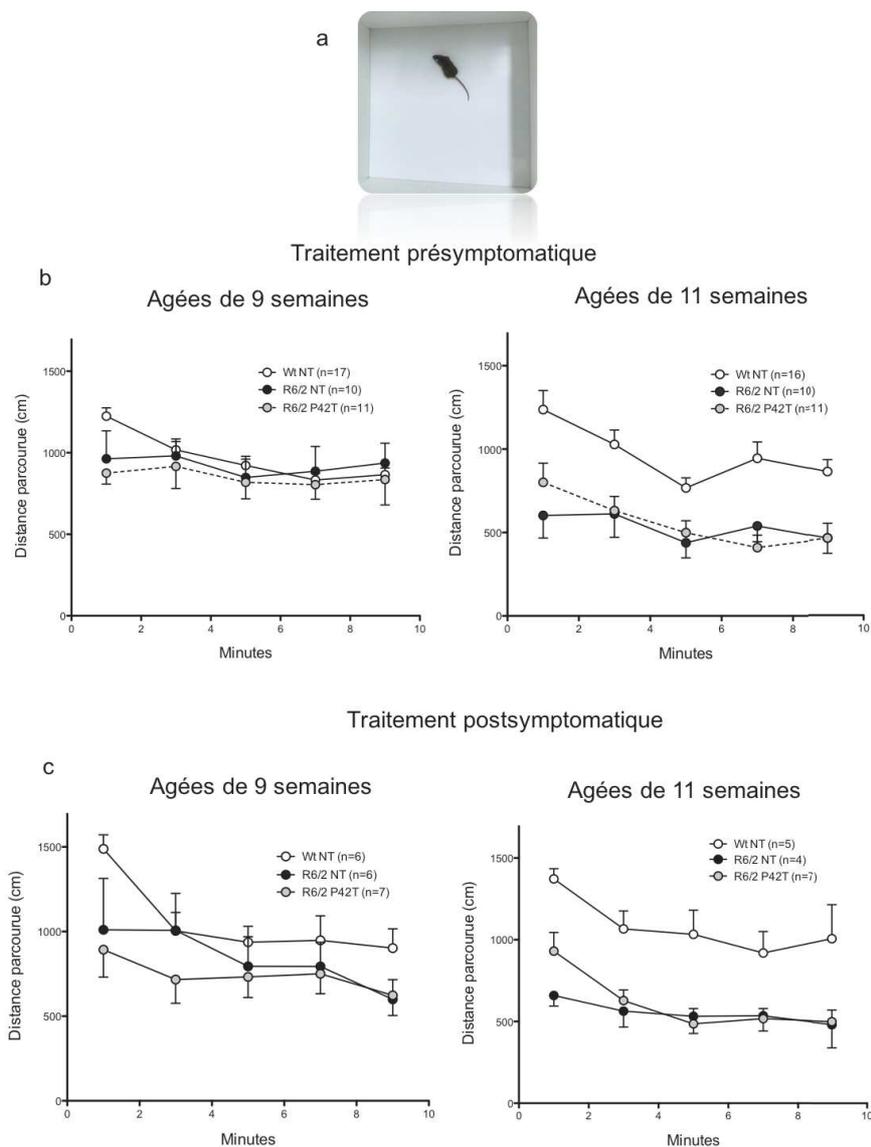
Lors de la deuxième phase nous observons que peu importe la cohorte, peu importe le génotype ou le traitement les souris vont explorer les deux objets, identiques, de manière indifférente.

Lors de la troisième phase, le propre de ce test de mémoire, nous observons que les souris Wt NT des deux cohortes vont préférentiellement vers le nouvel objet : Pre 61,5% ; Post 64,0%. Tandis que les souris R6/2 NT Pre 43,7% ou Post 48,8% vont de manière indifférente vers le nouvel et l'ancien objet. De manière intéressante on note que contrairement aux R6/2 NT, les souris R6/2 P42T des deux cohortes vont de manière préférentielle vers le nouvel objet : Pre 69,2% et Post 81,4%.

Ces résultats nous permettent donc de penser que P42T à un effet sur les déficits de la mémoire de reconnaissance induits par la mutation portée par les R6/2.

Durant la première phase du test, l'exploration du champ ouvert, il est également possible d'observer l'état cognitif des souris (Figure II-10a). En effet, l'habituation au champ ouvert est un paramètre moins connu mais pourtant utilisé [168] pour qualifier la cognition des souris. En condition physiologique, lorsqu'une souris est placée dans un champ ouvert, ce qui va se traduire par une distance parcourue relativement importante. Plus la souris s'habitue au champ moins la distance parcourue est importante, phénomène noté lors de visites ou sessions successives dans un même champ, mais également au cours d'une même session. Dans notre cas, nous avons laissé les souris pendant 10min dans le champ et en plus d'observer la distance totale parcourue au cours de ces 10min (présenté dans la partie II.1.3.1), nous avons suivi l'évolution de la distance parcourue au cours des 10min, par tranche de 2min, et cela avec des souris âgées de 9 et 11 semaines. Les résultats sont présentés dans la Figure II-12.

Figure II-12 Habituation au champ ouvert



a- Photo du champ ouvert. b- Evolution de la distance parcourue dans la cohorte PRE des souris âgées de 9 ou 11 semaines. Analyse statistique réalisée avec un test de One way ANOVA mesures répétées. 9 semaines, Wt, $p^{****}<0,0001$; R6/2NT, $p=0,6793$; R6/2P42T, $p=0,8584$; 11 semaines, Wt, $p^{****}<0,0001$; R6/2NT, $p=0,2679$; R6/2P42T, $p^{**}=0,0072$
 c- Evolution de la distance parcourue dans la cohorte POST des souris âgées de 9 ou 11 semaines. 9 semaines, Wt, $p^{**}=0,0059$; R6/2NT, $p=0,1219$; R6/2P42T, $p=0,0806$; 11 semaines, Wt, $p^{*}=0,0220$; R6/2NT, $p=0,0949$; R6/2P42T, $p^{**}=0,0039$.

Pour la cohorte Post, les Wt NT que ce soit à la semaine 9 ou à la 11 montrent une habituation au champ ouvert. Ainsi on observe à la semaine 9 durant les 2 premières minutes une distance parcourue par les Wt NT de 1224cm alors que pendant les 2 dernières minutes elles ne parcourent plus que 866cm. Cette variation au cours du temps est confirmée par un test de test de *One way ANOVA* mesures répétées. Pour les souris R6/2 NT et R6/2 P42T de la

cohorte Post on ne note pas à la 9^{ème} semaine d’habituatation, en revanche, de manière intéressante on note à la semaine 11 chez les R6/2 P42T une habituaiton au champ ouvert (Figure II-12c. Pour la cohorte Pré on note exactement la même chose pas d’habituaiton à la semaine 9 chez nos souris R6/2 NT ou P42T mais en revanche, on observe une habituaiton au champ ouvert chez nos souris R6/2 P42T à la semaine 11. Figure II-12b. De plus pour les deux cohortes à la semaine 9 aucune différence significative entre les distances totales parcourues par les souris est notable (comme montré dans la partie II.1.3.1) alors qu’à la semaine 11 les R6/2 NT et R6/2 P42T semblent parcourir moins de distance durant l’acquisition que les Wt NT.

Pour la cohorte Pre, de la même manière nous observons chez les Wt NT une régression de la distance parcourue au cours du temps que ce soit à la semaine 9 ou 11. Pour les souris R6/2 NT nous n’observons pas de régression ni à la semaine 9 ni à la semaine 11. Alors que pour les R6/2 P42T une régression est présente à la fois à la semaine 9 et à la semaine 11. Nous notons également, de la même manière que pour la cohorte Post, lors de la semaine 11, en plus des déficits cognitifs, un déficit moteur chez les R6/2 que ce soit avec ou sans le traitement.

Pour résumer, nous observons sur les deux cohortes des déficits cognitifs chez les souris R6/2 NT à la 11^e semaine. Le traitement par P42T présente un effet positif dans les deux cohortes. Ces résultats sont présentés dans le Tableau 2 :

Tableau 2 Résumé du test d'habituaiton au champ ouvert

Cohorte Semaine	Post-symptomatique		Pré-symptomatique	
11	R6/2 NT Pas d’habituaiton	R6/2 P42T Habituaiton	R6/2 NT Pas d’habituaiton	R6/2 P42T Habituaiton

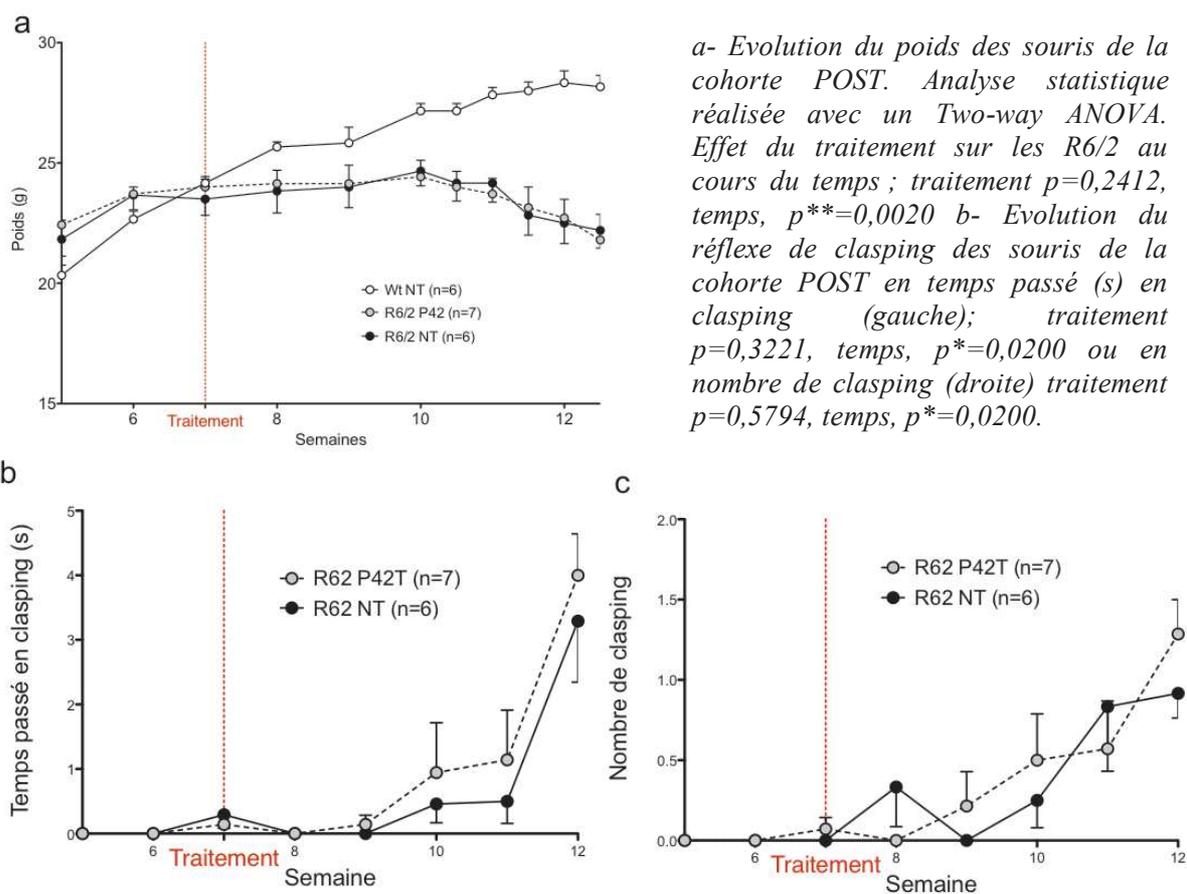
II.1.3.3. *Clasping et évolution du poids*

Le poids est également un paramètre mesuré comme signe de l’évolution de la maladie [8]. Nous observons un effet drastique de la mutation sur le poids notamment à partir de la semaine 7. Pour la cohorte Post, aucun effet de P42T n’est cependant observé (Figure II-13), indiquant que l’état général des souris R6/2 est déjà très défectueux au début du traitement.

Le clasping ou recroquevillement de la souris sur elle-même lorsque suspendue par la queue, est un phénotype juvénile que garde les souris R6/2 en grandissant [8]. Pour la cohorte Post, que ce soit en observant le temps passé en clasping ou le nombre de clasping nous n'observons aucun effet du traitement par P42T sur les R6/2.

L'effet de P42T appliqué en pré-symptomatique a été testé lors d'une étude précédente et les résultats [28] montrent un effet positif de P42T sur ces phénotypes.

Figure II-13 Clasping et évolution du poids



II.1.3.4. Conclusion des résultats comportementaux

Que ce soit la mémoire ou l'anxiété, ces deux phénotypes comportementaux sont altérés en condition pathologique de MH [4], [8], [160], [169] et connus pour être dépendants de la voie de signalisation BDNF/TrkB [140], [141], [143], [169]. Nous observons avec les tests d'anxiété et de reconnaissance d'objet que P42T a un effet positif sur ces deux phénotypes indépendamment du fait qu'il soit appliqué en post-symptomatique ou en pré-symptomatique, suggérant ainsi que ces effets ne passent pas par l'effet antiagrégant présent seulement dans la cohorte traitée en pré-symptomatique, corrélant ainsi les effets positifs de

P42T sur l'anxiété et la mémoire avec les effets positifs observés sur les taux de TrkB obtenus en 2.1.2.

En revanche sur certains tests, des différences sont obtenues entre les cohortes Pre et Post. Notamment sur le poids et le clasping. Ces différences, comme celles observées dans la partie 2.1.2 peuvent s'expliquer par les mêmes hypothèses. Ainsi on peut suggérer que l'effet sur le poids et le clasping pourrait être dû, soit à un effet indirect à travers notamment une action antiagrégante soit être une conséquence à plus long terme du traitement par P42T.

Bien que les taux de transcrits de BDNF et de TrkB soient affectés dans l'hippocampe des R6/2, nous ne trouvons pas des taux de protéines BDNF et TrkB des R6/2 significativement différents des Wt NT. Nous ne pouvons donc pas observer d'effet de P42T sur les taux de protéines. Il est à noter que nous n'observons pas d'effet sur les taux des transcrits par l'action de P42T. Or l'hippocampe est le siège de la mémoire. Comment alors expliquer les effets observés pendant les tests cognitifs ? Le cortex et le striatum sont de plus en plus reconnus comme co-acteurs avec l'hippocampe dans différents types de mémoire qui leur sont propres [170], [171]. L'effet de P42T qui semble passer plutôt par un effet positif sur la liaison corticostriatale et donc sur le striatum et peut être plus indirectement sur le cortex est suffisant au rétablissement de certains phénotypes cognitifs.

De plus, pour l'anxiété, les travaux de Tommi Saarelainen *et al* [169] montrent plus précisément, que l'effet anxiolytique passant par TrkB ne passe pas une interaction TrkB/Shc excluant donc l'activation des cascades de signalisation PI3K ou ERK. Ceci favorise donc l'hypothèse que l'effet anxiolytique de TrkB passe par une activation des voies des PLC- γ . La voie des PLC- γ est également nécessaire à l'obtention de potentialisation à long terme ou LTP [125], mécanisme cellulaire reflétant la plasticité synaptique, indispensable aux mécanismes de mémoire. La corrélation de ces deux observations permettent de supposer que P42T a un effet plus ou moins direct sur TrkB et en particulier en entraînant la phosphorylation de site activant la voie des PLC- γ .

II.1.4. Effet de P42T sur la plasticité synaptique

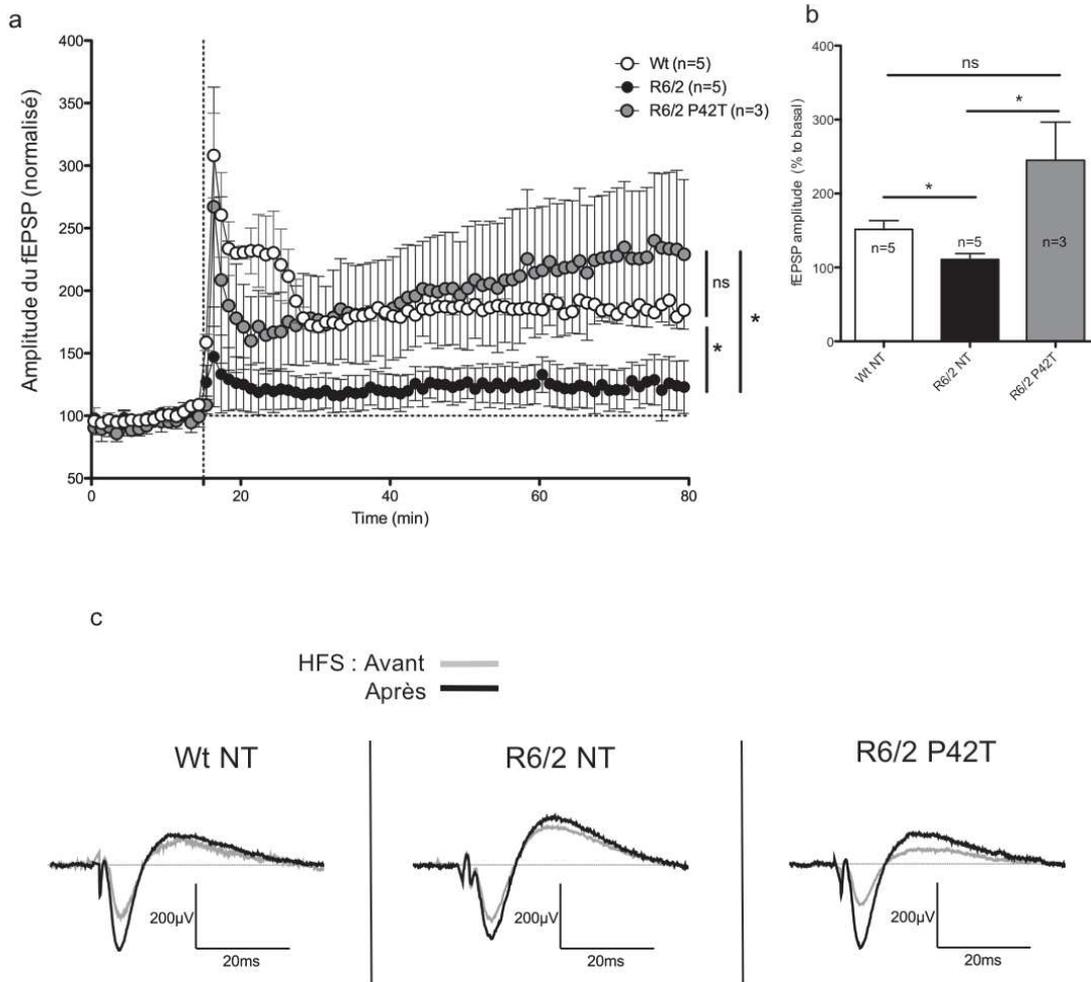
Afin d'appuyer l'idée que P42T a un effet sur la voie BDNF/TrkB, nous avons analysé l'état de la plasticité synaptique dans le cerveau des souris R6/2 traitées avec P42T. Pour cela, nous avons observé le mécanisme de LTP « long term potentiation » ou potentialisation à long terme. Ce mécanisme est connu pour être fondamental à la mémorisation [172], dépendant de la voie de signalisation du BDNF [173], [174], et altéré dans la MH [80].

II.1.4.1. Effet du traitement

Nous avons observé les LTP des souris de la cohorte Pre dans l'hippocampe, en stimulant les neurones de la commissure de Schaffer (CA3) et en observant la réponse dans la région CA1. Pour cela, nous avons induit des stimulations « basales » pendant les 15 premières minutes, avec une fréquence de 0,066 Hz et l'intensité nécessaire afin d'obtenir environ 50% du maximum de la réponse nerveuse. À 15min, nous avons déclenché pendant une seconde, une HFS « high frequency stimulation » ou stimulation à très haute fréquence, à 100Hz. Puis, nous sommes repassés à des stimulations basales. La HFS modifiant la configuration des synapses va induire une LTP, une augmentation de la réponse nerveuse en réponse à une stimulation.

C'est ce que l'on observe sur la Figure II-14a, avec nos souris Wt NT (en blanc). Les R6/2 NT (en noir), ne produisent pas de LTP suite à une HFS contrairement aux R6/2 P42T (en gris) qui elles présentent de nouveau une LTP suite au traitement par P42T. Pour quantifier, nous avons relevé le pourcentage d'augmentation 45min après la HFS par rapport à la période « basale » c'est à dire les 15 premières minutes avant la HFS. Pour les Wt NT, nous observons une augmentation de 151,6% alors que pour les R6/2 NT nous observons une diminution significative de l'amplitude de la potentialisation (110,9%). Les R6/2 P42T, présentent une amplitude plus grande que les R6/2 NT et similaire aux Wt NT avec une augmentation de 245,1% (Figure II-14b). Des traces représentatives des enregistrements sont également montrées dans la Figure II-14c.

Figure II-14 Effet de P42T sur la plasticité synaptique



Impact de P42 sur la plasticité synaptique. a- fEPSP enregistrés dans la zone CA1 de l'hippocampe en stimulant la voie des collatérales de Schaffer / fibres commissurales. Les fEPSP ont été évoqués dans des conditions basales en stimulant à 0.066 Hz. La LTP a été obtenue en appliquant une stimulation brève à haute fréquence (HFS: 100 Hz, 1 s). LTP induite par HFS observée chez les souris Wt (blanc), R6/2 (noire) et R6/2 P42T (gris). Les données correspondent aux amplitudes moyennes de fEPSP normalisées à la transmission basale. b- Le graphique montre les valeurs moyennes des groupes pour la LTP de souris WT et R6/2 traitées ou non avec P42, comme indiqué. L'analyse statistique a été effectuée 60 min après la délivrance de HFS. En utilisant le test de Mann-Whitney : WtNTvsR6/2NT $p^* < 0.05$, WtNTvsR6/2P42T $p > 0.1$; R6/2P42TvsR6/2NT $p^* < 0.05$. c-Traces représentatives (fEPSP) enregistrées avant (en gris) et 60 min après HFS (en noir) dans les différentes conditions, comme indiqué.

Ces résultats nous permettent d'observer un effet positif de P42T sur la plasticité synaptique de l'hippocampe, chez des souris R6/2.

Ceci montre donc clairement un effet de P42T sur l'hippocampe en plus des effets sur les taux de protéines et transcrits de TrkB et du BDNF observés dans la partie II.1.2.1, dans le striatum et le cortex.

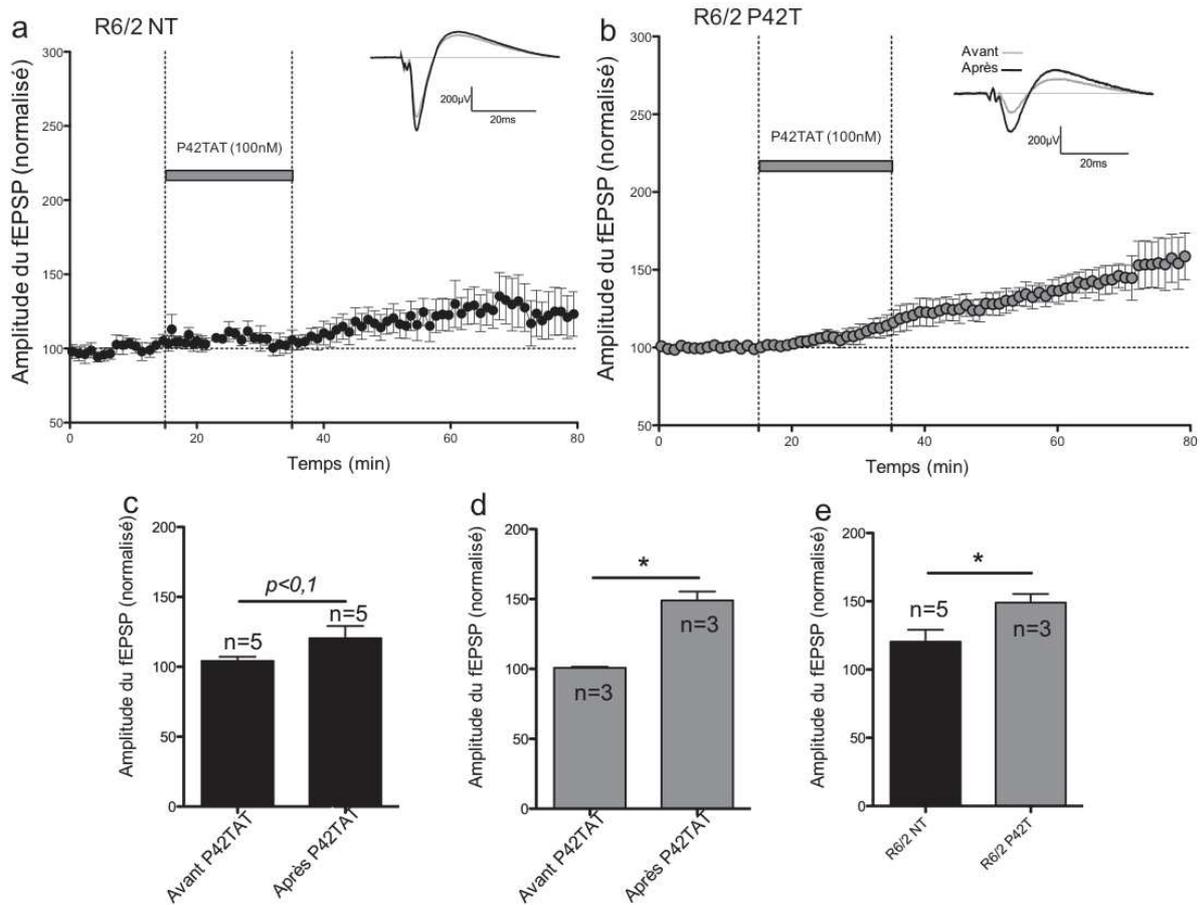
II.1.4.2. Effet de l'application directe de P42TAT

Afin de mieux comprendre les mécanismes d'action de P42 et son effet sur la plasticité nous avons également observé l'effet que pouvait avoir l'application directe de P42 sur des tranches d'hippocampe de souris R6/2.

Pour cela, nous avons appliqué du peptide P42 conjugué avec TAT (P42TAT) (non inclus dans les microémulsions) sur des tranches d'hippocampe stimulés avec une intensité nécessaire à l'obtention d'environ 50% du maximum de la réponse nerveuse et à une fréquence de 0,066 Hz. L'application a été effectuée sur des souris traitées ou non par P42T (*via* les microémulsions).

Ce que l'on observe sur des souris R6/2 NT est que l'application de P42TAT est capable d'induire une potentialisation à long terme (Figure II-15a et c). On note une augmentation, après l'application de P42TAT, de 120,5% de l'amplitude la réponse nerveuse pour une même stimulation avant son application. De plus, sur des souris R6/2 P42T nous observons également ce phénomène avec une augmentation de 149,1% (Figure II-15b et d). Lorsqu'on compare l'effet de P42TAT sur les deux conditions, on observe également que la potentialisation induite par l'application de P42TAT est plus importante sur les souris R6/2 P42T et ce de manière significative (Figure II-15e).

Figure II-15 Application de P42T sur des souris R6/2



Effet de l'application P42TAT sur la transmission synaptique dans l'hippocampe de souris R6/2. La transmission synaptique excitatrice a été enregistrée dans la région CA1 de l'hippocampe R6/2NT et R6/2P42T en stimulant la voie collatérale de Schaffer / fibres commissurales. Les fEPSP ont été évoqués dans des conditions basales en stimulant à 0.066 Hz. P42TAT (100 nM) a été superfusé pendant 20 min directement sur les tranches d'hippocampe. a-P42TAT a été appliqué sur des souris R6 / 2 NT (n = 5). b-P42TAT a été appliqué sur des souris R6 / 2 P42T (n = 3). c,d,e-Les graphiques montrent les valeurs moyennes de la potentialisation. L'analyse statistique a été effectuée en comparant la mesure obtenue avant la superfusion de P42TAT contre la mesure obtenue 60min après le début de la superfusion par P42TAT en utilisant le test de Mann-Whitney c-Pour les souris R6/2NT avant vs après, $p < 0.1$. d-Pour les tranches de cerveau R6/2 P42T, avant vs après, $p^* < 0.05$. e- Comparaison de l'amplitude du fEPSP 60min après l'application de P42TAT, R6/2NTvsR6/2P42T, $p^* < 0.05$.

Ces résultats montrent que P42 est capable d'agir rapidement sur l'hippocampe en induisant par lui-même une potentialisation à long terme.

Tous ces résultats, en biochimie, comportement et électrophysiologie montrent donc que P42T est capable de protéger de phénotypes pathologiques induits par la mutation portée par les souris R6/2 et dépendants des voies BDNF/TrkB. Bien que d'un point de vue biochimique les effets les plus marquants soient sur le striatum et le cortex, les résultats électrophysiologiques montrent également un effet positif du traitement dans l'hippocampe

des R6/2. Ces analyses sont corrélées avec les résultats des tests comportementaux où l'on observe également un effet protecteur de P42T sur des phénotypes pathologiques induits par la mutation portée par les R6/2 et dépendant de la voie BDNF/TrkB. De plus, les résultats sur la quantification des protéines semblent montrer que l'effet de P42T passerait par une action sur TrkB, le récepteur du BDNF. Des expériences complémentaires sont nécessaires afin de le confirmer.

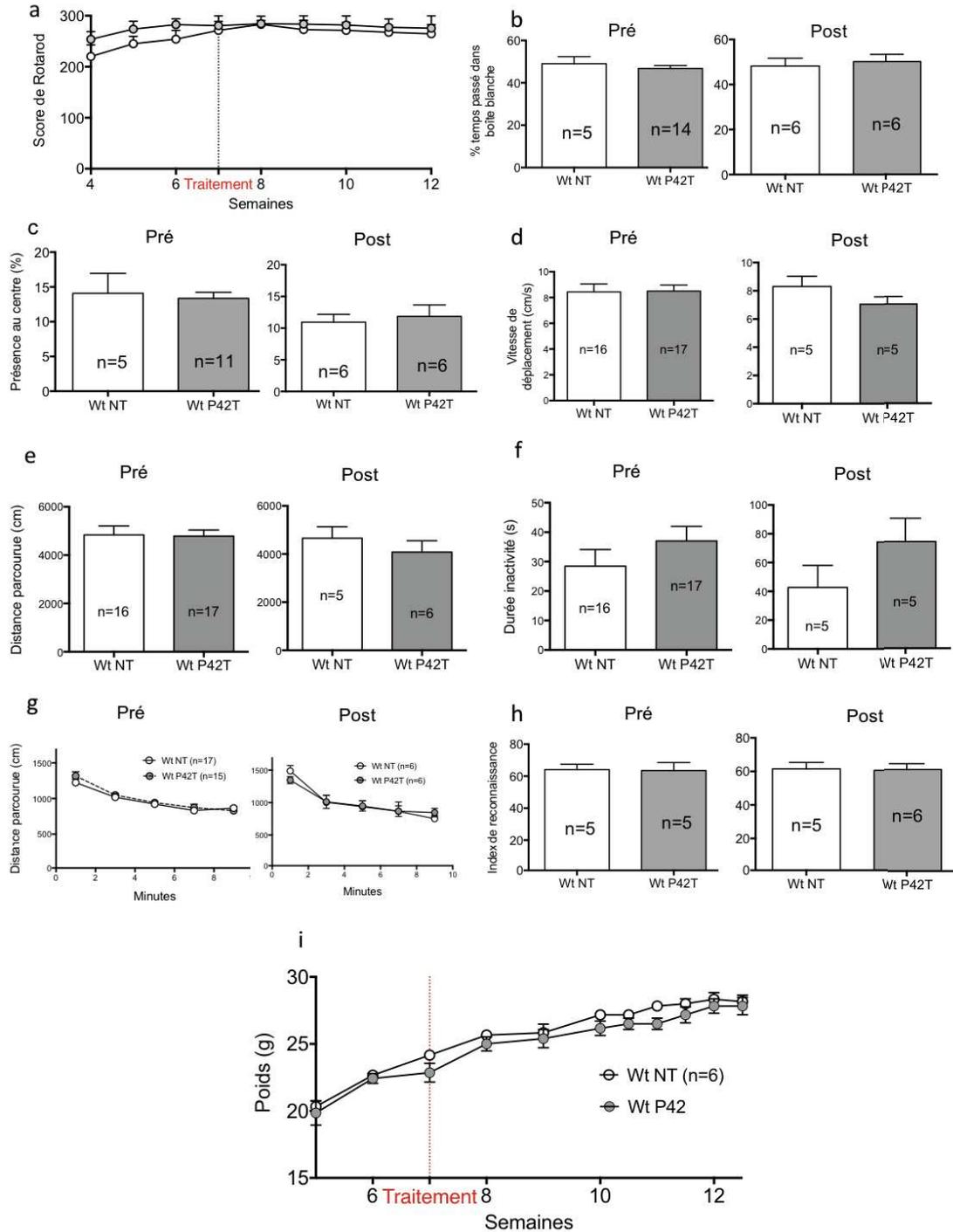
II.1.5. Effet de P42T sur des souris sauvages

Afin de mieux comprendre le mode d'action de P42, nous avons vérifié si les comportements des souris Wt étaient modifiés par un traitement P42T. Nous avons également regardé biochimiquement quel était l'impact d'un traitement par P42T sur les taux d'expression du BDNF et de TrkB. Finalement, nous avons mesuré l'impact de P42TAT sur la plasticité et l'activité des neurones en condition physiologique.

II.1.5.1. *Comportements et biochimie*

La Figure II-16 montre les résultats des comportements présentés dans les précédentes parties, mais réalisés sur des souris sauvages non traitées (Wt NT) et des souris sauvages traitées avec P42T (Wt P42T). Aucun test ne permet d'observer de différence significative, que ce soit sur la coordination motrice avec le rotarod (Figure II-16.a), l'anxiété avec le test de boîte noire/boîte blanche (Figure II-16.b) ou la présence au centre du champ ouvert (Figure II-16.c), l'activité motrice avec la vitesse de déplacement, la distance parcourue et la durée d'inactivité (Figure II-16d,e et f), la cognition avec l'habituation au champ ouvert (Figure II-16g) ou le test de reconnaissance d'objet (Figure II-16h), ou sur le poids (Figure II-16i).

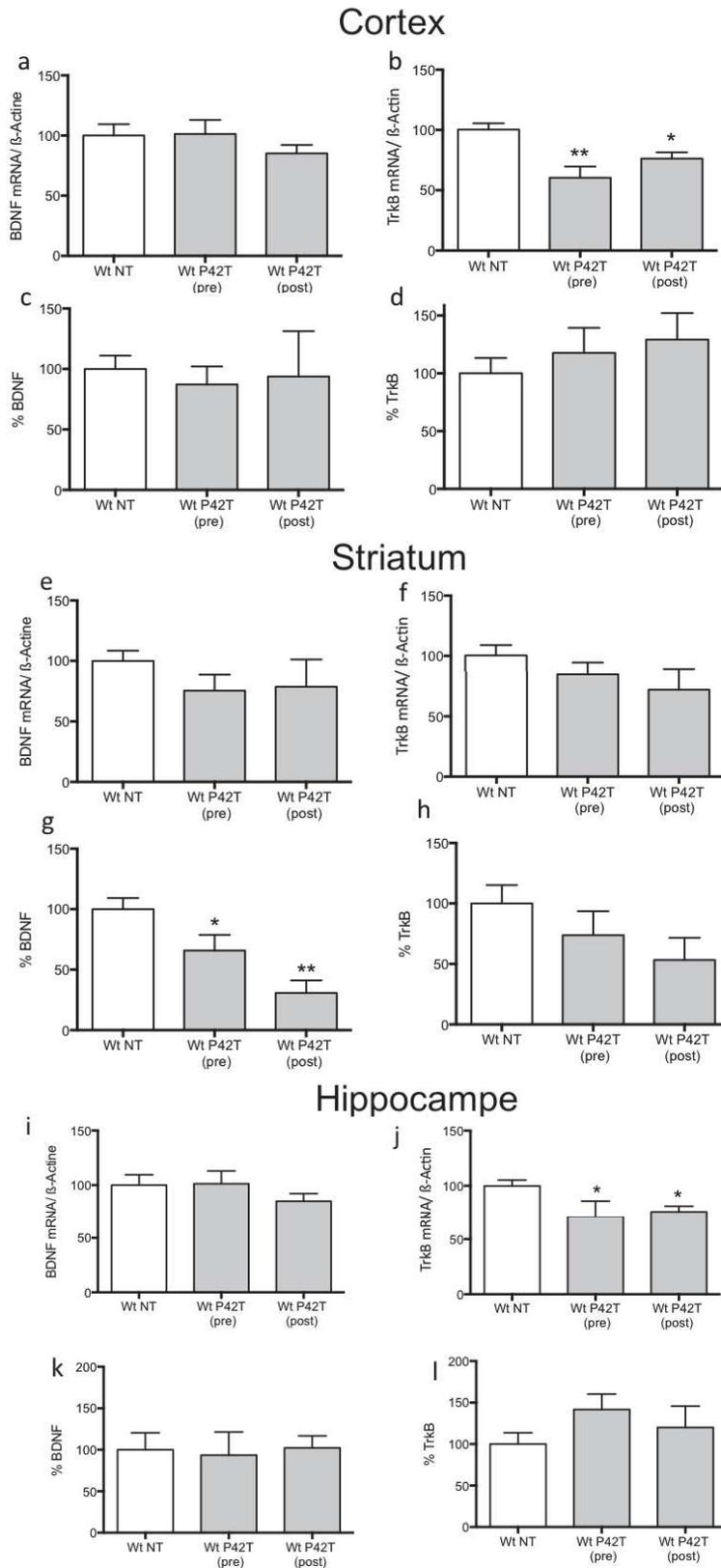
Figure II-16 Effet de P42T sur le comportement de souris sauvages



Les résultats sont présentés pour les cohortes PRE et POST. a- Evolution du score de Rotarod. b- Anxiété observée avec le test de boîte noire/boîte blanche et le % de présence dans la boîte blanche. c- Anxiété observée avec la mesure du % de présence au centre du champ ouvert. d- Vitesse de déplacement (cm/s) durant la session en champ ouvert. e- Distance parcourue pendant la session en champ ouvert (cm). f- Temps passé par les souris à l'arrêt dans la session en champ ouvert (s). g- Evolution de la distance parcourue au cours de la session en champ ouvert (cm). h- Résultats des tests de reconnaissance d'objet en champ ouvert (Indice de reconnaissance %). i- Evolution du poids (g). Les analyses statistiques ont été réalisées avec un Two-way Anova pour a, g et i et avec Mann-Whitney pour les autres. Aucune différence significative n'est observée.

En revanche d'un point de vue biochimique, quelques effets sont notables (Figure II-17). Dans le cortex, on observe une diminution significative de l'ARNm de *TrkB* dans le cortex avec un taux de 60,48% pour les Wt P42T Pre et de 76,33% pour les Wt P42T Post par rapport aux 100% des Wt NT (Figure II-17b). Dans le striatum on observe également une diminution significative du taux de protéines du BDNF avec 65,87% pour les Wt P42T Pre et 30,82% pour les Post. De plus, dans le striatum nous notons une tendance à la diminution pour le taux de protéines *TrkB* avec 73,85% pour les Pre et 53,29% pour les Post (Figure II-17g et h). Tandis que dans l'hippocampe, on observe une diminution significative du taux de transcrits *TrkB* avec 70,87% pour les Wt P42T Pre et 76,33% pour les Wt P42T Post (Figure II-17f).

Figure II-17 Effet de P42T sur le taux de transcrits et de protéines chez des souris sauvages



Les résultats des mesures des taux de protéines et de transcrits du BDNF et de TrkB dans le cortex, le striatum et l'hippocampe, des souris sauvages traitées ou non avec P42T sont présentés dans la figure. a,b,c,d, représentent les valeurs obtenues dans le cortex. e,f,g,h, représentent les valeurs obtenues dans le striatum. i,j,k,l représentent les valeurs obtenues dans l'hippocampe. a,e,i représentent les valeurs du transcrit du BDNF en % par rapport au transcrit de β-actine normalisé par rapport au Wt (100%). b,f,j représentent les valeurs du transcrit de TrkB en % par rapport au transcrit de β-actine, normalisé par rapport au Wt (100%). c,g,k représentent les taux de la protéine BDNF normalisé par rapport au Wt (100%). d,h,l représentent les taux de la protéine TrkB normalisé par rapport au Wt (100%). Les analyses statistiques ont été réalisées avec des tests Mann-Whitney.

Des différences significatives sont observées dans b,g et j. b- WtNTvsWtP42T(pre), $p^{**}=0,004$; WtNTvsWtP42T(post), $p^{*}=0,242$. g- WtNTvsWtP42T(pre), $p^{*}=0,0364$; WtNTvsWtP42T(post), $p^{**}=0,0061$. j- WtNTvsWtP42T(pre), $p^{*}=0,0229$; WtNTvsWtP42T(post), $p^{*}=0,0168$.

Ces résultats permettent de déduire plusieurs éléments. Premièrement, cela confirme que P42T est bien un produit actif. Nous notons aussi que les effets secondaires du traitement sont observables seulement d'un point de vue biochimique mais que les diminutions du BDNF et/ou de TrkB observées, ne se répercutent pas sur les phénotypes comportementaux. De manière intéressante, nous observons également que le taux de transcrits de TrkB dans le cortex et le taux de protéines TrkB dans le striatum que l'on retrouvait sauvé par P42T dans les R6/2, est dans les Wt diminué par P42T. Ce qui semblerait montrer que l'effet qu'a P42T en condition physiologique soit lié à l'effet que l'on voit en condition pathologique. Et finalement, nous notons qu'il n'y a pas de différence entre les deux cohortes, ce qui semble indiquer que les différences d'effet que l'on voyait entre les deux traitements résulteraient davantage de l'inhibition de l'agrégation.

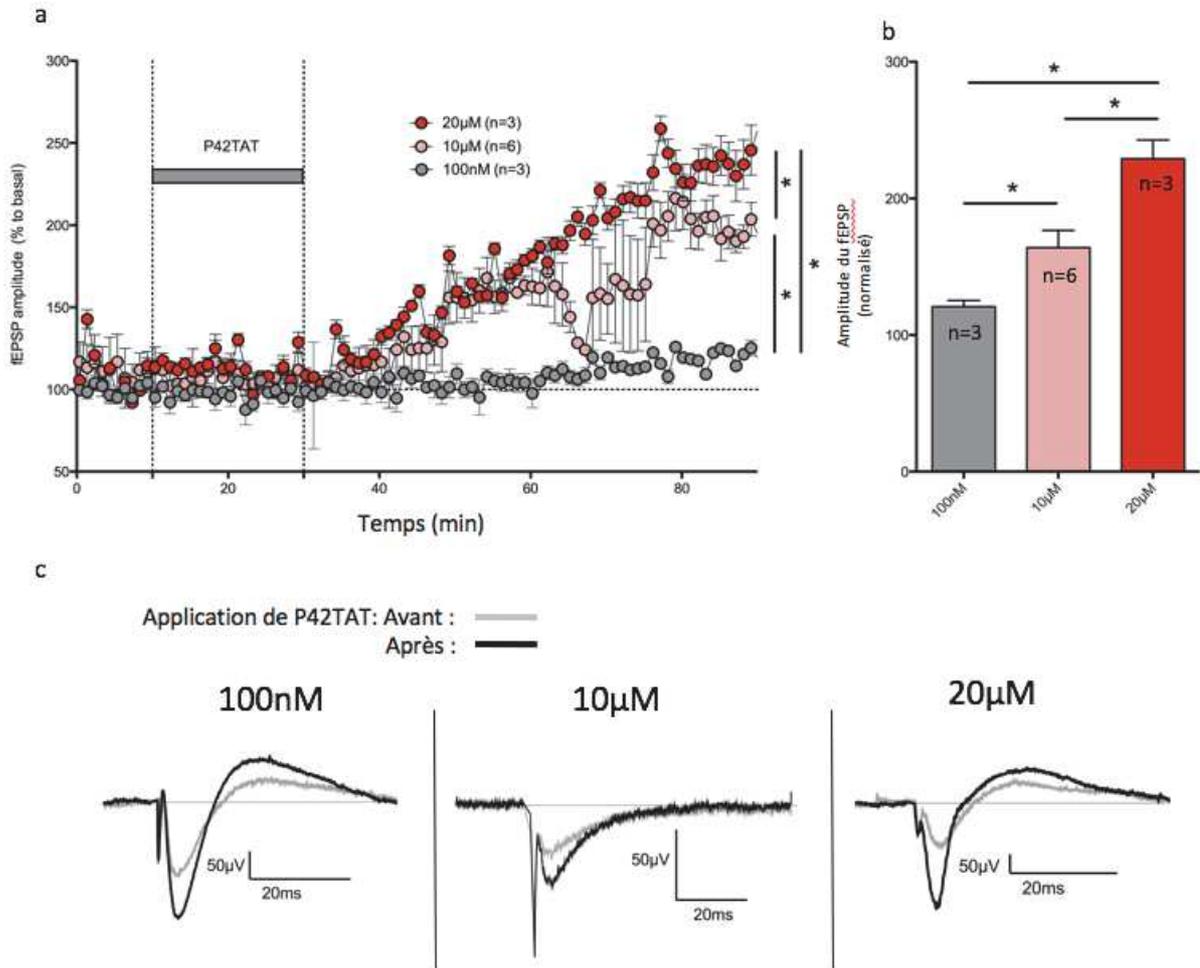
II.1.5.2. Plasticité synaptique

Malgré des effets du traitement par P42T sur l'hippocampe des souris sauvages, avec notamment une diminution du transcrit de TrkB aucun changement dans le comportement n'est observable. Qu'en est-il de la plasticité, mécanisme également dépendant de la voie BDNF/TrkB ?

Pour observer l'effet que pourrait avoir P42 sur la plasticité neuronale, nous avons appliqué P42TAT sur des tranches d'hippocampes de souris Wt NT et observé si comme sur les R6/2 (Figure II-15), le peptide P42TAT pouvait induire une potentialisation par lui-même.

Les résultats obtenus sont présentés dans la figure Figure II-18a. Une application de 100nM de peptide induit une légère potentialisation avec une augmentation de 120,8% de l'amplitude du signal par rapport à la période basale calculée avant l'application de P42TAT (Figure I-18b). Cet effet est significativement plus grand lorsque l'on applique P42TAT à des concentrations plus élevées de 10 μ M à 20 μ M, avec respectivement une augmentation de 163,9% et 229,0%. Des traces représentatives sont également montrées (Figure II-18c).

Figure II-18 Effet de l'application de P42TAT chez des souris sauvages

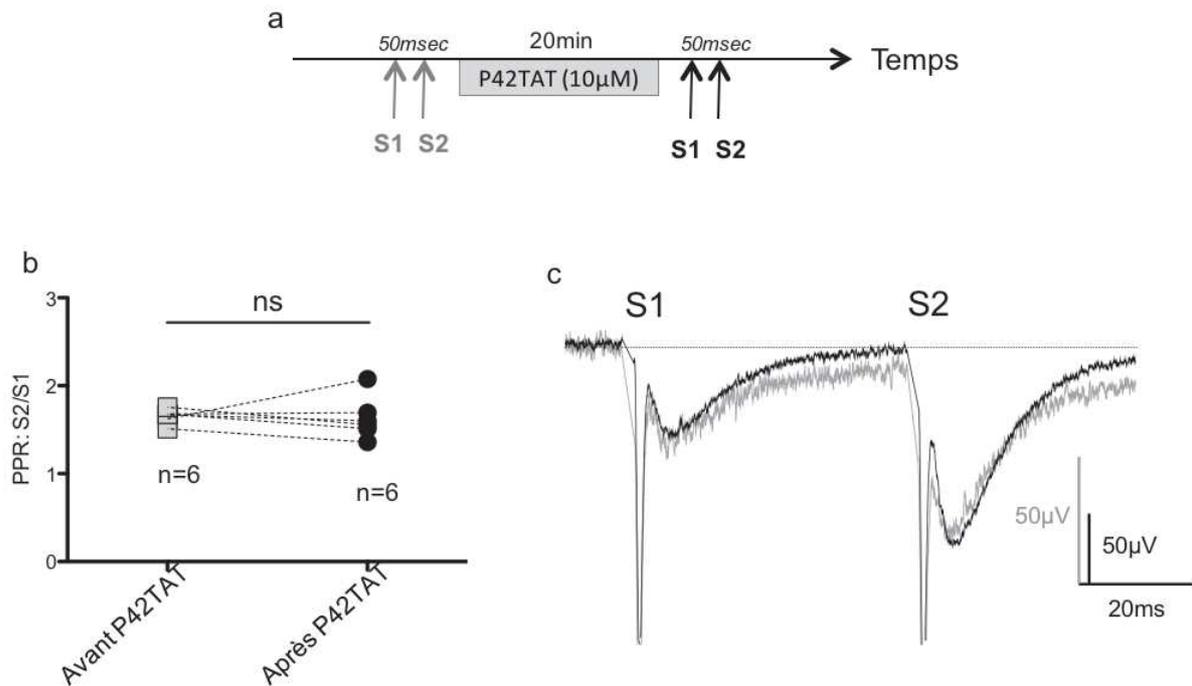


Effet dose-réponse du peptide P42TAT sur la transmission synaptique dans l'hippocampe de souris Wt. a- Evolution de l'amplitude des fEPSP enregistrée dans la région CA1 de l'hippocampe de souris Wt en stimulant la voie des collatérales de Schaffer / fibres commissurales. Les fEPSP ont été évoqués dans des conditions basales en stimulant à 0.066 Hz. P42TAT a été appliqué à différentes concentrations : 100 nM en noir (n = 2), 10 mM en rose (n = 6), 20 mM en rouge (n = 3) pendant 20 min directement dans le milieu. b-Quantification de la potentialisation selon la concentration en peptides P42TAT. P42TAT a été testé à 100 nM (n = 3), 10 mM (n = 6) et 20 mM (n = 3) sur des tranches d'hippocampe de souris Wt. Le graphique correspond aux amplitudes moyennes fEPSP normalisées à la transmission basale. La transmission synaptique excitatrice chez les souris Wt a été analysée 60 min après la stimulation par P42TAT à différentes concentrations. En utilisant le test de Mann-Whitney: 100nMvs 10µM, $p^* < 0.05$, 100nMvs20µM, $p^* < 0.01$; 10µMvs20µM ; $p^* < 0.05$. c- Des traces représentatives ont été enregistrées pendant la ligne de base (gris) et 60 min après l'application de P42TAT (noir) avec différentes concentrations, comme indiqué.

De manière intéressante on constate donc que non seulement P42TAT est suffisant pour induire une LTP mais également que P42TAT semble avoir un effet de dose.

Ces résultats permettent d'éclaircir plusieurs points sur l'action de P42. Tout d'abord, ces résultats confirment que P42 a un effet en condition physiologique, indépendamment de son effet sur la mHtt, en condition pathologique. Ceci est corrélé non seulement aux résultats observés sur les variations des taux de transcrits et de protéines obtenus dans les souris WT P42T (partie II.1.2.1), mais également avec des résultats publiés par Arribat *et al* [27] qui montrent par exemple une augmentation du nombre de vésicules le long d'axones en présence de Htt contenant P42.

La potentialisation observée peut être induite par une modification de l'élément pré-synaptique ou de l'élément post-synaptique. Afin de savoir lequel des deux éléments est modifié avec l'application de P42TAT, nous avons réalisé un protocole d'impulsions appariées (« paired-pulse » (PP)), appliquées avant et après l'application de P42TAT à 10 μ M. Le PP consiste à réaliser deux stimulations identiques, espacées de 50ms l'une de l'autre. Lors de la première stimulation, une entrée de calcium a lieu dans l'élément pré-synaptique ce qui enclenche la libération de neurotransmetteurs dans la fente synaptique, induisant une réponse de l'élément post-synaptique. Lors de la seconde stimulation une nouvelle entrée de calcium, identique à la première a lieu dans l'élément pré-synaptique. Entre les deux stimulations le taux de calcium intracellulaire de l'élément pré-synaptique n'a pas le temps de revenir à un taux de base. Ce qui fait que lors de la deuxième entrée de calcium le taux de calcium intracellulaire va être plus important que lors de la première entrée. Ceci entraînant donc lors de la seconde stimulation une plus grande quantité de neurotransmetteurs libérés par l'élément pré-synaptique vers l'élément post-synaptique et donc une réponse plus importante de l'élément post-synaptique. Il y a une facilitation de la transmission synaptique. Le ratio entre l'intensité de la réponse à la seconde stimulation par rapport à la première stimulation ou PPR est indicatif d'un effet en pré-synapse ou en post-synapse. Ce ratio est en condition physiologique supérieur à 1, car dépendant de l'élément pré-synaptique. Ainsi, lors d'un événement entraînant des modifications dans l'organisation d'une synapse, comme une potentialisation, en mesurant le PPR, on peut donc savoir si oui ou non une modification dans l'élément pré-synaptique a eu lieu. Pour cela, il est nécessaire de mesurer le PPR avant et après la potentialisation. Dans notre cas avant ou après l'application de P42TAT. Le protocole est présenté dans la Figure II-19a.

Figure II-19 Protocole de paired-pulse

a- Protocole de paired pulse. Des impulsions pairées et composées de deux stimulations identiques (S1: première stimulation, S2: seconde stimulation, séparées par un intervalle de 50 ms) ont été réalisées sur des tranches hippocampiques de 6 souris avant (gris) ou après (noir) l'incubation de P42TAT (10 mM). Le PPR ou le ratio : amplitude du fEPSP obtenue pendant S2 sur l'amplitude du fEPSP obtenue pendant S1 est observé. b-PPR (S2 / S1) avant (en gris) ou après l'application P42TAT (en noir). L'analyse statistique a été réalisée avec un test de Wilcoxon: avant P42TAT vs après P42TAT, $p > 0.1$. c-Des traces représentatives sont présentées. Avant l'application de P42TAT (en gris) et après l'application de P42TAT (en noir).

Nous observons un PPR de 1,65 avant la potentialisation induite par P42TAT et de 1,63 après la potentialisation (Figure II-19b). Ainsi, nous n'identifions pas de modification significative du PPR avant et après la potentialisation par P42TAT. Donc nous pouvons en déduire que l'effet de P42TAT passerait plutôt par un effet sur l'élément post-synaptique, car un effet pré-synaptique de P42TAT aurait induit une modification du PPR après son application (cf traces représentatives des PPR dans la Figure II-19c).

Tous ces résultats permettent de penser que P42 est actif en condition physiologique. En revanche, certaines actions de P42 notamment sur les taux de transcrits et de protéines de TrkB le long de l'axe corticostriatal, semblent avoir un effet opposé que l'on soit en condition physiologique ou en condition pathologique. Tandis que d'autres effets notamment sur la potentialisation dans l'hippocampe semblent être les mêmes peu importe le contexte

génétique. Dans tous les cas, aucune répercussion de ces effets secondaires sur les Wt n'est notable sur des phénotypes comportementaux.

De plus, les expériences en électrophysiologie avec le protocole de « *paired-pulse* » nous permettent de penser que P42 a un effet dans l'hippocampe sur l'élément post-synaptique. Résultats qui sont intéressants de corrélés avec les résultats obtenus dans la partie II.1.2.1 qui montrent l'effet de P42 sur TrkB dans le striatum, striatum composé des neurones post-synaptiques de la liaison corticostriatale.

II.1.6. Activité calcique

Dans l'idée de développer un modèle nous permettant d'étudier plus précisément le mode d'action de P42, nous avons également développé l'étude des courants calciques sur des neurones d'hippocampe en culture. L'activité calcique est le reflet de l'activité des neurones et est dépendante de très nombreuses voies de signalisation dont la voie BDNF/TrkB [175].

II.1.6.1. Effet de P42TAT

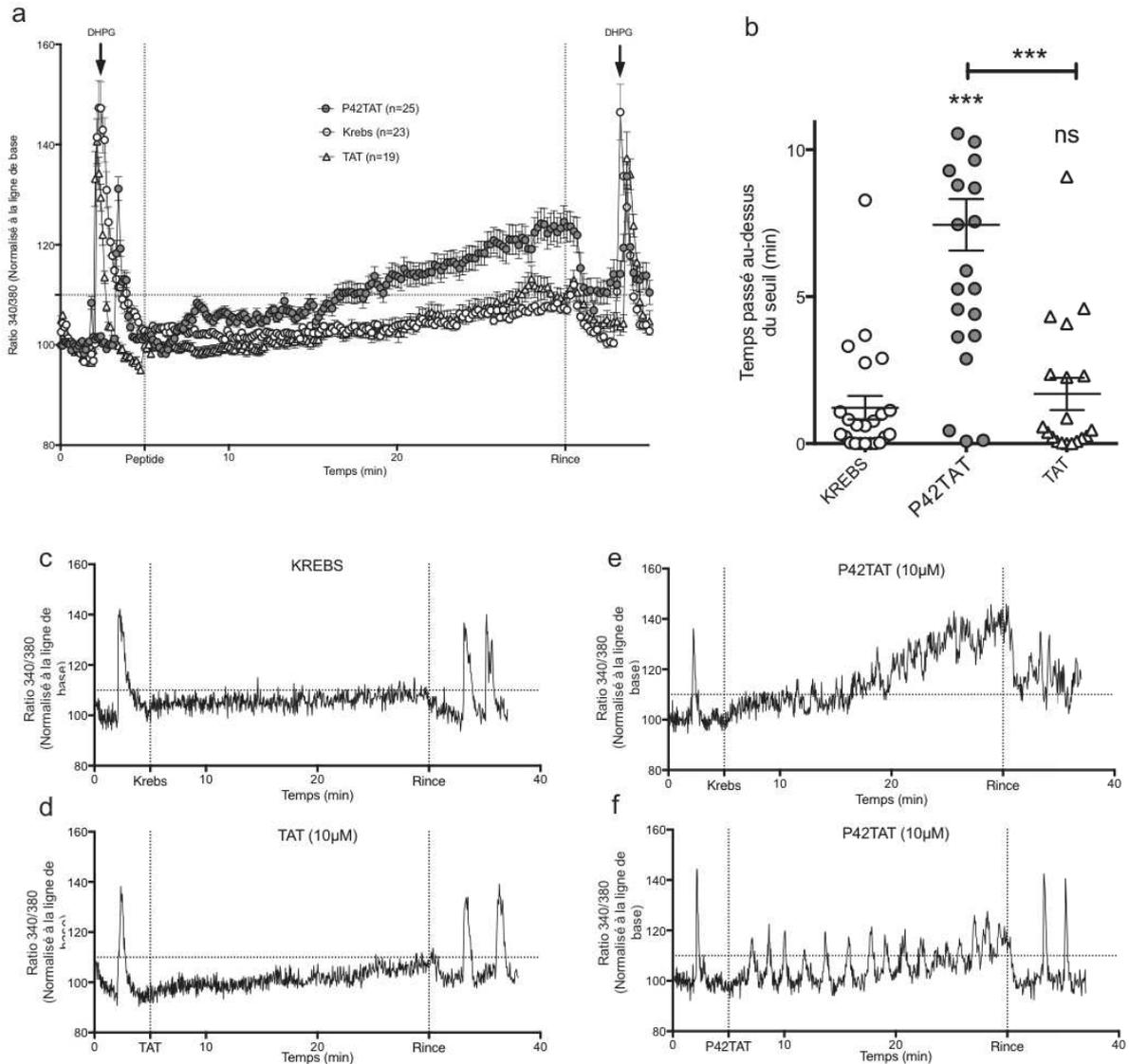
Lors de l'application de P42TAT 10 μ M, nous observons une augmentation du calcium intracellulaire contrairement à ce que l'on observe lorsque l'on applique dans les mêmes conditions du milieu extracellulaire (KREBS) ou un peptide TAT (10 μ M) (Figure II-20a,c,d,e et f). Afin de quantifier cette augmentation, nous avons établi un seuil à 110% du taux basal de calcium intracellulaire et mesuré le temps passé au-dessus de ce seuil pour chaque cellule.

Nous observons que les cellules en présence de P42TAT passent plus de temps au-dessus du seuil, 7,44min, que des cellules sur lesquelles est appliqué KREBS ou TAT, respectivement 1,22min et 1,70min (Figure II-20b).

P42 semble donc avoir un effet excitateur sur les neurones d'hippocampe. De plus, il est intéressant de noter que lorsque l'on renouvelle le milieu et donc qu'on élimine le peptide, un retour au taux normal de calcium intracellulaire est observé.

Enfin, il est également intéressant d'analyser les entrées calciques pour chaque cellule individuellement. Ainsi, on peut observer différents profils de cellules. Certaines cellules ont des augmentations plus ou moins linéaires de calcium intracellulaires (Figure I-20e) alors que d'autres cellules présentent, de manière intéressante, un second profil avec des entrées importantes et régulières de calcium régulées très rapidement (Figure II-20f.)

Figure II-20 Effet de l'application de P42TAT sur l'activité de neurones



Action de P42 sur l'activité de calcique. Les tests sont effectués sur des cellules neuronales d'hippocampe en culture de 15 jours. a-La concentration de calcium intracellulaire ($[Ca^{2+}]_i$) ont été mesurés dans les neurones à l'aide de la sonde calcique fura-2. Le rapport de fluorescence Fura-2 après excitation à 340 ou 380 nm (F_{340}/F_{380}) a été normalisé à la ligne de base (2 premières minutes). Du DHPG (50 mM) a été appliqué à 2.5 min comme indiqué. À 5 min, le débit de perfusion a été arrêté et 1 ml de milieu extracellulaire contenant ou non du P42TAT (10 mM) ou du TAT (10 mM) a été appliqué. Après 25 min, le débit de perfusion a été rétabli pour laver. Enfin, les cellules ont été soumises à nouveau à du DHPG (50 mM). b- Graphique représentant l'effet excitateur de P42TAT sur les $[Ca^{2+}]_i$. Le temps passé par le ratio F_{340}/F_{380} au-dessus du seuil (porté à 110% du F_{340}/F_{380} basal) a été compté pour chaque cellule et moyenné pour chaque condition. L'analyse statistique a été réalisée avec des tests de Mann-Whitney. P42TvsKREBS, $p^{***}=0,0004$; P42TvsTAT, $p^{***}=0,0008$. c,e,d,f-Enregistrements représentatifs de $[Ca^{2+}]_i$ obtenus dans une cellule pour chaque condition (témoin, P42TAT et TAT).

II.1.6.2. Effet de P42TAT en présence d'antagonistes du BDNF

Grâce à l'imagerie calcique nous avons pu analyser l'effet de P42 sur l'activité calcique en présence d'antagonistes du BDNF.

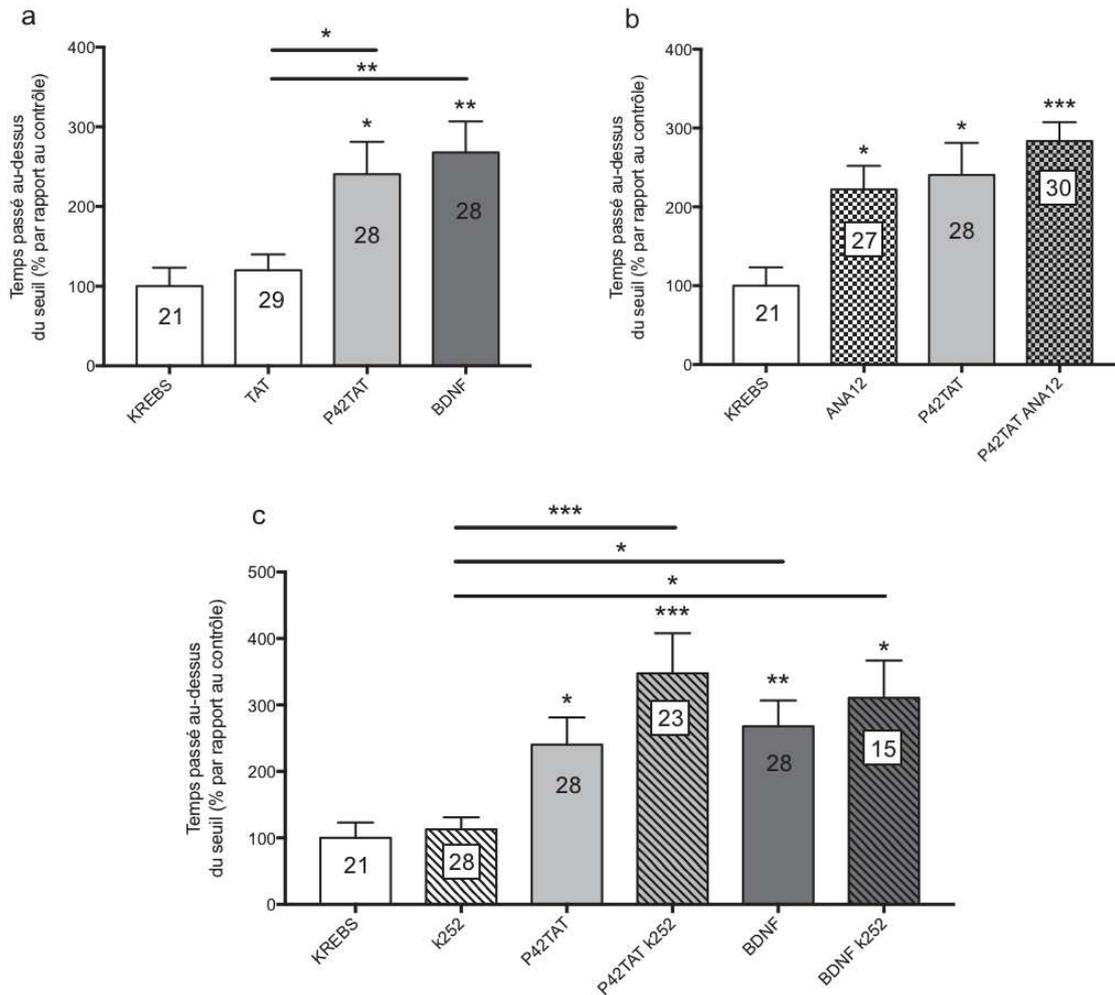
Pour cela nous avons utilisé comme antagonistes ANA12 et K252a.

ANA12 est un ligand de TrkB qui empêche son activation par le BDNF avec une grande efficacité [176]. De plus, ANA12 est censé se fixer de manière spécifique à TrkB sans affecter les voies dépendantes de l'activation des autres récepteurs de type Tropomyosin related receptor kinase : TrkA et TrkC [176].

K252a est un composé utilisé pour inhiber les effets des facteurs neurotrophiques en général, dont les activités sont régulées par les récepteurs de la famille des Tropomyosin related receptor kinase. Mieux connu qu'ANA12, K252a n'est en revanche pas spécifique aux TrkB mais à toute la famille des Trk [177].

Tout d'abord, nous avons voulu retrouver le résultat déjà décrit [11], et vérifier si P42T présentait un effet similaire au BDNF. Dans cette nouvelle expérience, nous avons en effet confirmé que comme le BDNF, P42TAT a un effet significatif par rapport au contrôle avec une augmentation du temps passé au-dessus du seuil de 240,5%. Tandis qu'avec TAT aucun effet significatif n'est noté. Avec l'application de BDNF (20ng), on trouve une augmentation de 268%, significativement plus grande par rapport au contrôle et à TAT et similaire à celle observée avec P42TAT (Figure II-21a).

Figure II-21 Effet de P42T en présence d'antagonistes du BDNF



L'effet de l'application de différentes molécules a été observé en imagerie calcique. KREBS : 1mL de Krebs, milieu extracellulaire. TAT : 1mL de milieu extracellulaire avec TAT à 10 μ M. P42TAT : 1mL de milieu extracellulaire avec P42TAT à 10 μ M. BDNF : 1mL de milieu extracellulaire contenant 20ng de BDNF. ANA12 : 1mL de milieu extracellulaire contenant ANA12 à 25 μ M. k252a : 1mL de milieu extracellulaire contenant 10ng de k252a. Lors de cette application deux molécules étaient appliquées dans un 1mL. a- Analyse de l'effet de P42TAT et du BDNF. b- Analyse de l'effet d'ANA12. c- Analyse de l'effet de k252a. Les analyses statistiques ont été réalisées avec un test de Kruskal-Wallis et des post-hoc de dunn. Les différences significatives sont les suivantes. a- P42TATvsKREBS, $p^*=0,0254$; BDNFvsKREBS, $p^{**}=0,0048$; P42TATvsTAT, $p^*=$; P42TATvsBDNF, $p^{**}=0,0074$; ANA12vsKREBS, $p^*=0,0488$; P42TATANA12vsKREBS, $p^{***}=0,0006$; P42TATk252avsKREBS, $p^{***}=0,0008$; BDNFvsK252a, $p^*=0,0447$

Pour ANA12 (Figure II-21b), nous observons que son application à 25 μ M a un effet propre. Ainsi, on retrouve une augmentation de 222,1% par rapport au contrôle. Lors de

l'application de P42TAT et ANA12, nous n'observons une augmentation de 272% et donc pas de différence significative par rapport aux deux molécules appliquées séparément.

Pour K252a, nous notons un pourcentage de 113% et n'observons pas d'effet significatif de la molécule par rapport au contrôle. En revanche, lors de l'application de P42TAT ou du BDNF avec K252a, nous ne notons pas non plus de diminution de l'effet de P42TAT et du BDNF avec respectivement des augmentations du temps passé au-dessus du seuil à 347,7% et 310,7% par rapport au contrôle statistiquement similaires aux augmentations provoquées par l'effet des molécules seules (Figure II-21c).

Pour conclure cette série de résultats, nous pouvons retenir que l'application de P42 a un effet similaire à celui provoqué par le BDNF. Egalement, Susane B Lang *et al* [175] montrent de manière intéressante des profils d'activité calcique avec l'application de BDNF similaires au profil d'entrée fréquente de calcium que nous avons obtenu lors de l'application de P42TAT.

En revanche, des études plus approfondies devront être réalisées avec les antagonistes afin de montrer si oui ou non l'inhibition de l'activation de TrkB bloque l'effet de P42. Notamment, on peut observer dans les travaux de Tapley *et al* [177] que pour K252a différentes doses de la molécule entraînent des effets sur différentes cibles. Nous pouvons donc supposer qu'en ajustant les concentrations des antagonistes nous pourrions potentiellement mettre en évidence le rôle de P42 sur TrkB.

II.1.7. Données complémentaires

Avec l'objectif d'avoir une meilleure compréhension de l'effet que pourrait avoir P42T sur la physiopathologie de la MH développée par les souris R6/2, d'autres expériences ont été réalisées. Ces expériences sont complémentaires aux précédentes et bien que n'apportant pas d'éléments directs sur l'effet de P42, elles restent cependant informatives, notamment sur l'état du BDNF et ou de sa voie d'activation *via* TrkB.

II.1.7.1. Profils protéiques du BDNF

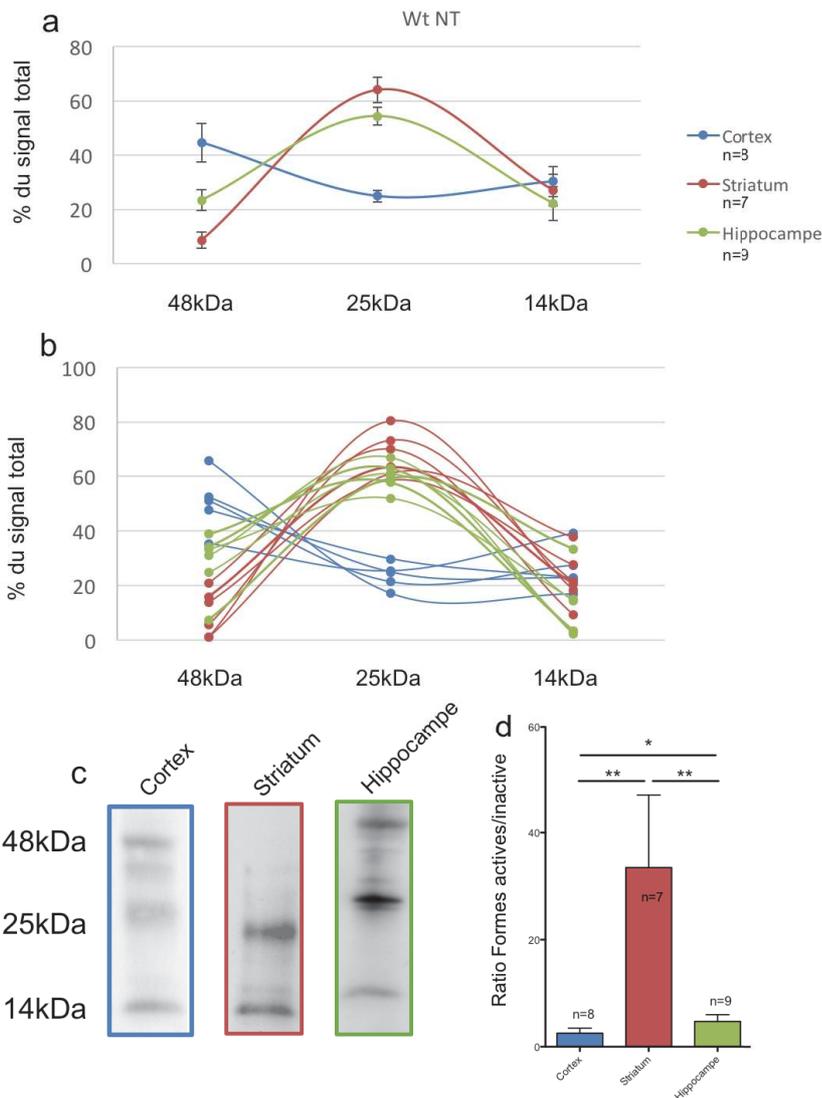
Le BDNF est une protéine qui est transcrite sous forme d'une protéine inactive : le pro-BDNF. Différentes modifications post-traductionnelles ont lieu jusqu'à l'obtention d'une protéine mature de 14kDa qui peut former des homodimères [178]. Lors de la quantification du taux de protéines de BDNF, nous avons pu observer trois bandes distinctes et ce triplet est retrouvé dans des travaux précédents [178]. La première bande de 14kDa correspondant donc

au monomère de la forme mature, la deuxième à environ 25kDa correspondrait à un homodimère de la forme mature, et la bande la plus haute d'environ 48kDa correspondrait à la forme immature [75], [178].

Concernant l'axe corticostriatal, il a été montré que la source de BDNF venait essentiellement du cortex où le BDNF est transcrit puis traduit avant d'être acheminé vers le striatum [76]. En condition pathologique, de MH en particulier, où il y a des problèmes sur la transcription du BDNF [6] mais également des problèmes au niveau de son transport [81], il peut être intéressant d'observer non pas la quantité de protéines totales traduites mais la proportion de chaque forme du BDNF l'une par rapport à l'autre.

Pour commencer, nous observons chez les souris Wt NT des profils protéiques de BDNF différents en fonction des structures (Figure II-22).

Figure II-22 Profils protéiques Wt NT



Le BDNF est une protéine qui peut être présente sous plusieurs formes dans l'organisme et observé par western blot à plusieurs tailles. 14kDa : monomère de BDNF mature, 25kDa : Homodimère de BDNF mature, 48kDa potentiellement une forme immature du BDNF. a- Représente le profil protéique moyen dans le cortex, le striatum et l'hippocampe. Le profil protéique est formé par la proportion (en %) de chaque forme du BDNF par rapport à la quantité de protéine BDNF totale. b- Représente les différentes courbes (une courbe égale une souris) qui composent les moyennes présentes dans a. c- Photos illustrant les trois formes de BDNF observées sur les différentes membranes. d- Analyse du ratio formes actives/forme inactive. Les formes actives sont composées de la forme à 14kDa et de la forme à 25kDa. La forme inactive est la forme à 48kDa. Les analyses statistiques sont réalisées avec le test de Mann-Whitney. CortexvsStriatum, $p^{**}=0,0046$; StriatumvsHippocampe, $p^{**}=0,0082$; CortexvsHippocampe, $p^*=0,0242$.

La Figure II-22a représente la moyenne de chaque forme pour chaque structure, obtenue dans des souris Wt NT. La Figure II-22b représente les individus qui composent ces moyennes. Nous constatons pour le cortex, la répartition suivante : 45% pour la forme immature, 25% pour l'homodimère mature et 30% pour le monomère de forme mature alors que dans le striatum nous avons la répartition suivante : 9%, 64% et 27% (respectivement pour la forme immature, le dimère et le monomère). Le profil de l'hippocampe est le suivant : 23%, 54% et 22% toujours dans le même ordre. La Figure II-22c représente des photos de membranes représentatives de ces profils protéiques. Afin de quantifier ces , nous avons observé le ratio formes actives/forme inactive et les résultats sont présentés dans la Figure II-22d. Nous observons dans le cortex un ratio de 1,1, dans le striatum un ratio de 33,5, et dans l'hippocampe un ratio de 4,8. Ainsi, on constate donc que dans le cortex il y a autant de formes actives que de forme inactive. Dans le striatum, les formes actives sont largement prédominantes. L'hippocampe se retrouve entre le cortex et le striatum. Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que le cortex est une structure qui va transcrire et traduire du BDNF, d'où la présence importante de forme inactive. Contrairement au striatum qui a une très faible quantité de forme immature par rapport à la quantité de formes actives, confirmant le fait que le striatum est une structure qui nécessite mais ne produit que très peu de BDNF.

Afin d'observer quelles sont les conséquences de la mutation portée par les R6/2 et du traitement par P42TAT, nous allons observer le profil protéique des différentes conditions structures par structures.

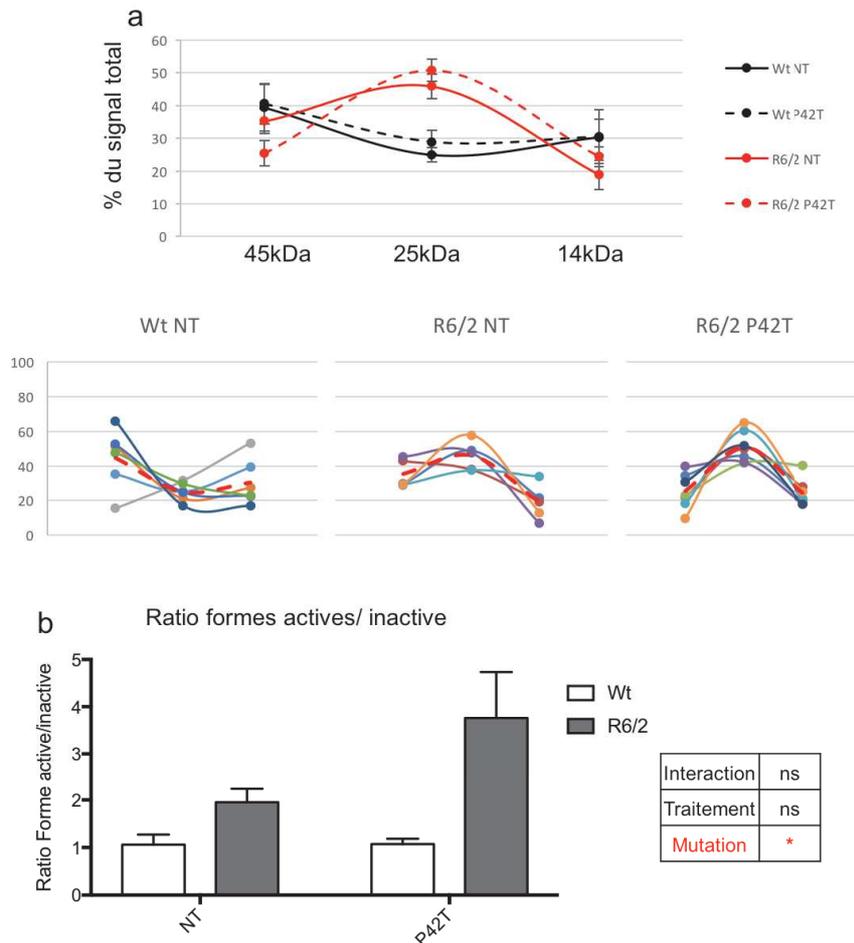
Pour le cortex, les résultats sont présentés dans la Figure II-23. Alors que nous observons un profil protéique de 45%, 25% et 30% pour les Wt NT, les R6/2 NT présentent un profil différent de 35%, 46% et 19%. Le traitement par P42T dans les R6/2 ne modifie pas fondamentalement ce profil (R6/2 P42T avec 25%, 51% et 24%) avec un profil qui reste très différent des Wt NT et relativement proche des R6/2 NT. Avec un profil de 41%, 29% et 30% les Wt P42T ne présentent pas de profil différent des Wt NT (Figure II-23a). Confirmé par un test « *three way anova* », nous avons confirmé que la mutation induisait une modification du profil protéique, mais pas le traitement.

En détail, nous notons que la mutation va favoriser l'augmentation de la forme homodimérisée au détriment principalement de la forme immature. Peu de différences sont notables entre les R6/2 NT et les R6/2 P42TAT.

Lorsque l'on regarde les ratios formes actives/inactive, on observe également une variation due à la mutation, avec une augmentation du taux de formes actives par rapport à la

forme inactive entre les R6/2 NT 1,96 et les R6/2 P42T 3,8 par rapport aux Wt NT 1,1 et aux Wt P42T 1,1 (Figure II-23b).

Figure II-23 Profil protéique du BDNF dans le cortex

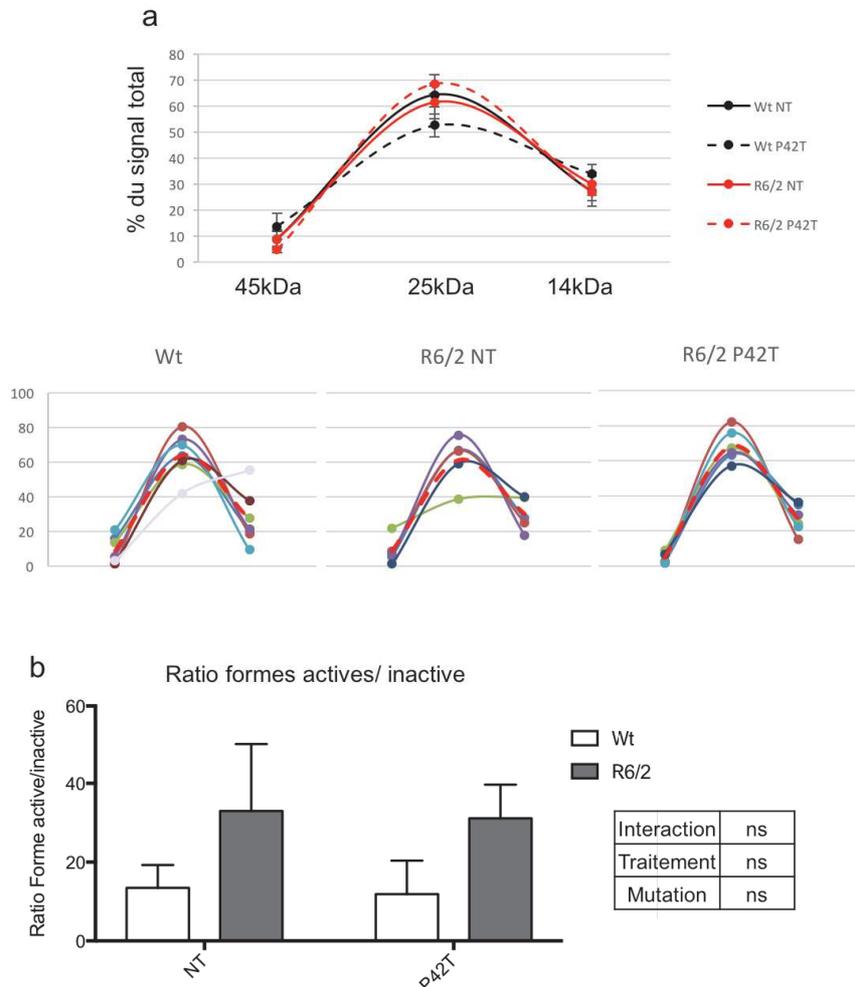


a- Représente les profils protéiques du BDNF dans le cortex de souris de plusieurs conditions, ainsi que les courbes individuelles de chaque souris dans chaque condition. b- Représente l'évolution du ratio formes actives/forme inactive. L'analyse statistique a été réalisé avec un Two-Way Anova. Variable mutation, $p^*=0,0106$, variable traitement, $p=0,1664$; interaction, $p=0,1713$.

Dans le striatum (Figure II-24a), nous notons les profils protéiques suivants : pour les Wt NT 9% , 64% et 27%, pour les Wt P42T 14%, 52% et 34%, pour les R6/2 NT 7%, 61% et 30% et pour les R6/2 P42T 5%, 68% et 27%. Aucune différence n'est notable entre les profils protéiques des différentes conditions. En ce qui concerne le ratio formes actives/forme inactive, nous notons pour les Wt NT 13,5, pour les Wt P42T 11,9, pour les R6/2 NT 27,1, et pour les R6/2 P42T 31,1. Statistiquement aucun effet n'est notable mais une tendance à

l'augmentation du ratio formes actives/inactive dans les souris R6/2 transparent (Figure II-24b).

Figure II-24 Profil protéique du striatum

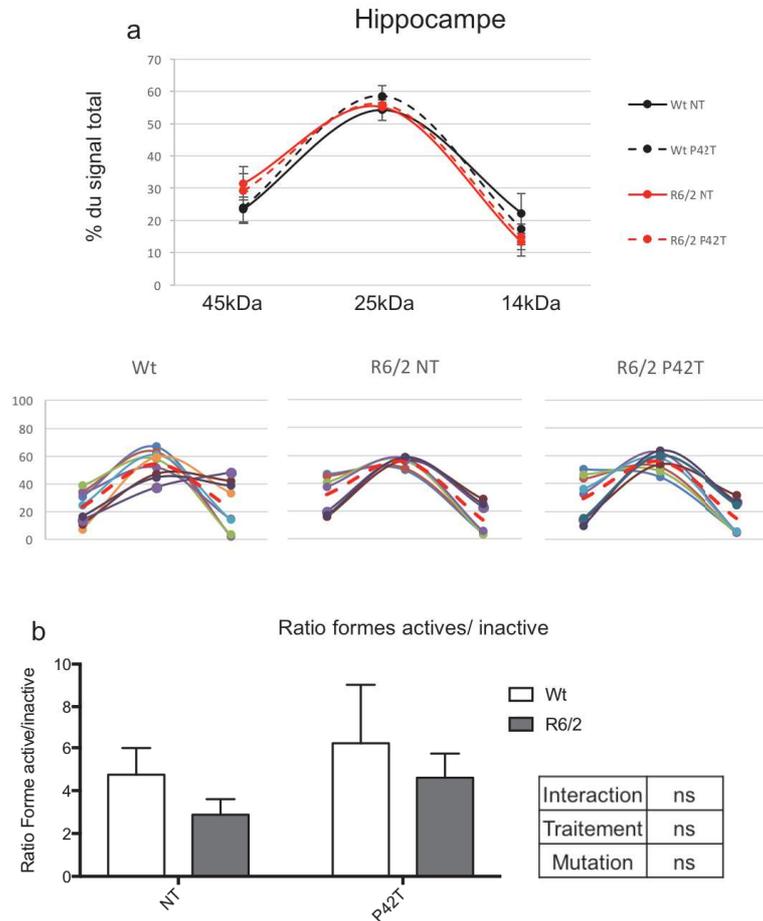


a- Représente les profils protéiques du BDNF dans le striatum de souris de plusieurs conditions, ainsi que les courbes individuelles de chaque souris dans chaque condition. b- Représente l'évolution du ratio formes actives/forme inactive. L'analyse statistique a été réalisée avec un Two-Way Anova. Variable mutation, $p=0,0873$, variable traitement, $p=0,8729$; interaction, $p=0,9901$.

Dans l'hippocampe (Figure II-25), nous observons les profils protéiques suivants : pour les Wt NT 23%, 54% et 22%, pour les Wt P42T 24%, 59% et 17%, pour les R6/2 NT 32%, 55% et 13% et pour les R6/2 P42T 29%, 56% et 15%. Statistiquement nous observons une différence induite par la mutation mais pas de différence induite par le traitement. Plus

précisément, on observe cette fois-ci une tendance à la diminution de ce ratio formes actives/forme inactive chez les souris R6/2 sans pour autant que cela ne soit significatif.

Figure II-25 Profil protéique du BDNF dans l'hippocampe



a- Représente les profils protéiques du BDNF dans l'hippocampe de souris de plusieurs conditions, ainsi que les courbes individuelles de chaque souris dans chaque condition. b- Représente l'évolution du ratio formes actives/forme inactive. L'analyse statistique a été réalisée avec un Two-Way Anova. Variable mutation, $p=0,3296$, variable traitement, $p=0,3692$; interaction, $p=0,9412$.

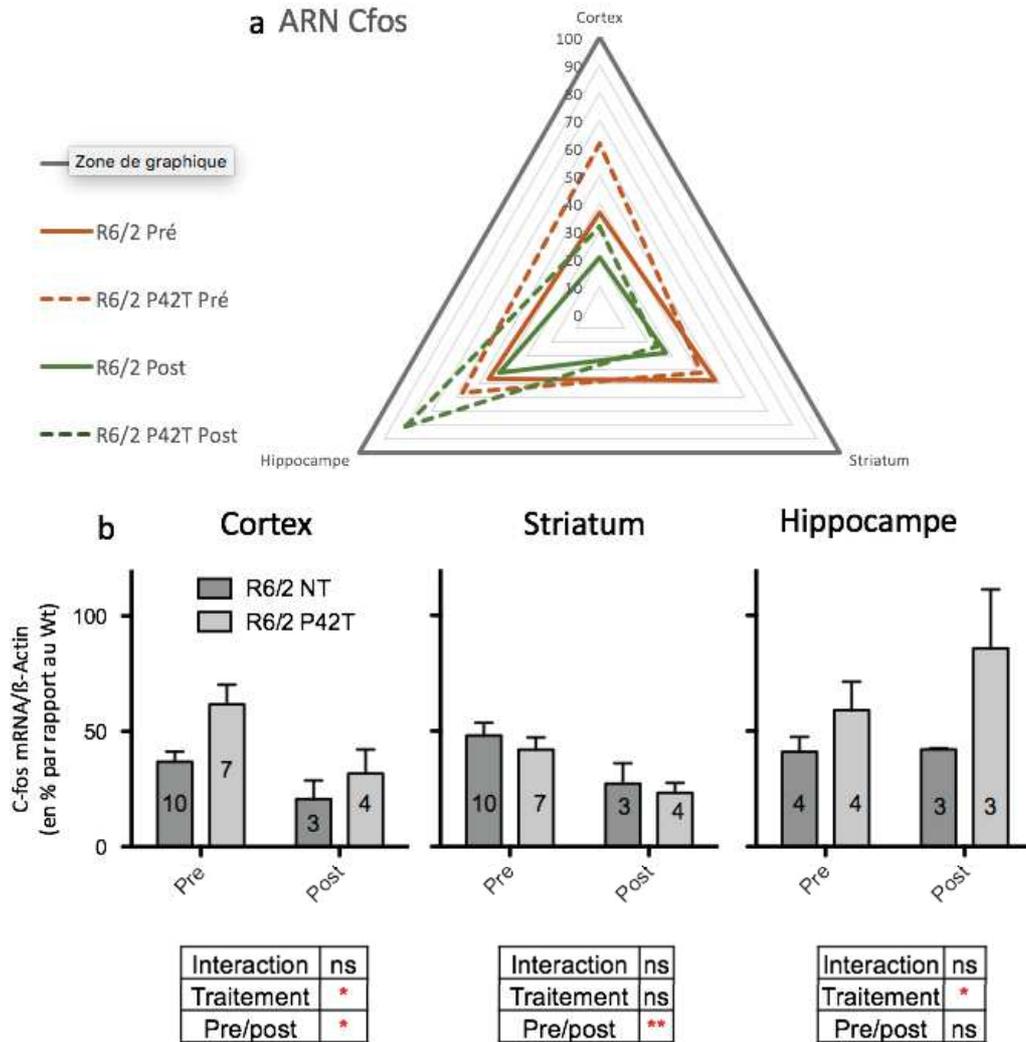
Pour résumer cette série de résultats, nous pouvons noter que la mutation portée par les R6/2 modifie le profil protéique du BDNF essentiellement dans le cortex. Le traitement par P42T n'a pas d'effet pouvant contrecarrer ces défauts. Ces données indiquent donc que bien que P42T agit sur la voie de signalisation du BDNF, il n'agit pas directement ni sur le taux, ni sur le profil protéique du BDNF.

II.1.7.2. Evolution de transcrits en aval de la voie BDNF/TrkB

Afin d'apporter plus d'éléments à l'hypothèse selon laquelle P42T faciliterait l'activation de la voie BDNF/TrkB, nous avons voulu observer l'effet que pourrait avoir P42T sur des transcrits dépendants de l'activation de cette voie. Pour cela, nous avons mesuré les taux de transcrits de C-fos, Rsk2, Rsk1 et DARPP32 mais également de p75 l'autre récepteur du BDNF, tous connus pour être dépendants de la voie BDNF/TrkB [6], [75], [179], [180].

La Figure II-26a résume les variations du taux de transcrits de C-fos en % par rapport au Wt NT dans les différents tissus. Contrairement à l'étude sur les profils protéiques, on observe des variations entre les deux cohortes pre et post. En revanche, au sein d'une même cohorte nous pouvons noter que dans le cortex, le traitement des R6/2 par P42T augmente le taux de transcrits C-fos (Pre : R6/2 NT 36,9%, et pour les R6/2 P42T 61,8%, de transcrits C-fos par rapport au Wt NT ; et Post : R6/2 NT 20,6% et pour les R6/2 P42T 31,8%). Nous notons de la même manière une augmentation du taux de transcrits C-fos dans l'hippocampe (Pre : R6/2 NT 41,0% ; R6/2 P42T 59,0% et Post : R6/2 NT 42,0% R6/2 P42T 85,7%. En revanche, dans le striatum aucun effet du traitement n'est statistiquement notable avec pour les R6/2 NT Pre 48,1% par rapport aux R6/2 P42T Pre 42,0% et pour les R6/2 NT Post 27,2% par rapport aux R6/2 P42T Post 23,3% (Figure II-26b).

Figure II-26 Taux de transcrits de C-fos



a- Représente les taux de C-fos dans différentes structures cortex, striatum et hippocampe, dans différentes conditions. Les taux sont normalisés par rapport à la β -tubuline et en % par rapport au Wt (gris, 100%). b- Evolution des taux de transcrits dans chaque structure normalisés par rapport au Wt (100%). Les analyses statistiques ont été réalisées avec un Two-Way Anova. Cortex : variable traitement, $p^*=0,0215$, variable Pre/post, $p^*=0,0368$; interaction, $p=0,8444$. Striatum : variable traitement, $p=0,1986$, variable Pre/post, $p^{**}=0,0099$; interaction, $p=0,8454$. Hippocampe : variable traitement, $p^*=0,0296$, variable Pre/post, $p=0,2963$; interaction, $p=0,2149$.

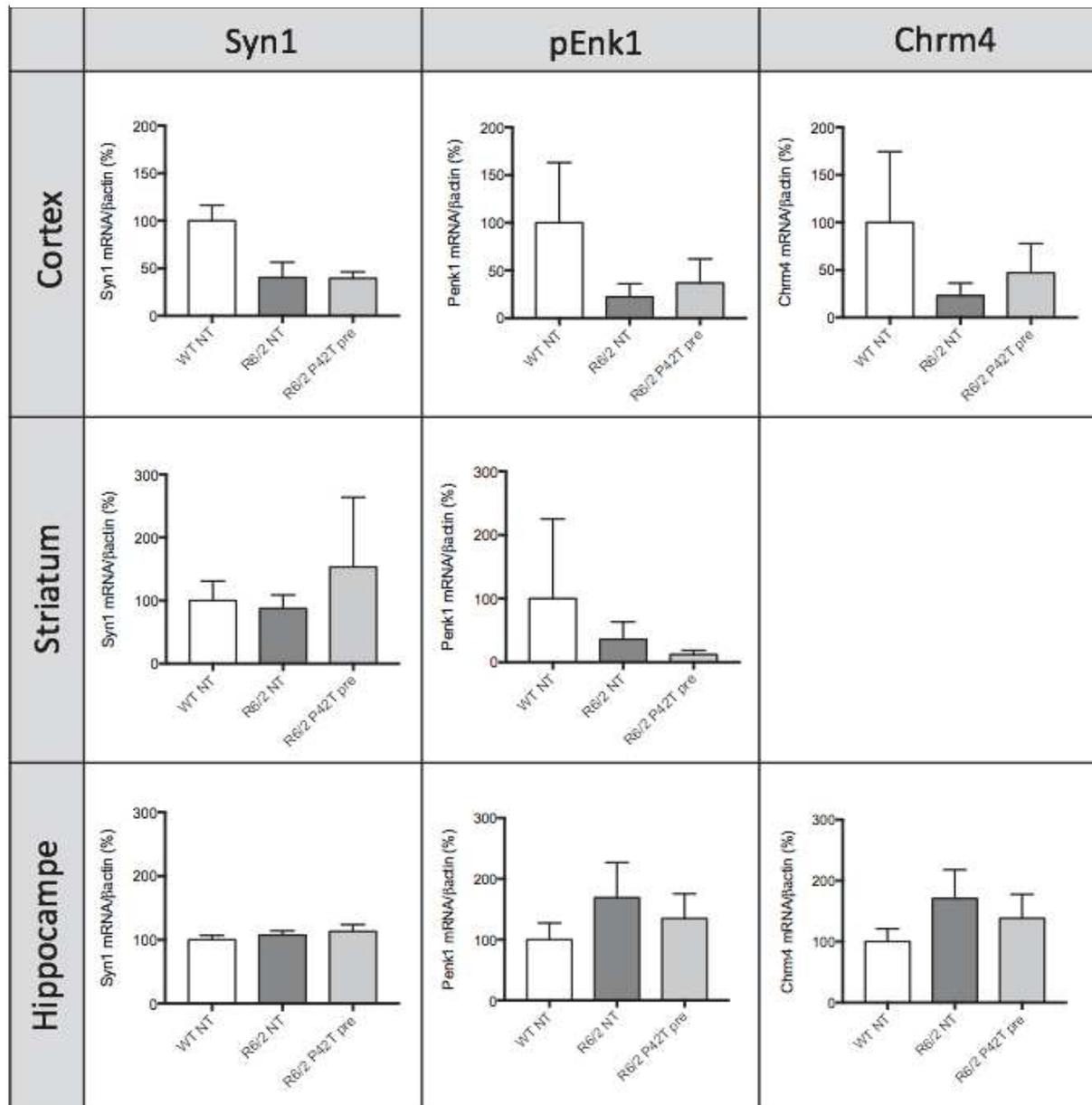
Ces résultats montrent une amélioration de la transcription de C-fos pour les deux traitements par P42T en pré- et post-symptomatique dans le cortex et l'hippocampe mais pas dans le striatum.

Les résultats des autres transcrits sont montrés dans Données supplémentaires 2. La variabilité de ces mesures ne permet pas de déduire si P42T a un effet sur ces taux de transcrits.

II.1.7.3. Evolution de transcrits en amont de la voie BDNF/TrkB

La transcription du BDNF est connue pour être régulée, entre autres par REST, *via* sa liaison sur la séquence RE1 localisée en aval de l'exon II codant pour le BDNF [6]. REST agit ainsi comme un répresseur transcriptionnel du BDNF. La Htt est capable de retenir REST dans le cytoplasme et ainsi favorise la transcription du BDNF. Néanmoins, en condition de MH, la mHtt n'est plus capable de retenir REST dans le cytoplasme, entraînant l'entrée de REST dans le noyau et l'inhibition de la transcription du BDNF. L'interaction REST/RE1 est également responsable de la transcription de plusieurs autres gènes, dont synapsin1 (Syn1), proenkephaline1 (pEnk1), et cholinergic receptor muscarinic 4 (Chrm4) [92], [93]. Afin de savoir si l'augmentation du taux de transcrits BDNF par P42T passe par un effet sur REST/RE1, nous avons analysé les taux de transcrits de ces différents gènes cibles. Les résultats sont présentés dans la Figure II-27. Aucune différence n'est statistiquement notable que ce soit entre les Wt et les R6/2 NT mais également entre les R6/2 NT et les R6/2 P42T. Ces résultats sont néanmoins à confirmer au vu du faible nombre d'individus étudié dans chaque condition. Seulement la cohorte Pré est présentée et pour des raisons techniques les résultats de la cohorte Post ont une trop grande variation.

Figure II-27 Taux de transcrits des cibles de REST



n=3-4

Les taux de plusieurs autres transcrits ont également été observés dans le cortex, le striatum et l'hippocampe. *Syn1* (synapsine 1), *pEnk1* (pro-énképhaline 1), *Chrm4* (Récepteur cholinergique muscarinique M4). Normalisé par rapport à la β -tubuline et montré en % par rapport aux taux présents chez les souris *Wt* (100%). L'analyse statistique a été réalisée avec des tests de Mann-Whitney, mais aucune différence significative n'a été observée. Les données pour *Chrm4* dans le striatum ne sont pas disponibles car le nombre de valeur est inférieur à 3.

II.1.8. Conclusions

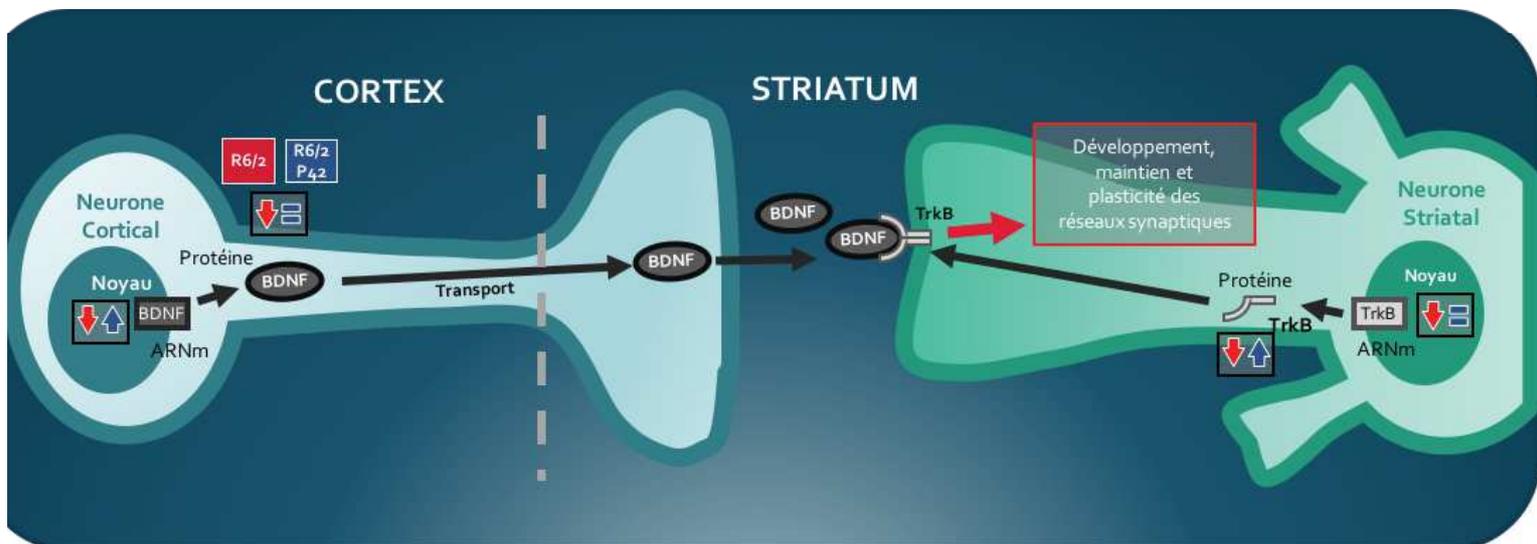
Tous ces résultats nous ont permis de mieux identifier les mécanismes d'action de P42.

Tout d'abord, P42 semble agir même lorsqu'il est utilisé à des stades avancés de la MH. Nous observons notamment des effets protecteurs sur des phénotypes comportementaux comme la coordination motrice, l'anxiété, la mémoire mais également sur des phénotypes comme la taille des ventricules. Ces effets positifs ne sont pas corrélés à une diminution des agrégats dans le cerveau des souris, ce qui suggère que l'action de P42 ne passe pas exclusivement par une inhibition du phénomène d'agrégation. Ces effets positifs sont par contre corrélés à une amélioration de la voie BDNF/TrkB le long de l'axe corticostriatal. En effet, nous avons observé d'un point de vue biochimique que P42 est capable de rétablir certains taux de transcrits ou de protéines du BDNF et de TrkB le long de cet axe corticostriatal.

L'application de P42 nous a aussi permis de trouver des similitudes entre son action et celle du BDNF, de plus les études électrophysiologiques montrent que l'effet de P42 porte avant tout sur l'élément post-synaptique, ce qui pourrait être corrélé avec l'effet plus direct sur TrkB, que nous avons pu identifier.

La Figure II-28 schématise la liaison corticostriatale et quelques-uns des différents résultats présentés dans cette partie.

Figure II-28 Schéma de conclusion



Le schéma représente la liaison corticostriatale. En bleu est représenté un neurone cortical. En vert est représenté un neurone striatal. Les protéines BDNF (ovales noirs) et TrkB (demi-pinces grises) sont représentés. L'ARNm du BDNF (rectangle noir) et de TrkB (rectangle gris) sont également représentés. Les flèches en rouge représentent les variations des taux observés chez les souris R6/2 NT par rapport aux souris Wt NT. Les flèches et les signes égaux en bleu représentent les variations des taux observés chez les souris R6/2 P42T par rapport au souris R6/2 NT.

Partie 2. P42 et transport vésiculaire

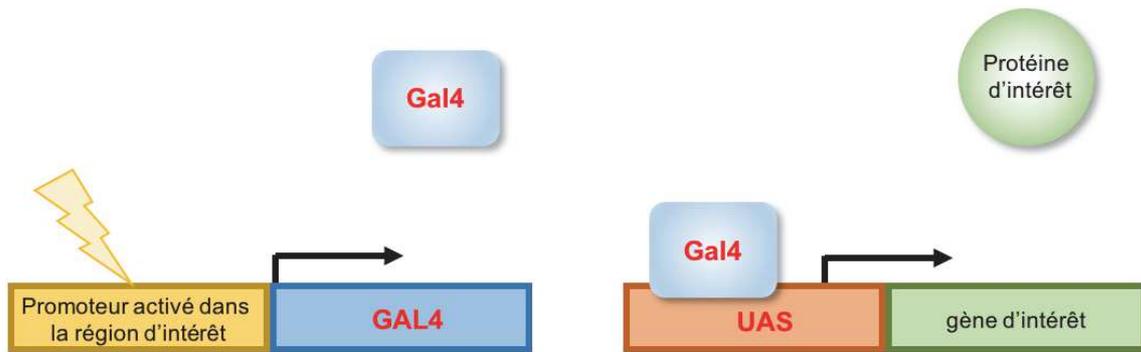
Dans la partie précédente nous avons pu observer comment P42, un fragment de la Htt, pouvait agir sur les taux de transcrits et de protéines du BDNF et de TrkB en particulier dans le cortex et le striatum que ce soit en condition physiologique ou en condition pathologique de MH. Or, la Htt agit également sur le transport de vésicules [127]. Dans cette partie nous allons analyser l'effet de P42 sur le transport vésiculaire dans les motoneurons de drosophiles et en particulier le transport de l'homologue de BDNF dans la drosophile : DNT1.

II.2.1. Effet de P42 sur le transport de DNT1

La Htt a un rôle dans le transport de vésicules et notamment sur le transport de BDNF [81]. Comme le montre entre autres, Weiss *et al* [181] la drosophile est un bon modèle pour analyser l'état du transport vésiculaire en condition pathologique de MH. Arribat *et al* [27] montrent chez la drosophile que l'expression de P42 est capable de restaurer le transport de NPY (neuropeptide-Y) altéré par l'expression d'une mHtt. Plusieurs études ont décrit le transport de différents cargos en condition de MH, et ont noté que la Htt peut agir à différents niveaux : sur le transport lui-même mais également sur l'attachement, ou le recrutement de vésicules cargos sur les protéines motrices [82]–[84], [87]. Nous avons donc voulu observer plus précisément ce que pouvait avoir comme effet P42 sur les vésicules de BDNF en particulier. Zhu *et al* [182] ont identifié un homologue du BDNF chez la drosophile : DNT1 pour *Drosophila* Neurotrophin1. Aussi, nous avons décidé d'analyser l'état du transport et du recrutement de l'homologue du BDNF, DNT1 en condition de MH chez la drosophile. Pour cela, nous avons utilisé le système UAS-GAL4 issu de la levure [183]. Ce système UAS-GAL4 permet d'exprimer une protéine d'intérêt dans une région spécifique.

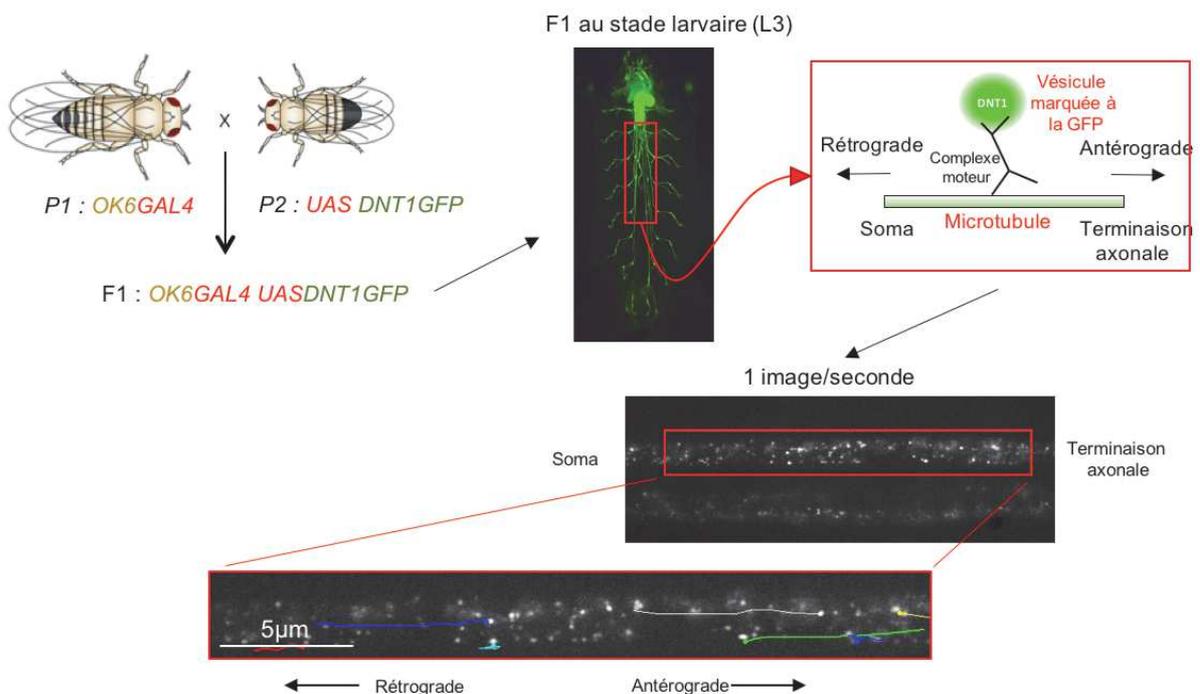
En effet ; Gal4 est un facteur de transcription se fixant au motif UAS [183]. L'insertion du gène GAL4 dans le génome de la drosophile sous le contrôle d'un promoteur endogène permet d'activer sa transcription. Le motif UAS est le site de reconnaissance du transactivateur Gal4. Lors de l'expression de GAL4, si une drosophile contient dans son génome un transgène sous contrôle des séquences UAS, ce transgène sera exprimé (Figure II-29).

Figure II-29 Système GAL4-UAS



Par exemple dans notre cas en utilisant des mouches double transgéniques ayant à la fois un transgène GAL4 sous contrôle du promoteur OK6, un promoteur activé spécifiquement dans les motoneurones de larve au stade L3 de drosophile et un transgène codant pour DNT1 marqué à la GFP sous contrôle des séquences UAS, nous obtenons des larves de drosophiles exprimant DNT1GFP dans les motoneurones des larves (Figure II-30). Ceci nous permettra de suivre le déplacement de vésicules contenant DNT1 le long des axones des motoneurones.

Figure II-30 Transport axonal

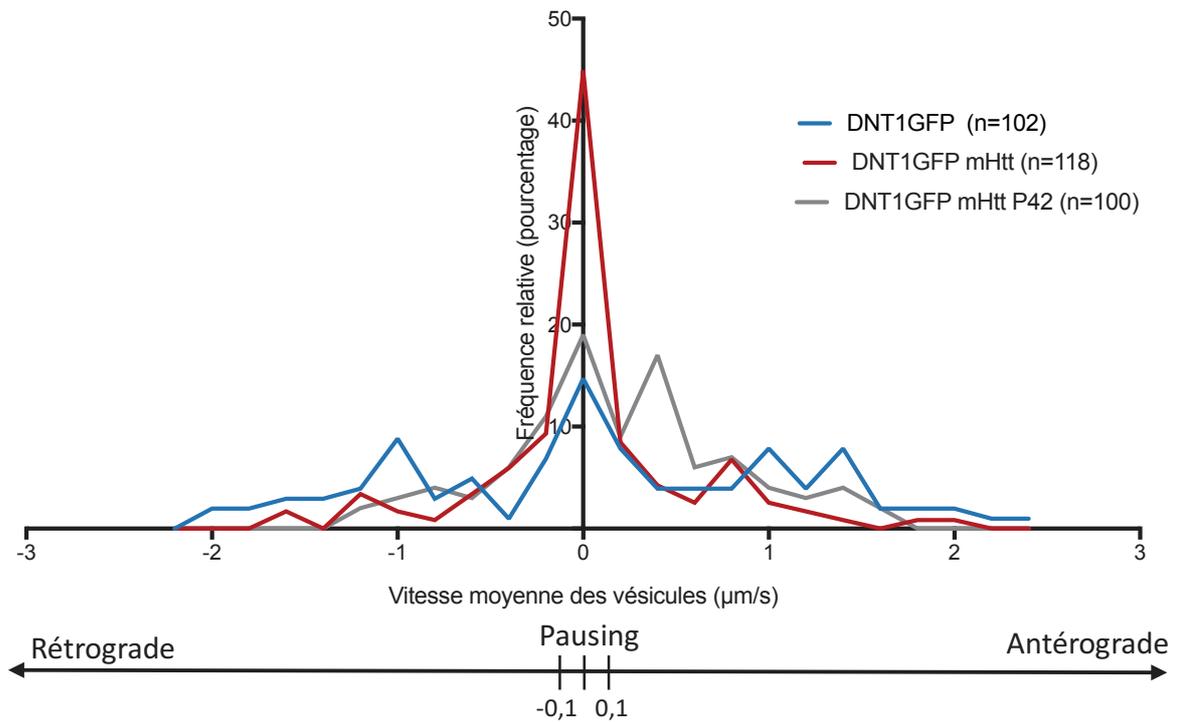


En utilisant ce système UAS-GAL4, nous avons généré différentes souches qui expriment d'autres protéines, en plus de DNT1GFP le long des motoneurones. Pour cela, nous avons utilisé deux souches, une exprimant une Htt de 171 acides aminés couvrant l'exon 1 humain et le premier domaine HEAT et contenant 136Q (mHtt) et une co-exprimant cette mHtt plus P42 (mHtt P42), les transgènes mHtt et P42 étant placés également sous contrôle des séquences UAS. Nous avons pu ainsi observer l'état du transport de DNT1GFP en condition physiologique, en condition de MH et en condition de MH en présence de P42.

II.2.1.1. Effet de P42 sur la vitesse et le sens du déplacement de DNT1

Les résultats sur la cinétique du transport sont présentés dans la Figure II-31. Cette figure représente la distribution des vésicules selon leur vitesse. Les vitesses négatives représentent des déplacements rétrogrades, les vitesses positives représentent des déplacements antérogrades. Environ 10 vésicules ont été suivies dans 10 larves différentes. Les vésicules sont comptées comme étant en « pausing » quand elles ont une vitesse comprise entre $-0,1\mu\text{m/s}$ et $0,1\mu\text{m/s}$. En bleu est représenté le transport en condition physiologique, en rouge le transport en condition de MH, et en noir la distribution en condition de MH avec P42.

Figure II-31 Distribution des vésicules selon leur vitesse



Les distributions dans les différentes conditions ont été comparées et analysées statistiquement avec un test de Kolmogorov-Smirnov. $DNT1GFP$ vs $DNT1GFPmHtt$, $p^{**}=0,0084$; $DNT1GFPmHtt$ vs $DNT1GFPmHttP42$, $p^{***}=0,0008$; $DNT1GFP$ vs $DNT1GFPmHttP42$, $p^*=0,0431$. Avec une vitesse absolue inférieure à $0,1\mu\text{m/s}$, la vésicule est en « Pausing » et ceci correspondant à un état relativement stationnaire.

Cette figure nous permet d'observer un changement de distribution de la vitesse des vésicules, confirmé par un test Kolmogorov-Smirnov. On observe en particulier une augmentation du nombre de vésicules à l'état stationnaire ou de « pausing » en présence de mHtt au détriment des déplacements antérograde et rétrograde. On peut également observer les variations dans le transport à l'aide de Kymographes comme présentés dans la Figure II-32.

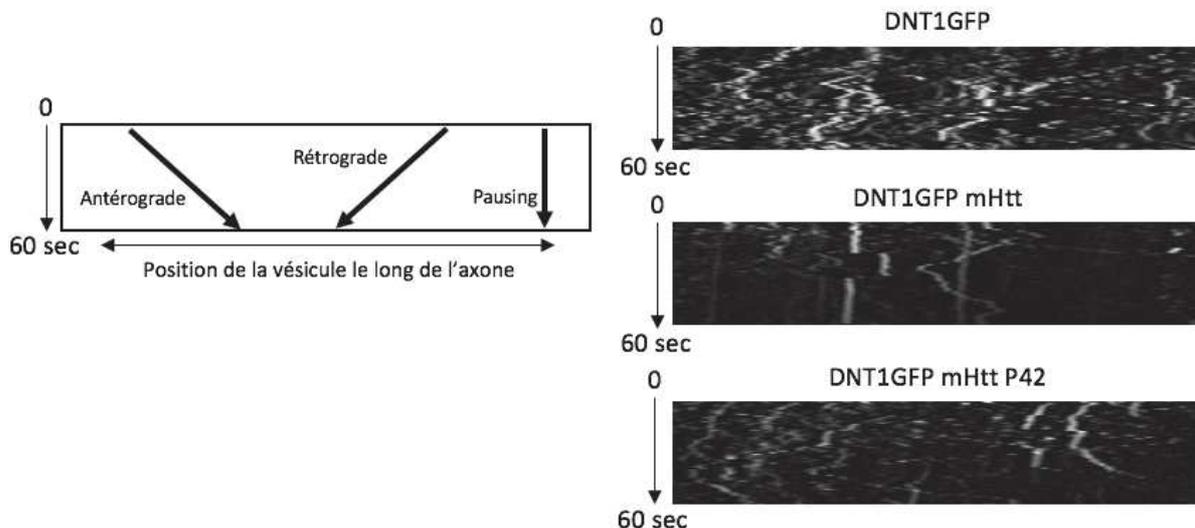
Figure II-32 Kymographes

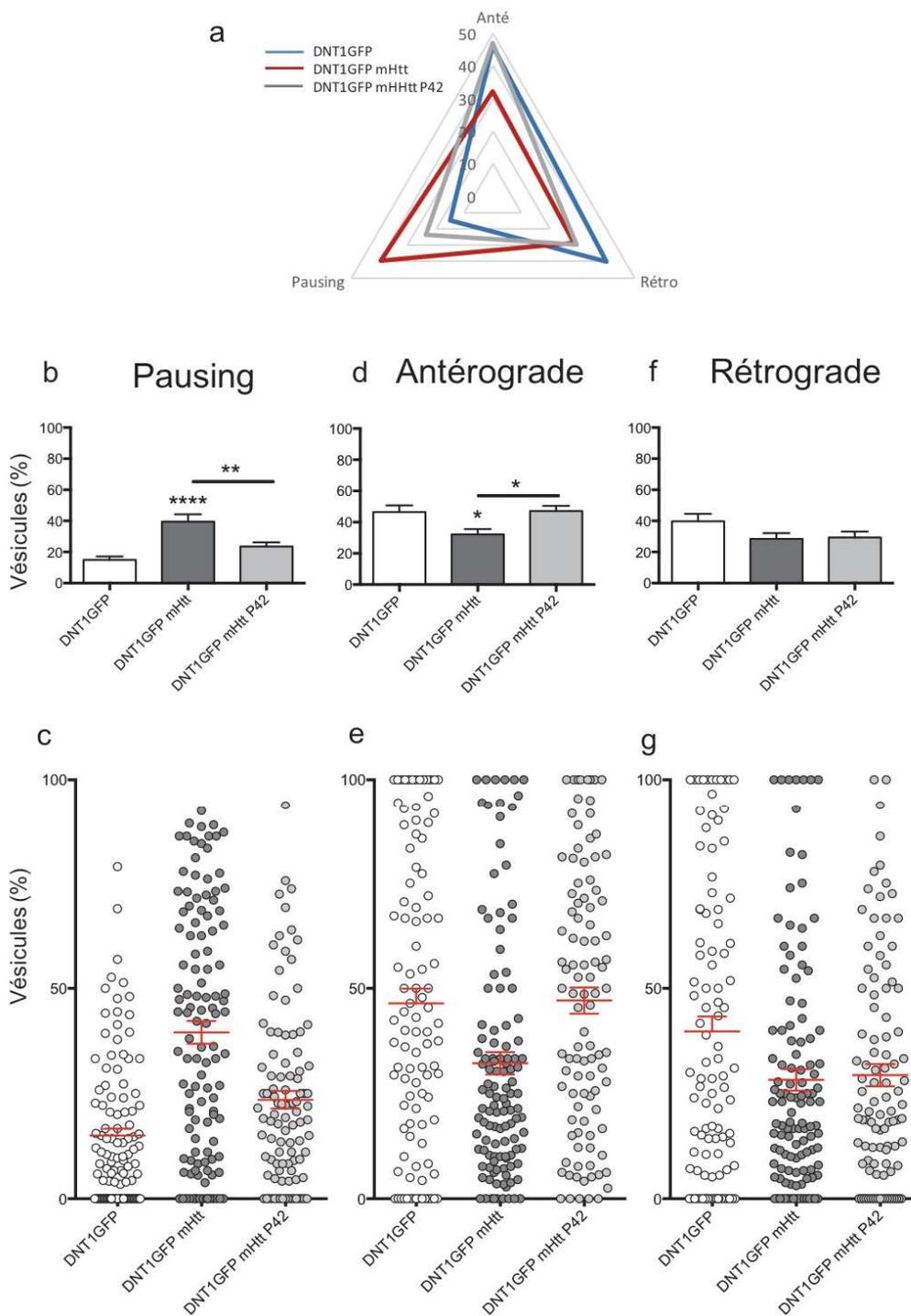
Figure II-32. Les kymographes permettent d'observer sur une image les mouvements des vésicules sur une partie de l'axone au cours du temps.

Sur cette figure on observe à la fois qu'avec l'expression de mHtt il y a une augmentation du nombre de vésicules en pause, et à la fois que la coexpression avec P42 de cette même mHtt permet de rétablir le transport de DNT1.

Afin de mieux comprendre si P42 agissait plus sur la vitesse de transport ou sur son orientation antérograde/rétrograde, nous avons analysé ces deux paramètres de manière indépendante. Ainsi, dans la Figure II-33a on observe la répartition des mouvements antérogrades, rétrogrades ou en pause dans les 3 conditions. Les Figure II-33b, d et f représentent les histogrammes et les différences significatives, les Figure II-33c, e, et g représentent la distribution des vésicules, chaque rond correspondant à une vésicule. On observe qu'en condition de MH le nombre de vésicules en pause est beaucoup plus important (39,5%) qu'en condition physiologique (15,0%). Tandis que lors de l'expression de P42, en plus de la mHtt, permet de diminuer de manière significative cet effet (23,5%). Les mouvements antérogrades sont diminués en condition de MH (24,7%) par rapport au contrôle (46,4%) alors que l'expression de P42 restaure complètement ce type de transport (47,1%). En revanche, pour les mouvements rétrogrades, bien que l'expression de l'exon 1 de la Htt avec 136Q diminue la proportion de vésicules effectuant ce mouvement (28,4%) par rapport au contrôle (37,79%), on observe aucun effet positif de P42 sur ce type de mouvement (29,37%). On peut donc conclure que l'expression de mHtt inhibe le transport antérograde et rétrograde de DNT1, ce qui augmente la quantité de vésicules à l'arrêt. De plus, de manière

intéressante on note que P42 semble permettre de restaurer le transport antérograde mais pas le transport rétrograde également affecté en contexte de MH, montrant ainsi une spécificité d'action sur le transport de DNT1, ce qui n'avait pas été détecté dans le cas des vésicules NPY.

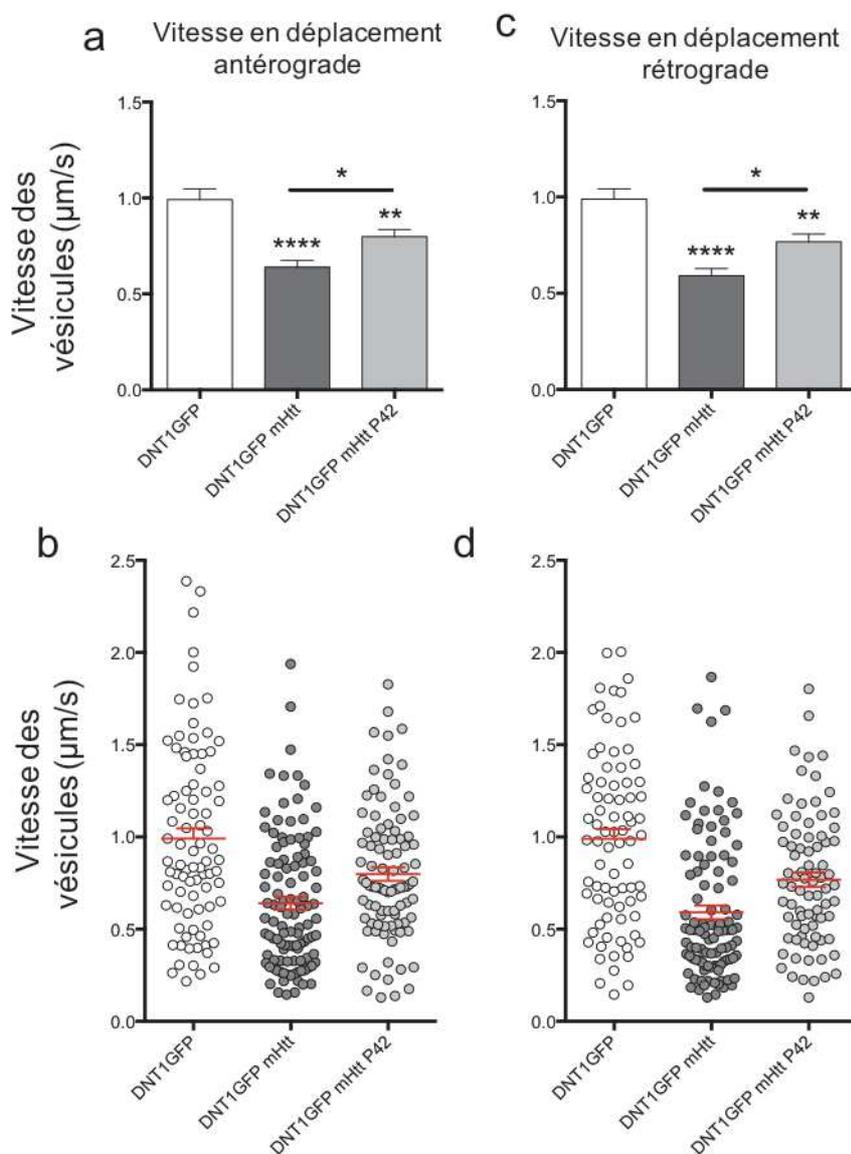
Figure II-33 Effet de P42 sur le déplacement des vésicules DNT1



a-Représentation de la répartition des différents états de déplacement des vésicules : mouvement antérograde/ mouvement rétrograde/pausing des vésicules dans les différentes conditions (DNT1GFP, DNT1GFP mHtt et DNT1GFP mHtt P42). *b,d,f* montrent le % de temps passé par les vésicules contenant DNT1GFP le long des motoneurones, soit en pausing (*b*), soit effectuant un mouvement antérograde (*d*) soit rétrograde (*f*) en fonction des différentes conditions. *c,e,g* Répartition des vésicules présentait dans *b,d,f*. Les analyses statistiques ont été réalisées avec un One-Way ANOVA. Pausing : DNT1GFPvsDNT1GFPmHtt, $p^{****}<0,0001$; DNT1GFPmHttvsDNT1GFPmHttP42, $p^{**}=0,0098$. Antérograde : DNT1GFPvsDNT1GFPmHtt, $p^*=0,012$; DNT1GFPmHttvsDNT1GFPmHttP42, $p^*=0,022$; Rétrograde : aucune différence significative observée.

Nous avons également observé la vitesse de déplacement des vésicules lors des mouvements antérogrades et rétrogrades (Figure II-34). Ce que l'on observe, que ce soit pour les mouvements antérogrades ou rétrogrades, est une diminution de la vitesse de déplacement en condition pathologique, respectivement de $0,64\mu\text{m/s}$ et de $0,59\mu\text{m/s}$, par rapport à ce que l'on observe en condition physiologique $0,99\mu\text{m/s}$ et $0,99\mu\text{m/s}$. L'expression de P42 permet de restituer partiellement des vitesses de déplacement plus normales, avec une vitesse antérograde de $0,80\mu\text{m/s}$ et une vitesse rétrograde de $0,77\mu\text{m/s}$.

Figure II-34 Effet de P42 sur la vitesse des vésicules DNT1



a,c- Vitesse de déplacement ($\mu\text{m/s}$) des vésicules en fonction du sens de déplacement antérograde (a) ou rétrograde (c) dans les différentes conditions. b,d Répartition des échantillons de chaque moyenne présentaient dans a,c. Les analyses statistiques ont été réalisées avec un One-Way ANOVA. Vitesse antérograde :

DNT1GFPvsDNT1GFPmHtt,

*p****<0,0001 ;*

DNT1GFPmHttvsDNT1GFPmHttP42,

p=0,018 ;*

DNT1GFPmHttP42vsDNT1GFP,

*p**=0,0045. Vitesse rétrograde :*

DNT1GFPvsDNT1GFPmHtt,

*p****<0,0001 ;*

DNT1GFPmHttvsDNT1GFPmHttP42,

p=0,021 ;*

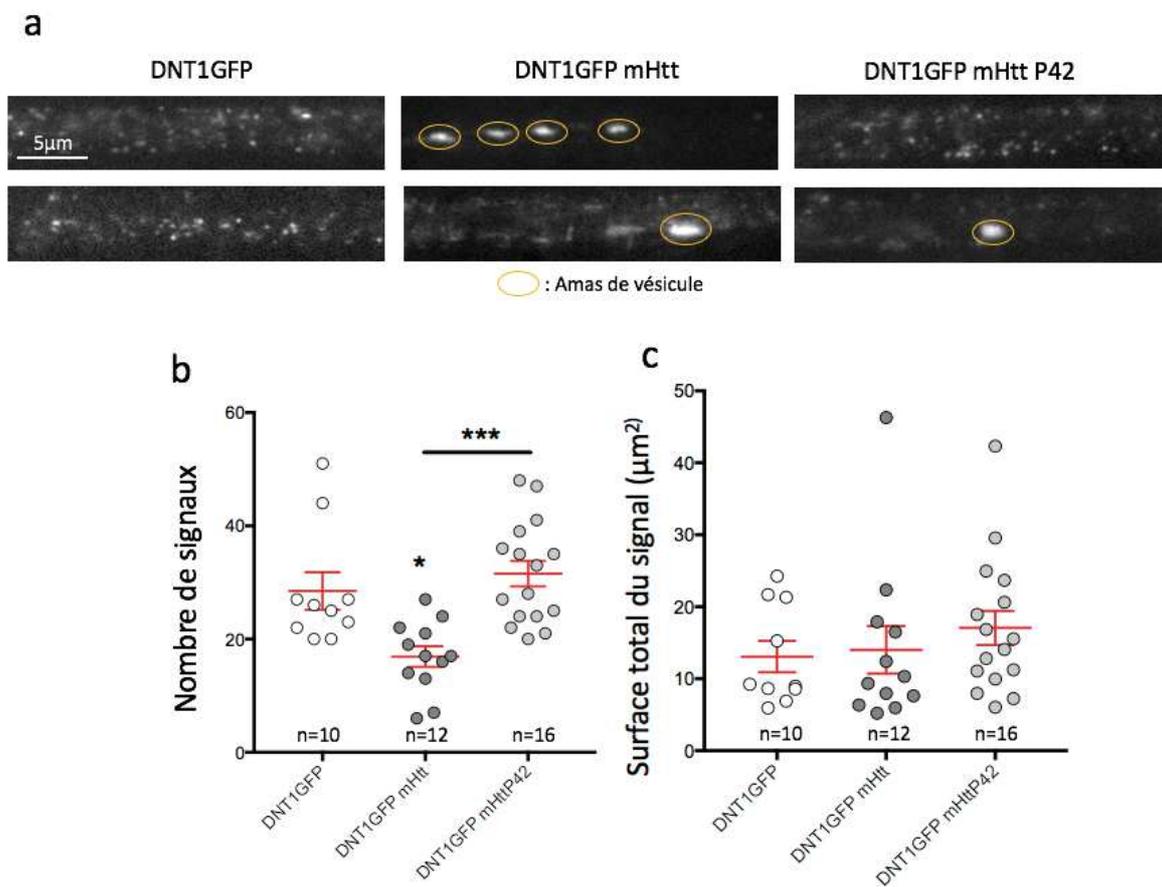
DNT1GFPmHttP42vsDNT1GFP,

*p**=0,0026.*

II.2.1.2. Effet de P42 sur le nombre de vésicules de DNT1 le long des microtubules

Précédemment [28], notre équipe a observé deux phénotypes pathologiques dans les axones lors de l'expression de mHtt : une diminution du nombre de vésicules de NPYGFP et une formation d'amas de vésicules NPYGFP colocalisées avec mHtt. Ces phénotypes pathologiques disparaissent avec l'expression de P42 [28]. J'ai également analysé comment varient ces paramètres avec DNT1GFP. Les photos et les graphiques représentant ces expériences sont montrés dans la Figure II-35.

Figure II-35 Effet de P42 sur le nombre de vésicules DNT1GFP



a-Photo représentant deux axones dans chaque condition. En jaune est entouré les amas de vésicules. Les analyses statistiques ont été réalisées avec un One-Way ANOVA. b-Quantification du nombre de signaux observés sur la première image de chaque films pour chaque axones : DNT1GFPvsDNT1GFPmHtt, $p^*=0,031$; DNT1GFPmHttvsDNT1GFPmHttP42, $p^{***}=0,0014$. c-Quantification de la surface du signal (µm²) : aucune différence significative n'est notée.

Tout d'abord, nous avons analysé le long des axones sur une portion de 35 μ m, le nombre de signaux individuels, reflétant le nombre de vésicules. J'ai pu noter qu'en condition de MH le nombre de vésicules transportant DNT1 diminue. En effet, il y a en condition physiologique en moyenne 28,5 vésicules alors qu'en condition de MH il y a 17,0 vésicules. Avec P42, on retrouve des valeurs similaires à ce que l'on observe en condition physiologique, avec 31,6 vésicules en moyenne (Figure II-35b). Néanmoins, ces signaux individuels sont composés de vésicules individuelles mais également d'amas de vésicules ne comptant que pour une unité, sans pondération. Or, les amas sont constitués de plusieurs vésicules. Pour pallier à ce problème, nous avons donc mesuré également la surface totale du signal. Ce que nous observons est que la surface totale du signal est la même dans toutes les conditions que ce soit en conditions sauvages, mutantes ou mutantes avec P42, avec respectivement des valeurs de 13,1 μ m², 14,0 μ m² et 17,1 μ m² (Figure II-35c). Ceci montre, premièrement, que la mutation semble non pas diminuer le nombre de vésicules de DNT1GFP le long des axones mais entraîner des déficits au niveau de leur transport, entraînant la formation d'amas de vésicules, visibles sur la Figure II-35a. Et deuxièmement, P42 a un effet non pas sur le recrutement mais bien sur le transport des vésicules et permet notamment d'inhiber le phénomène d'amas de vésicules observé lors de l'expression de mhHtt.

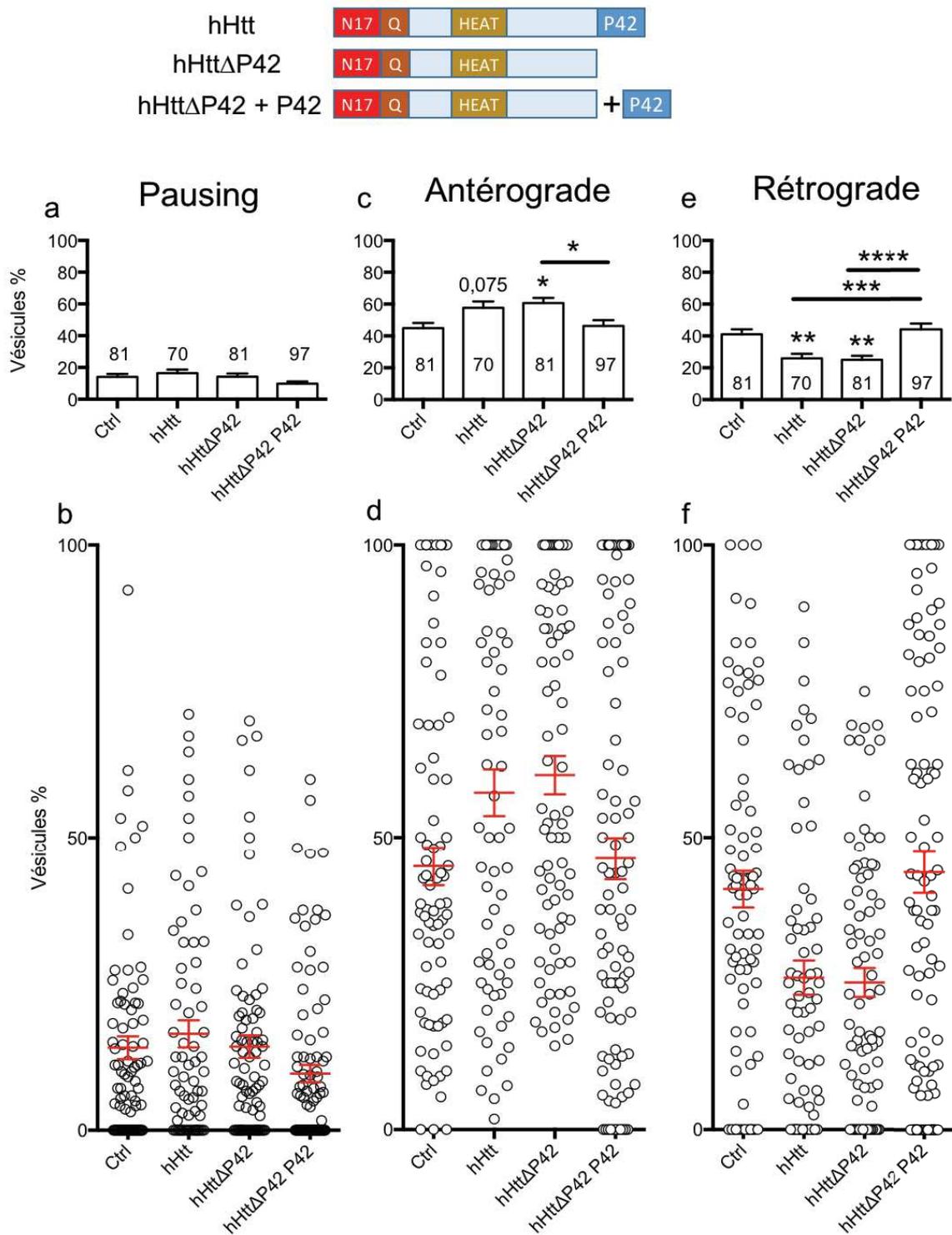
Pour conclure, nous avons pu montrer qu'en condition pathologique de MH, le transport de DNT1, l'homologue du BDNF, était altéré et que la présence de P42 permettait de rétablir ce transport.

II.2.2. Effet de P42 sur le transport en condition physiologique

Précédemment, on a montré que l'expression de hHtt chez la drosophile entraîne une augmentation du nombre de vésicules le long de l'axone [27]. Afin de comprendre comment P42 pouvait agir sur le transport axonal, j'ai également réalisé une série d'expériences axée autour de l'expression de différentes formes de hHtt présentant ou non P42.

Pour cela j'ai observé le transport de NPYGFP le long des axones dans différentes conditions, en exprimant différentes formes de la Htt (Figure II-36). J'ai analysé le transport soit avec l'expression d'une hHtt de 548aa, contenant la séquence correspondante à P42, soit avec l'expression d'une hHtt de 548aa moins les 23 acides aminés correspondant à P42 (hHtt Δ P42) soit avec la coexpression de hHtt Δ P42 et P42. Les différentes hHtt étaient toutes avec des polyQ inférieure à 36Q. Les résultats sont présentés dans la Figure II-36.

Figure II-36 Effet de la présence ou l'absence de P42 dans la hHtt sur le transport de vésicules NPY

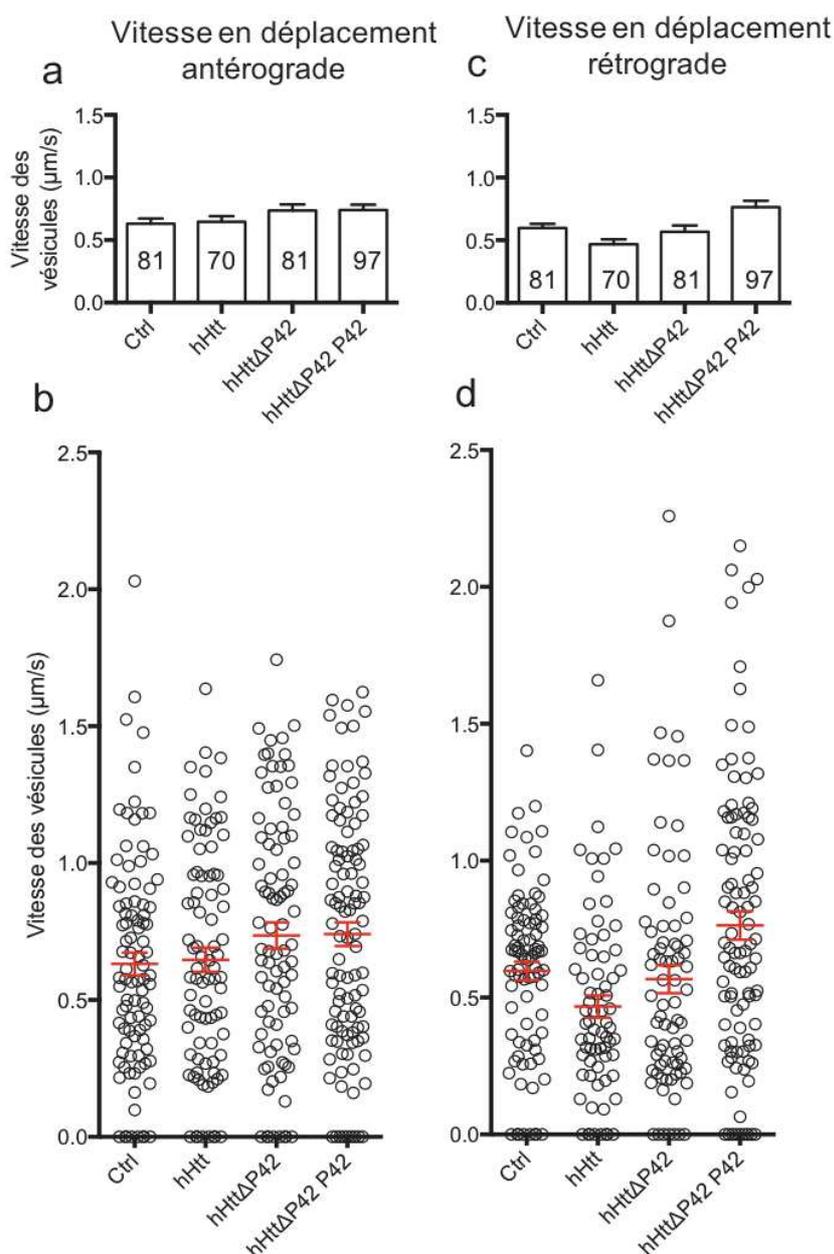


Représentation des différentes formes de Htt exprimées en plus de NPYGFP. Ctrl représente la condition contrôle avec seulement l'expression de NPYGFP. a,c,e montrent le % de temps passé par les vésicules contenant NPYGFP le long des motoneurones soit en pausing (a), soit effectuant un mouvement antérograde (c) soit rétrograde (e) en fonction des différentes conditions. b,d,f Répartition des vésicules présentait dans a,c,e. Les analyses statistiques ont été réalisées avec un One-Way ANOVA. Pausing : Aucune différence n'est notée. Mouvement antérograde : CtrlvshHtt, $p=0,075$; CtrlvshHttΔP42, $p^*=0,041$; hHttΔP42vshHttΔP42 P42, $p^*=0,028$. Mouvement rétrograde : CtrlvshHtt, $p^{**}=0,0087$; CtrlvshHttΔP42, $p^{**}=0,0075$; hHttvshHttΔP42 P42, $p^{***}=0,0012$; hHttΔP42vshHttΔP42 P42, $p^{****}<0,0001$.

Nous observons que le nombre de vésicules en pause n'est pas affecté par la présence de hHtt, peu importe la forme. En revanche, alors que les vésicules se déplacent normalement dans un mouvement antérograde dans 45,0%, cette proportion est augmentée en présence de hHtt (57,7%) et hHttΔP42 (60,1%). Inversement comme attendu, on trouve que la proportion de mouvement rétrograde est plus petite avec l'expression de hHtt (25,9%) et hHttΔP42 (25,1%) par rapport au contrôle (40,1%). En revanche, lors de la co-expression de hHttΔP42 et P42 l'effet qu'avait hHttΔP42 est bloqué et les proportions de mouvements antérogrades et rétrogrades retournent à des valeurs contrôles (respectivement 46,3% et 44,1%).

En revanche, nous n'observons pas d'effet significatif de la Htt normale (avec ou sans P42) sur la vitesse de déplacement des vésicules (Figure II-37).

Figure II-37 Effet de la présence ou l'absence de P42 dans la hHtt sur la vitesse de vésicules NPY

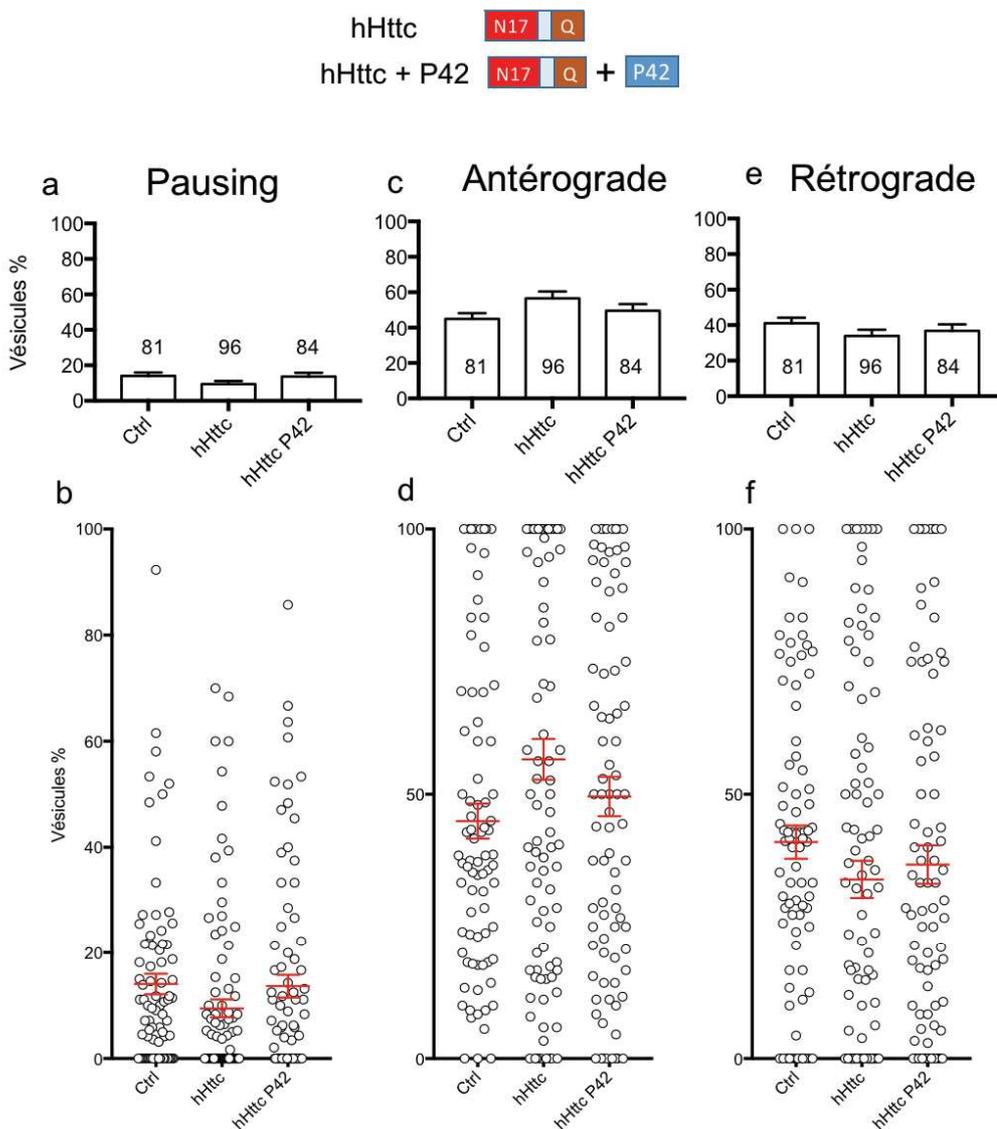


a,c- Vitesse de déplacement (μm/s) des vésicules en fonction du sens de déplacement antérograde (a) ou rétrograde (c) dans les différentes conditions. b,d Répartition des échantillons de chaque moyenne présentait dans a,c. Les analyses statistiques ont été réalisées avec un One-Way ANOVA. Vitesse antérograde : aucune différence n'est observée. Vitesse rétrograde : aucune différence n'est observée.

Ces résultats semblent nous montrer que l'expression hHtt et hHtt Δ P42 chez la drosophile est capable de déséquilibrer le ratio mouvement antérograde/mouvement rétrograde au profit du mouvement antérograde. En revanche, la présence de P42 seul bloque ces effets. Deux hypothèses peuvent être émises, soit P42 interagit avec la hHtt et empêche son effet, soit P42 interagit avec la cible de la hHtt, éventuellement le complexe moteur, et empêche l'effet de la hHtt.

De manière intéressante nous avons également observé l'effet que pouvait avoir une hHtt courte (hHttc) de 171aa sans P42 et sans domaine HEAT. Les résultats sont observés dans la Figure II-38.

Figure II-38 Effet de la présence ou l'absence de P42 dans la hHttc sur le transport de vésicules NPY

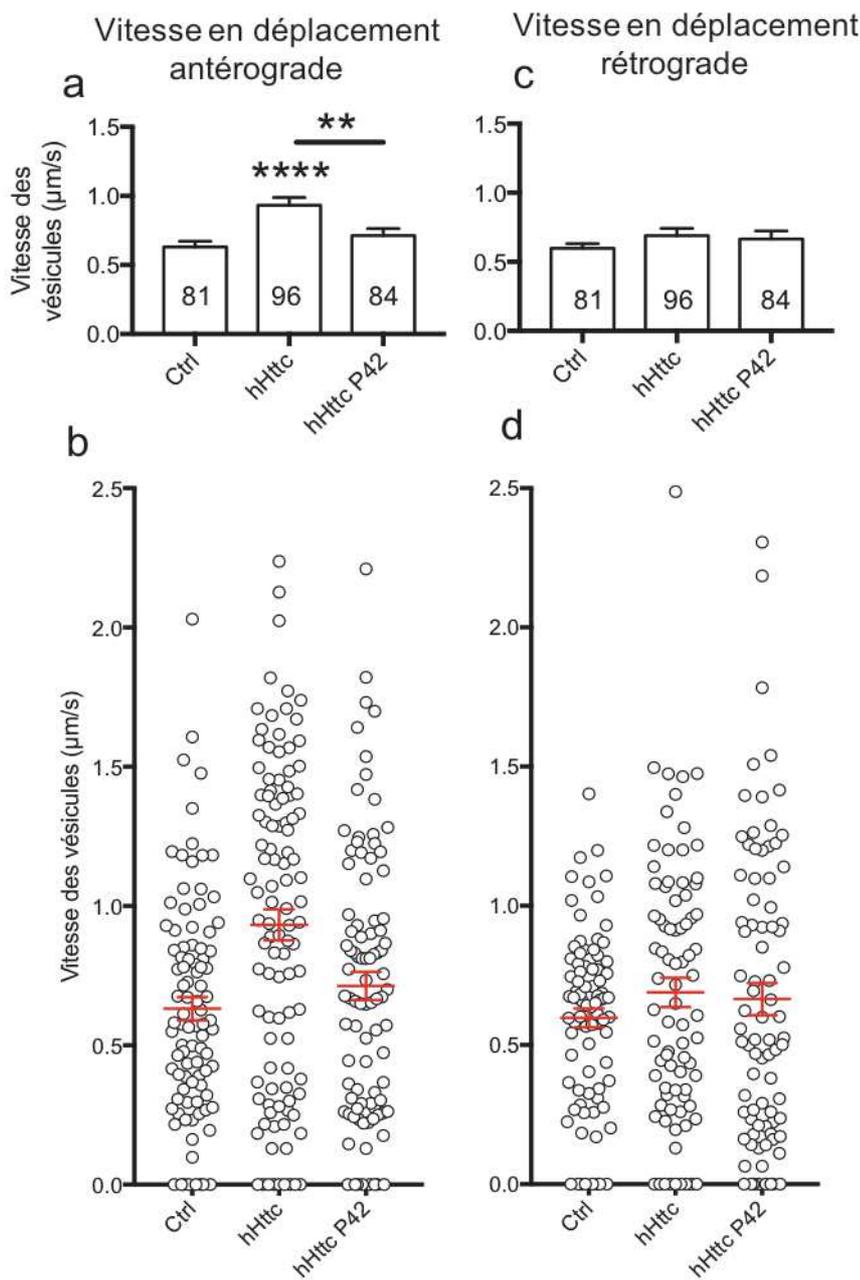


Représentation des différentes formes de Htt exprimées en plus de NPYGFP. Ctrl représente la condition contrôle avec seulement l'expression de NPYGFP. a,c,e montrent le % de temps passé par les vésicules de NPYGFP soit en pausing (a), soit effectuant un mouvement antérograde (c) soit rétrograde (e) en fonction des différentes conditions. b,d,f Répartition des échantillons de chaque moyenne présentait dans a,c,e. Les analyses statistiques ont été réalisées avec un One-Way ANOVA. Pausing : Aucune différence n'est notée. Mouvement antérograde : Aucune différence n'est notée. Mouvement rétrograde : Aucune différence n'est notée.

Aucun effet de la hHttc n'est noté. Ceci semble suggérer que les fragments absents de la hHttc mais présents dans la hHtt sont nécessaires au rôle de la Htt pour l'effet sur l'orientation du sens de déplacement des vésicules de DNT1GFP le long des axones. Aucun effet de la coexpression de P42 avec la hHttc n'est noté sur ce phénotype.

Néanmoins nous avons également analysé l'effet de cette hHttc sur la vitesse des vésicules, les résultats sont présentés dans la Figure II-39.

Figure II-39 Effet de la présence ou l'absence de P42 dans la hHttc sur la vitesse des vésicules NPY



a,c- Vitesse de déplacement ($\mu\text{m/s}$) des vésicules en fonction du sens de déplacement antérograde (a) ou rétrograde (c) dans les différentes conditions. b,d Répartition des échantillons de chaque moyenne présentaient dans a,c. Les analyses statistiques ont été réalisées avec un One-Way ANOVA. Vitesse antérograde : ctrlvshHttc, $p^{****} < 0,0001$; hHttcvshHttcP42, $p^{**} = 0,0066$. Vitesse rétrograde : aucune différence n'est observée.

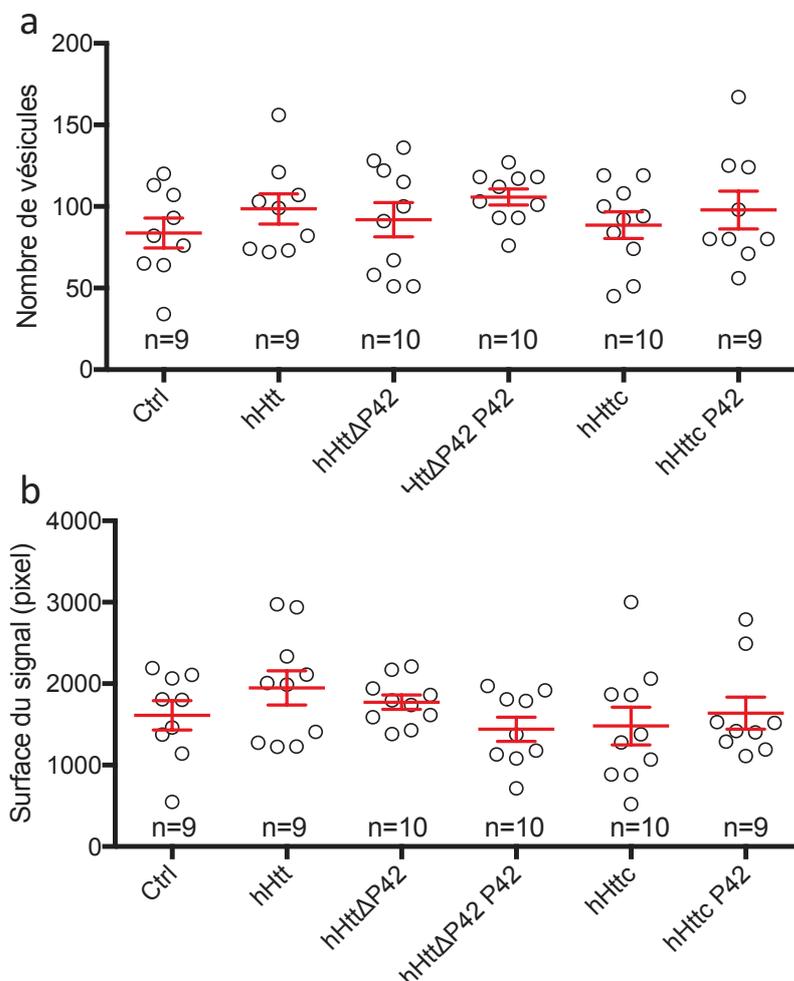
Nous observons que la hHttc augmente la vitesse de transport antérograde, avec une vitesse moyenne de $0,63\mu\text{m/s}$ pour le contrôle, contre $0,93\mu\text{m/s}$ en présence de hHttc. En

revanche la présence de P42 semble bloquer l'effet de la hHttc. En effet, avec P42 la vitesse moyenne revient à des taux proches de ceux observés chez le contrôle (0,74µm/s).

Tous ces résultats avec hHtt ou hHttc montrent que P42 bloque l'effet de hHtt exprimé chez la drosophile, confortant ainsi l'idée que P42 pourrait soit interagir avec la hHtt soit prendre sa place au sein du complexe moteur.

Finalement, tout comme nous l'avions fait avec les études sur DNT1, nous avons également observé le nombre de vésicules le long des axones et la surface du signal. Les résultats sont présentés dans la Figure II-40.

Figure II-40 Effet de la présence ou l'absence de P42 dans la hHtt et hHttc sur le nombre de vésicules NPY



Le nombre de vésicules et leur taille a également été observé. Les analyses statistiques ont été réalisées avec un Kruskal-Wallis. Aucune différence significative n'a été trouvée

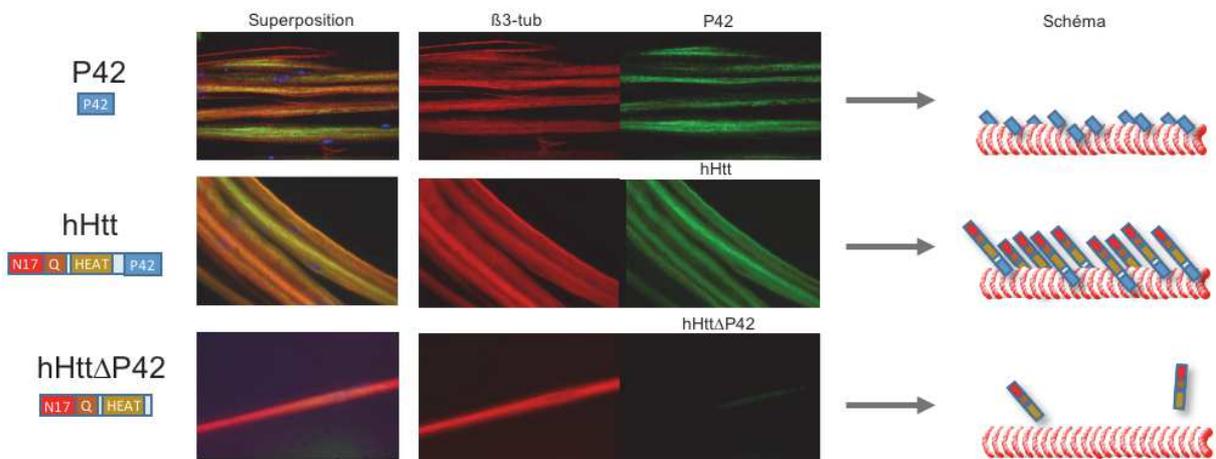
Aucun effet de l'expression en condition physiologique d'une hHtt n'est observé sur le nombre de vésicules. Ceci suggère que l'expression de hHtt dans la drosophile en condition

physiologique semble donc avoir un effet seulement sur l'état du transport des vésicules le long des axones mais pas sur l'attachement de vésicules.

II.2.3. Colocalisation de P42 avec les microtubules

Nous avons également regardé comment P42 était distribué le long des axones. Pour cela, nous avons observé par immunomarquage la distribution de P42, de hHtt et de hHttΔP42 le long des microtubules et observé leur éventuelle colocalisation avec la β3-tubuline le long des axones de larves de drosophiles. Les résultats sont présentés dans la Figure II-41.

Figure II-41 Colocalisation avec β3-tubuline



Immunomarquages le long des axones de motoneurones de larves de drosophile au stade L3. En rouge la β3-tubuline, en vert marquage de P42 (anti-myc), hHtt (anti-Ha), hHttΔP42 (aHtt).

Ces résultats préliminaires semblent suggérer que P42 et la hHtt mais pas la hHttΔP42 sont colocalisés avec la β3-Tubuline. Ceci suggère que P42 est un domaine nécessaire et suffisant à la distribution de cette hHtt de 548 acides aminés le long des axones.

L'ensemble de ces résultats nous permettent d'en apprendre plus sur le rôle de P42 le long des microtubules et notamment dans le transport de DNT1 l'homologue du BDNF. En effet, les différentes analyses sur l'effet de P42 sur le transport et le nombre de vésicules de DNT1 le long des microtubules nous permettent de penser que P42 est capable de restaurer la capacité des protéines motrices à effectuer des mouvements antérogrades mais pas rétrogrades ainsi que de rétablir partiellement la vitesse de déplacement. Ces conclusions peuvent également être mis en relief avec les travaux de l'équipe de Frédéric Saudou [184] qui montre

que la capacité des complexes moteurs à choisir le sens du déplacement et à déterminer la vitesse de déplacement sont affectés de manière indépendante en condition de MH, et au vu de nos résultats que P42 est un domaine de la Htt important dans ces mécanismes.

Partie 3. Hamlet : dispositif permettant de suivre l'évolution de la MH et de P42

Le Hamlet test[®] est un dispositif récemment créé par Tanguy Maurice et développé par Viewpoint [185], [186]. Ce dispositif permet d'analyser la mémoire topographique des souris mais également de suivre leurs comportements dans un environnement enrichi et complexe. Pour la première fois des souris développant la MH vont être utilisées dans ce test. Le nom Hamlet provient de l'anglais et signifie « Hameau » en français. Ce nom reflète ce qu'est ce dispositif : un ensemble de maisons formant un petit hameau. La Figure II-42 représente une photo du Hamlet vu du dessus.

Figure II-42 Le Hamlet

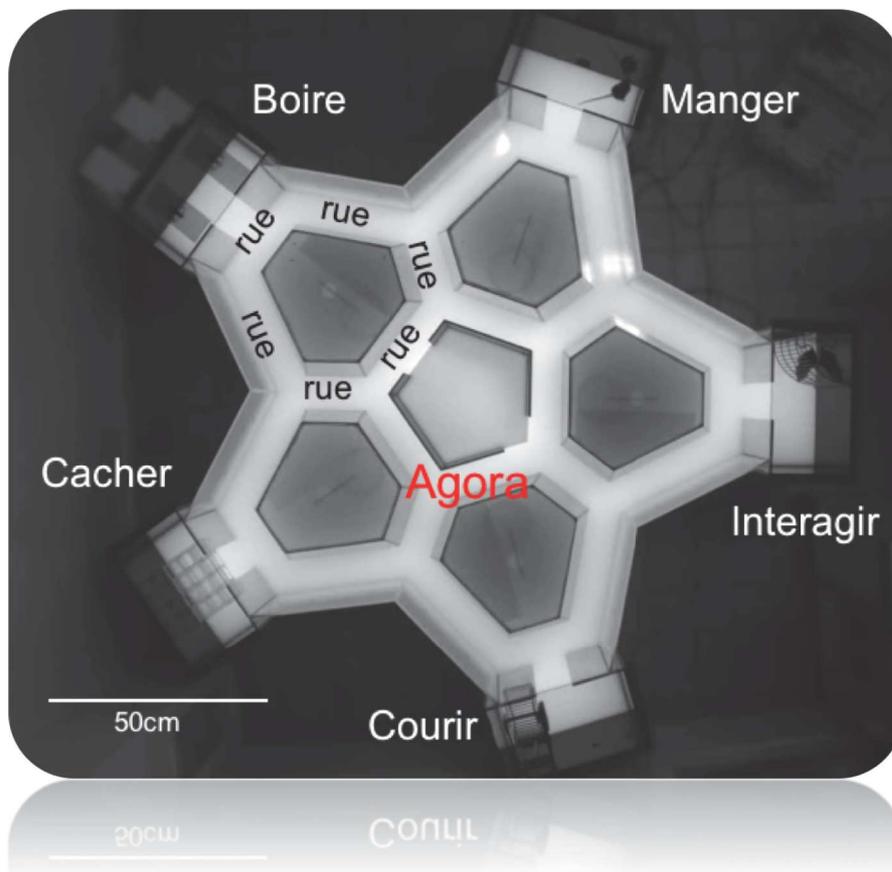


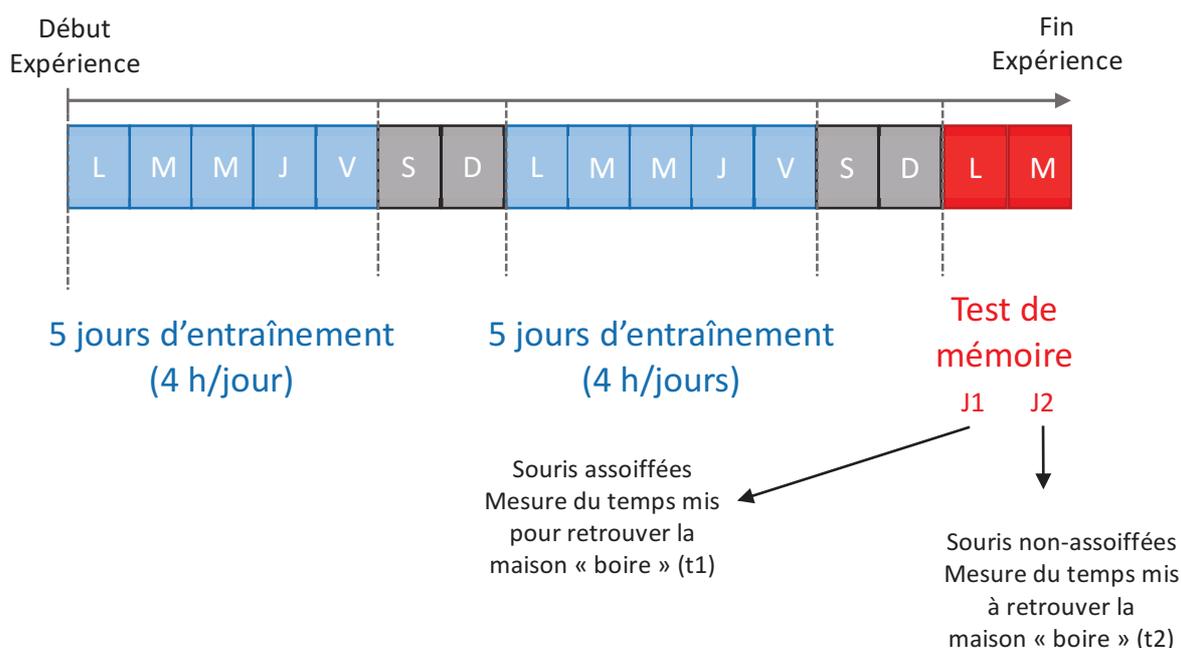
Photo vu du dessus du Hamlet. Le sol est illuminé par des DEL infrarouges et permettent de détecter les souris dans l'obscurité. La souris testée est présente dans la maison « manger ». Dans la maison « interagir » une autre souris est présente dans l'angle, c'est la souris interaction. Une souris qui n'a jamais été en contact avec les souris testées.

Le Hamlet forme une étoile à cinq branches, axées autour d'une place centrale l'Agora, point de départ des souris. L'Agora présente deux sorties différentes menant sur un ensemble de rues parcourant tout le dispositif. Au bout des branches de l'étoile, se trouvent des maisons. Chaque maison correspond à une fonction physiologique de la souris. La maison « boire » est équipée de deux abreuvoirs reliés chacun à une réserve d'eau. La maison

« *manger* » contient un distributeur de nourriture. La maison « *interagir* » est constituée d'une petite cage dans laquelle est placée une souris le temps de l'exercice. La maison « *courir* » est équipée d'une roue sur laquelle les souris peuvent courir. Dans la maison « *cache* » est placé un complexe de cubes formant un labyrinthe. Ces 5 maisons permettent donc à la souris de boire, manger, interagir socialement, faire de l'exercice et de se cacher, et tout cela à des endroits bien distincts, se rapprochant ainsi de ce que les souris peuvent rencontrer dans la nature.

Jusqu'à 10 souris sont entraînées ensemble dans ce dispositif pendant 10 jours, 5 jours par semaine, 4 heures par jours. À la fin de cette période, le test de mémoire topographique commence, comme représenté dans la Figure II-43.

Figure II-43 Protocole journalier du Hamlet

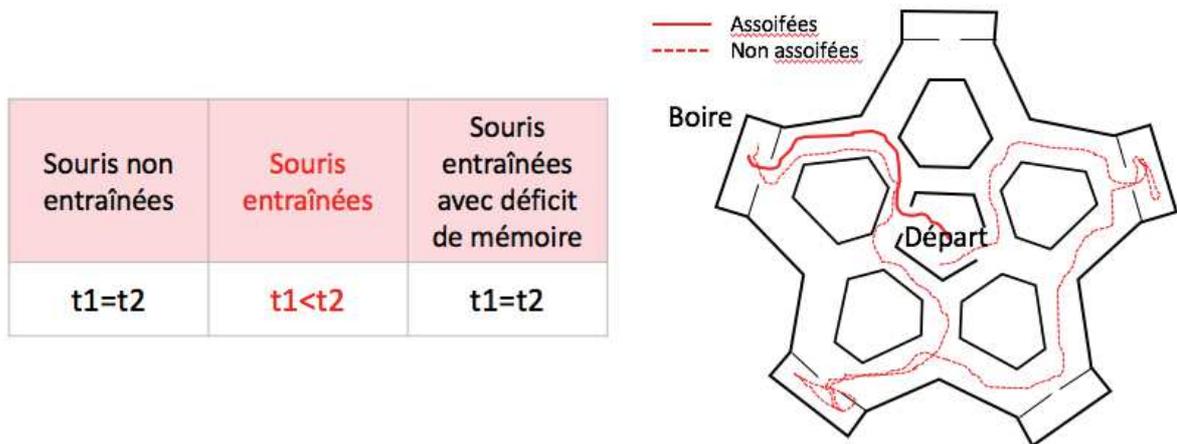


Agenda du Hamlet. En bleu sont représenté les jours d'entraînement et en rouge les jours consacré au test de mémoire topographique.

Le test de mémoire est effectué en deux étapes. Le premier jour (J1), des souris assoiffées sont placées individuellement 10 min dans le Hamlet. Pour cela, la veille leur réservoir d'eau habituel a été retiré. Durant ce test, on mesure le temps mis par la souris pour aller dans la maison « boire » (t1). Ce temps reflète la capacité de la souris à se souvenir où est la maison « boire ». Le deuxième jour (J2), les souris sont replacées dans le Hamlet dans les mêmes

conditions mais cette fois-ci sans être assoiffées. Durant cette étape, on mesure également le temps passé par les souris pour aller à la maison « boire » (t_2). Ces deux valeurs permettent d'observer si la souris a mémorisé l'emplacement de la maison « boire » pendant le test le premier jour [186] (Figure II-44).

Figure II-44 Test de mémoire topographique du Hamlet



Le test de mémoire topographique permet d'observer des troubles de la mémoire.

Ainsi de manière intéressante, *Crouzier et al* [185] utilisent le Hamlet pour mesurer les troubles de la mémoire dans un modèle d'Alzheimer de souris, induits par injections intracérébro-ventriculaires d' $A\beta_{25-35}$.

II.3.1. Utilisation du Hamlet pour le suivi de la MH et du traitement par P42

Dans le cadre de l'étude de P42 et de la MH, le Hamlet est intéressant pour deux raisons. La première est que ce test permet de mesurer la mémoire topographique, ce qui est intéressant dans la mesure où les souris R6/2 sont connues pour avoir des troubles de la mémoire [159]. Le Hamlet permettrait donc d'observer l'effet de P42 sur ces troubles. La deuxième et la plus importante est l'analyse des comportements pendant la phase d'entraînement. En effet, la phase d'entraînement permet non seulement de suivre plusieurs comportements à la fois qu'ils soient d'ordres moteurs, psychiatriques et cognitifs, mais permet surtout de suivre leur évolution pendant 2 semaines, rendant capable ainsi un suivi longitudinal très important par rapport à la durée de vie des souris de 13 semaines. Ceci permet donc d'avoir un suivi de l'évolution de la maladie mais également du traitement. Ces expériences ont été réalisées avec des souris âgées de 8 semaines, au début de l'entraînement,

à 10 semaines à la fin du test de mémoire. Les traitements effectués étaient des traitements pré-symptomatiques.

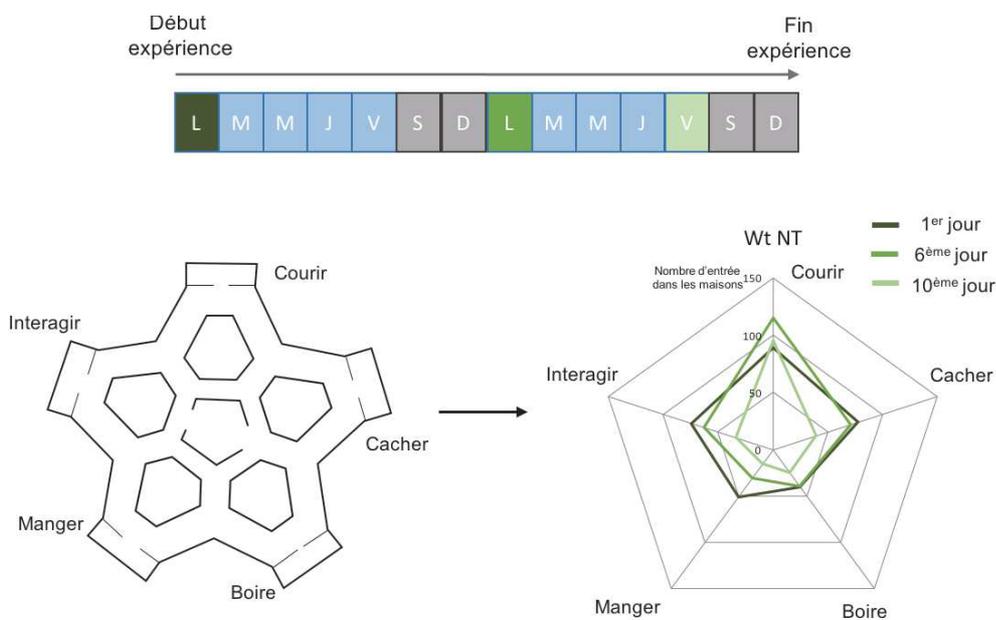
II.3.1.1. Résultats du test de mémoire topographique

Les résultats pour le test de mémoire topographique ne sont malheureusement pas interprétables suite à un problème d'ordre technique. En effet, les souris non assoiffées sont allées plus vite dans la maison « boire » que les assoiffées, et ce pour toutes les conditions WtNT, R6/2NT et R6/2 P42. Les résultats sont néanmoins présentés comme Données supplémentaires 3.

II.3.1.2. Résultats entraînements

En revanche, les résultats des entraînements sont très prometteurs. Durant les dix sessions d'entraînements, nous avons observé le nombre d'entrées dans chaque maison le premier jour, le sixième et le dixième jour, comme le montre la Figure II-45 avec en exemple de ce que l'on observe avec les souris Wt NT.

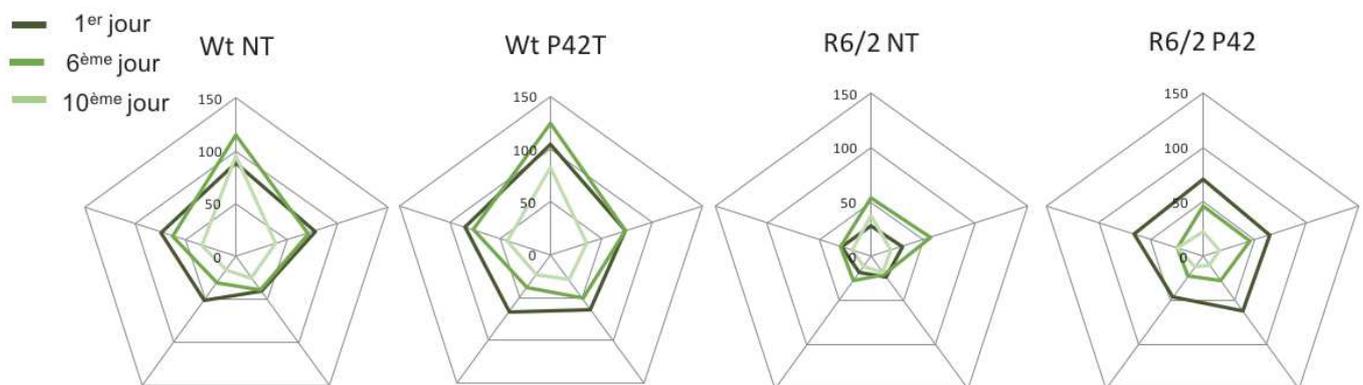
Figure II-45 Evolution du comportement des souris Wt dans le Hamlet au cours des 10 jours d'entraînement



Les résultats de l'entraînement sont présentés dans la figure. Les résultats sont présentés sous forme de radar, chaque point du radar correspond à une maison. Le nombre d'entrées réalisé par les 5 souris Wt sont mesuré. En vert foncé sont représentés les résultats du 1^{er} jour. En vert sont représentés les résultats du 6^{ème} jour et en vert clair les résultats du 10^{ème} jour.

Durant le premier jour (vert foncé), on observe un nombre d'entrées relativement homogène entre les différentes maisons, formant un pentagone sur le radar. Au fur et à mesure de l'entraînement, on note qu'une préférence se met en place pour la maison « *courir* », la maison avec une roue. Nous avons également observé ces paramètres chez 6 souris R6/2 NT, 6 souris R6/2 P42T et 5 souris Wt P42T. Les résultats sont présentés dans la Figure II-46.

Figure II-46 Evolution du comportement des souris (WtP42T, R6/2 NT, R6/2P42T) dans le Hamlet au cours du temps



De la même manière que dans la figure II-45 les résultats de l'entraînement des souris des différentes conditions sont présentés sous forme de radar.

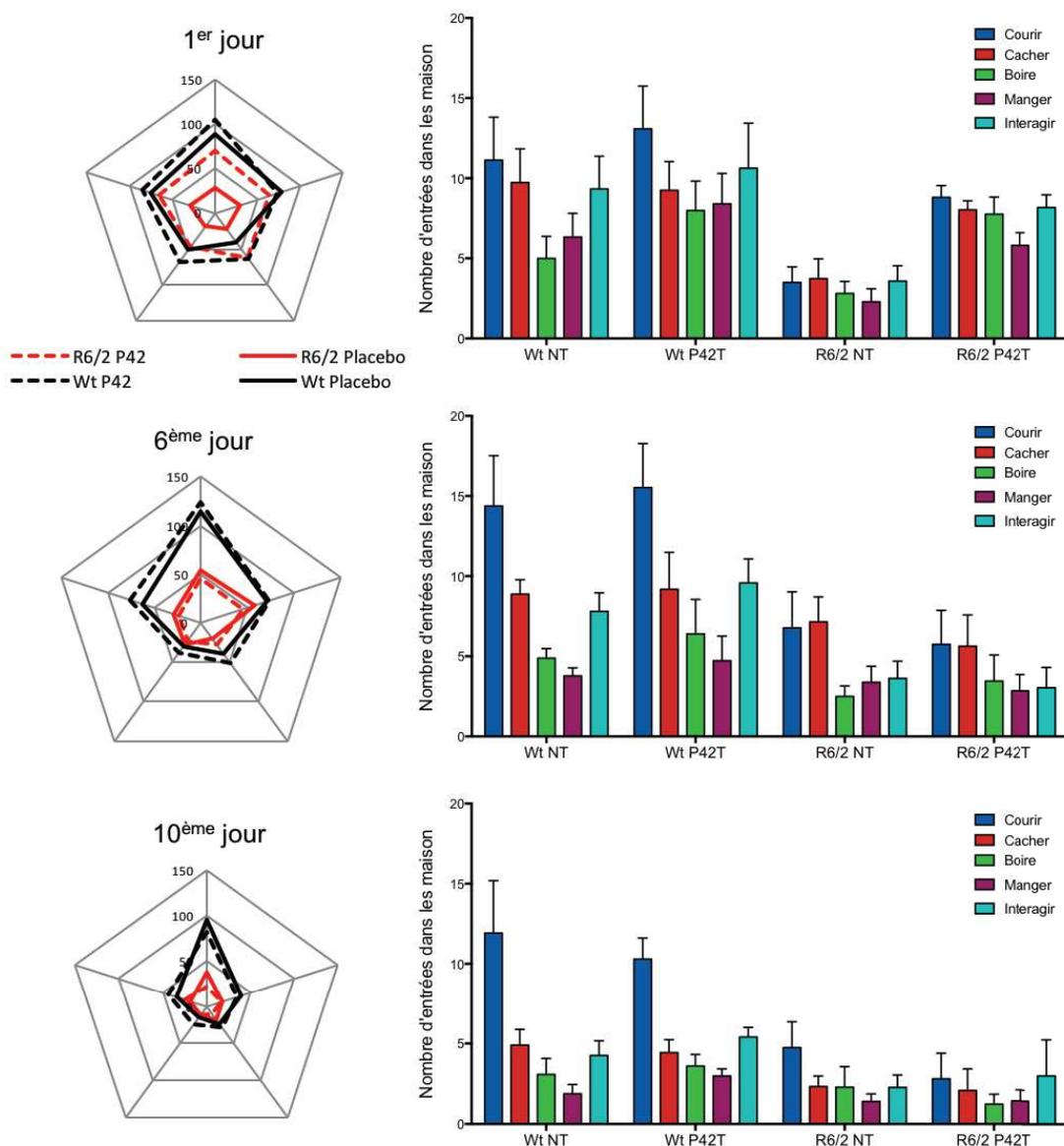
Cette figure nous permet d'observer l'évolution du profil d'exploration des souris des différentes conditions. Pour les Wt P42T, on observe le 1^{er} jour que le profil forme un pentagone tout comme ce que l'on a observé chez les souris Wt NT. De plus, on observe la mise en place au fur et à mesure de l'entraînement d'une préférence pour la maison « *courir* », ce que l'on avait également noté avec les Wt NT. Précédemment (II.1.3), nous avons observé que malgré des effets d'un point de vue biochimique aucune différence comportementale n'était observable entre les Wt NT et Wt P42T. C'est également ce que l'on observe avec le Hamlet. Cela nous montre également que les résultats obtenus avec le Hamlet reproduisent les observations précédentes.

La Figure II-46 montre également l'évolution des R6/2 NT. Lors du premier jour d'entraînement, on observe également un pentagone mais beaucoup plus petit que celui observé chez les souris sauvages. Ceci met en évidence un phénotype pathologique important chez les R6/2. En revanche, chez les souris R6/2 P42T durant le premier jour, nous observons de manière intéressante un pentagone de même taille que celui observé chez les souris Wt.

Néanmoins on observe que par la suite le profil d'exploration des souris R6/2 P42T rejoint celui des R6/2 NT.

Afin de quantifier ces données, j'ai comparé les différents profils entre chaque condition aux 1^{er}, 6^{ème} et 10^{ème} jour. Trois variables ont été observées : la variable maison, la variable du génotype et la variable du traitement. Statistiquement, j'ai utilisé une *Three-way Anova*. Les résultats sont présentés dans la Figure II-47 et le Tableau 3.

Figure II-47 Evolution du comportement entre le J1 et le J10



Analyses statistiques de l'évolution du profil d'exploration du Hamlet des souris des différentes conditions, aux 1^{er} jour, 6^{ème} et 10^{ème} jour. Sur chaque radar sont représentées les 4 conditions et ses résultats sont également représentés sous forme d'histogramme avec les SEM. Pour réaliser les moyennes sur 1 jour, le nombre de visites dans chaque maisons a été mesuré toutes les 30min. L'entraînement durant 4h, n=8. Les analyses statistiques ont été réalisées avec un Three Way Anova. Au 1^{er} jour, les variations sont induites par le génotype, $p^{***}<0,0001$; le traitement $p^{***}<0,0001$, et les maisons $p^*=0,0422$. Au 10^{ème} jour, les variations sont induites par le génotype $p^{***}<0,0001$, les maisons $p^{***}<0,0001$ mais pas par le traitement.

Tableau 3 Résumé des effets observés dans le Hamlet

Variables \ Jours	J1	J6	J10
Génotype	****	****	****
Traitement	****	ns	ns
Maison	*	****	****

Ces résultats montrent que durant le 1^{er} jour d'entraînement, un important effet du génotype des souris R6/2 est observé mais également un important effet du traitement, vu sur les graphiques par une augmentation du nombre d'entrées dans les maisons pour les souris R6/2 P42T par rapport aux R6/2 NT. En revanche, aux 6^{ème} et 10^{ème} jour l'effet du traitement n'est plus observable. Pour ce qui est des maisons, on observe que la différence semble beaucoup plus importante aux 6^{ème} et 10^{ème} jour comparé au 1^{er} jour, le graphique nous montre que c'est en particulier dû à une augmentation de la préférence pour la maison « courir » (bleu) chez les Wt.

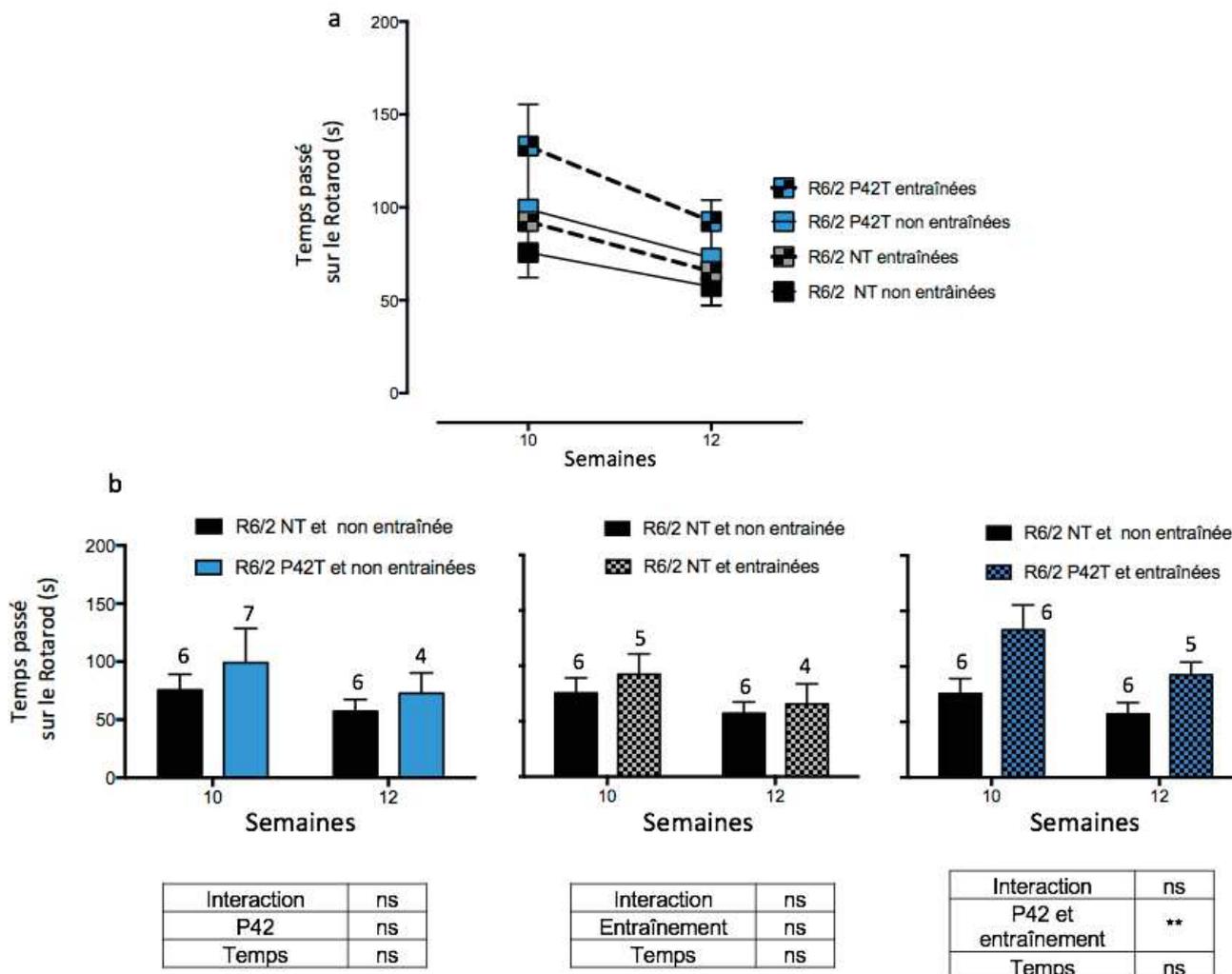
Ces résultats nous permettent de conclure plusieurs choses. Premièrement, que le Hamlet est un outil intéressant pour suivre l'évolution d'une maladie et l'efficacité d'un traitement. Deuxièmement, que P42 a un effet positif important sur le comportement des souris R6/2 dans le Hamlet, avec une amélioration notable à 8 semaines, mais qui faiblit à 9 puis 10 semaines, confirmant les résultats précédemment observés II.1.1.2.

II.3.2. Hamlet environnement ultra-enrichi : effet sur les souris R6/2

Plusieurs études ont montré qu'un environnement ultra-enrichi a un effet bénéfique sur plusieurs modèles de MH [153], [155]. En effet, un milieu ultra-enrichi a pour conséquence de notamment stimuler l'expression du BDNF qui, comme on l'a vu précédemment, a de nombreux effets et est un acteur clef dans la MH [187]. L'équipe de Tangui Maurice [185] montre que l'entraînement au Hamlet augmente notamment la neurogenèse dans l'hippocampe, suggérant un effet d'environnement ultra-enrichi. Nous avons donc voulu vérifier quel était l'effet du Hamlet sur la MH développée par nos souris R6/2. Pour cela, nous avons comparé les scores de Rotarod de souris R6/2 NT et R6/2 P42T entraînées et non entraînées au Hamlet, et ce à leur 10^{ème} et 12^{ème} semaines à des stades de la MH très tardifs où les scores de Rotarod, même pour les R6/2 P42T, étaient très proches des R6/2 NT. Les

résultats sont présentés dans la Figure II-48. Afin de valider statistiquement les observations, nous avons comparé à l'aide d'un *Two-way Anova*, les scores des souris R6/2 NT non entraînées et les scores des souris R6/2 P42T entraînées.

Figure II-48 Effet du Hamlet et de P42 sur la coordination motrice



Le rotarod a été effectué à la 10^{ème} et la 12^{ème} semaine pour des souris R6/2 NT et P42T, entraînées ou non au Hamlet. a- Représente les scores de Rotarod des 4 conditions à la semaine 10 et 12. L'analyse statistique a été réalisée avec un *Two Way Anova*. b- À gauche R6/2 NT non entraînées vs R6/2 P42T non entraînées, pas de différence significative observée. Au milieu : R6/2 NT non entraînées vs R6/2 NT entraînées, pas de différence significative observée. À droite : R6/2 NT non entraînées vs R6/2 P42T entraînées, il y a des variations induites par le traitement et l'entraînement $p^{**}=0,0087$.

Les résultats présentés dans la Figure II-48a nous montrent que les scores de Rotarod sont meilleurs pour les R6/2 P42T et entraînées au Hamlet, suivis par les scores des souris de

la condition P42T non entraînées, puis la condition NT et entraînement au Hamlet et finalement la condition NT non entraînée.

Ces différences sont mises en valeur par des tests *Two-way Anova* présentés dans la Figure II-48b. Sur la figure de gauche, on observe que les scores de Rotarod des souris P42T non entraînées ne sont pas significativement meilleurs que les scores des souris NT non entraînées. Sur la figure du milieu, on observe que les scores de Rotarod des souris NT entraînées ne sont pas meilleurs que les scores des souris NT non entraînées. En revanche, la figure de droite montre que les souris P42T entraînées ont des scores de Rotarod significativement plus grands que ceux des souris NT non entraînées.

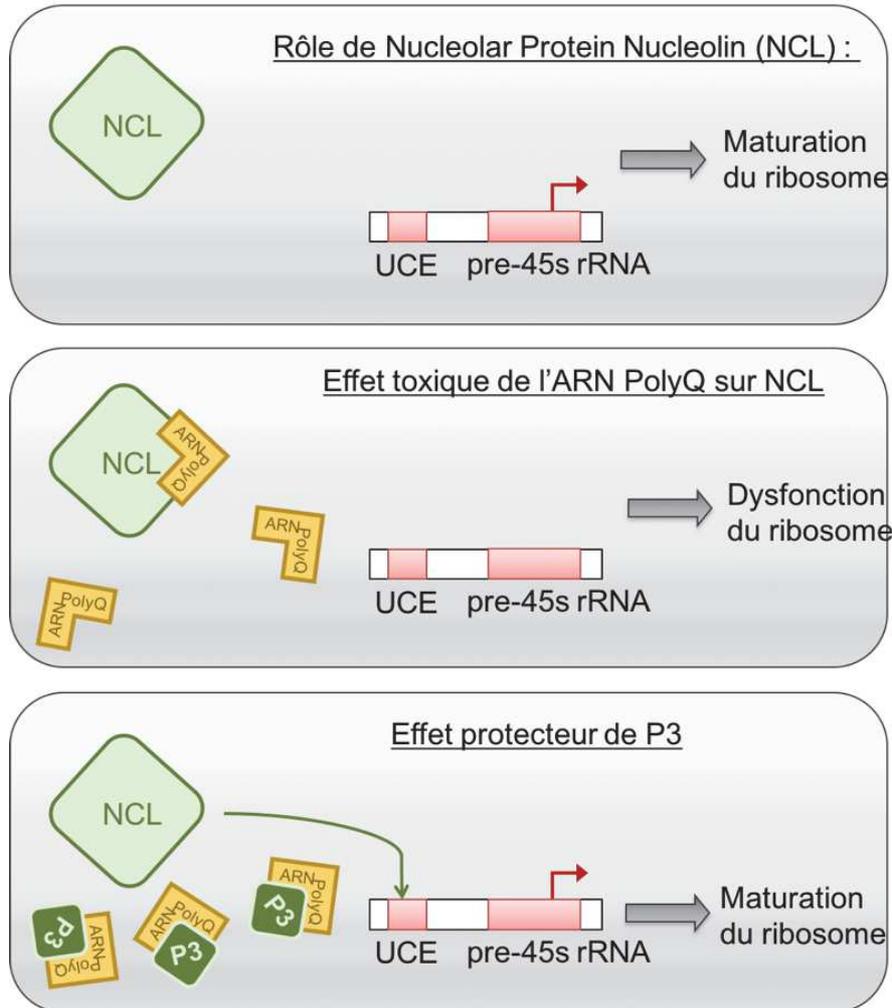
Ceci montre que l'effet de P42T seul, tout comme l'effet de l'entraînement au Hamlet seul, ne sont pas suffisants pour avoir un effet visible avec le Rotarod entre la 10^{ème} et la 12^{ème} semaine. En revanche, la synergie des deux permet d'observer un effet positif, confirmant l'importance de l'enrichissement du milieu pour l'efficacité des traitements [153].

Partie 4. P3 et bithérapie

P3 est un peptide de 13 acides aminés développé par l'équipe de Ho Yin Edwin Chan [188]–[190]. P3 cible l'effet toxique induit par l'ARN codant pour un domaine PolyQ. Ces fragments d'ARN sont toxiques et induisent, notamment, *via* une dérégulation des ribosomes, un stress nucléaire entraînant à terme l'apoptose[191].

L'équipe de Ho Yin Edwin Chan [192] a montré que l'ARN PolyQ se fixe à la nucléoline. La nucléoline est une phosphoprotéine qui va permettre la transcription de certains ARN ribosomiaux *via* une interaction avec le domaine UCE (Upstream Control Element). Cette interaction est essentielle à la maturation des ribosomes. En présence d'ARN PolyQ, la nucléoline ne peut plus remplir ses fonctions sur la transcription, entraînant de nombreux problèmes dans divers mécanismes cellulaires. L'équipe d'Edwin Chan a en particulier mis en évidence le site de fixation de la nucléoline à l'ARN PolyQ. Ce site de liaison est P3. Cette séquence de la nucléoline de 13 acides aminés a été extraite et analysée. Zhang *et al* [192] ont notamment montré que P3 avait une très grande affinité avec les ARN PolyQ et de manière intéressante que plus le PolyQ était allongé plus l'affinité était grande. Puis la même équipe, en observant les taux de transcription d'un ARN ribosomique pre-45s *in cellulo*, a démontré que la coexpression d'ARN PolyQ et de P3 restaurait le taux de transcrits de l'ARNr pre-45s inhibé en présence d'ARN PolyQ, ceci diminuant l'effet toxique des ARN PolyQ [192]. Cette équipe montre également en observant *in vivo* chez la drosophile, la dégénérescence des pseudopupils, induites par l'expression d'ARN PolyQ, que la co-application de P3 et de QBP1, se fixant au domaine PolyQ et empêchant l'agrégation, entraîne un sauvetage important de la toxicité de l'ARN PolyQ. Figure II-49 schématise les interactions entre la nucléoline (NCL), l'ARN PolyQ et P3.

Figure II-49 Schéma du fonctionnement de la Nucléoline et de P3

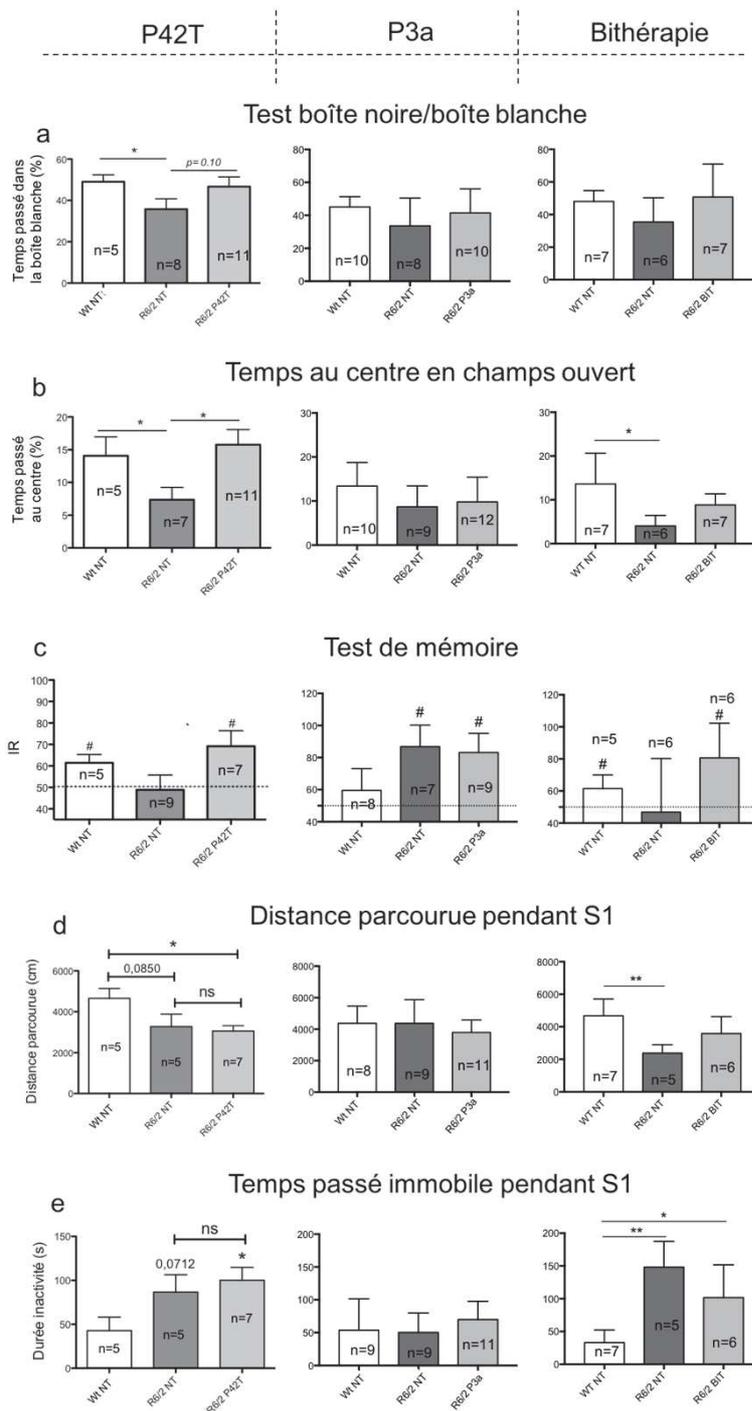


La bithérapie P42/P3 permettrait de protéger des troubles induits par la mHtt par des voies indépendantes, à la fois en diminuant l'effet toxique de la protéine *via* P42, mais également en diminuant les effets toxiques induits par l'ARN PolyQ *via* P3. Dernièrement Chan *et al* [189] ont amélioré l'efficacité de P3 en acétylant le domaine N-terminale (référé P3v8 dans l'article [189]). Cette acétylation permet d'augmenter de manière importante l'affinité avec les PolyQ. C'est ce peptide P3a que nous avons testé dans un premier temps.

II.4.1. Effet de P3a et de la bithérapie sur les souris R6/2

Nous avons donc analysé l'effet qu'avait un traitement avec P3a et un traitement avec P3a et P42TAT et comparé ces résultats avec ce que l'on avait obtenu avec P42T. Tous les traitements sont appliqués en pré-symptomatique sur des souris femelles. Les peptides sont administrés de la même manière que dans les parties précédentes avec la technologie Aonys® et les contrôles (NT) sont traités avec des microémulsions vides. Les résultats des analyses comportementales sont représentés dans la Figure II-50.

Figure II-50 Résultats des tests comportementaux avec P42T, P3a et de la bithérapie



Cette figure représente les résultats obtenus pour différents tests pour 3 cohortes, P42T, P3a et bithérapie (P3a et P42T). Les résultats de P42T sont les mêmes que ceux obtenus dans la partie 1. Les résultats des cohortes P3a et P42T sont analysés statistiquement avec le test de Mann-Whitney ou pour le test de mémoire, un t-test par rapport à 50%. a- Représente les résultats du test de boîte noire/boîte blanche. Aucune différence significative n'est notée. b- Représente le temps passé au centre du champ ouvert (S1). Bithérapie : WtNTvsR6/2NT, $p^*=0,039$. c- Représente les résultats du test de mémoire en champ ouvert (S3). P3a : R6/2NT, $p\#=0,020$; R6/2P3a, $p\#=0,034$. Bithérapie : WtNT, $p\#=0,016$; R6/2bith, $p\#=0,010$. d- Représente la distance parcourue pendant S1. Bithérapie : WtNTvsR6/2NT, $p^{**}=0,0082$. e- Représente le temps passé immobile pendant S1. Bithérapie : WtNTvsR6/2NT, $p^{**}=0,0059$; WtNTvsR6/2bit, $p^*=0,038$.

Pour l'anxiété, nous observons avec le test de la boîte noire/boîte blanche (Figure II-50a) pour les trois cohortes que les R6/2 NT semblent passer moins de temps dans la boîte blanche que les Wt NT et que les R6/2 P3a ou avec la bithérapie. Bien que les souris traitées par P42T et P3a semblent être moins anxieuses, aucune des cohortes ne montrent de différence statistiquement significative.

En ce qui concerne la mesure de la présence au centre d'un champ ouvert (Figure II-50b), les R6/2 de la cohorte P3a ne présentent pas des déficits assez importants pour souligner une différence statistiquement significative. Pour la cohorte Bithérapie, l'effet anxiogène du transgène porté par les R6/2 NT est visible mais l'effet de la bithérapie ne l'est pas malgré la tendance observable sur le graphique.

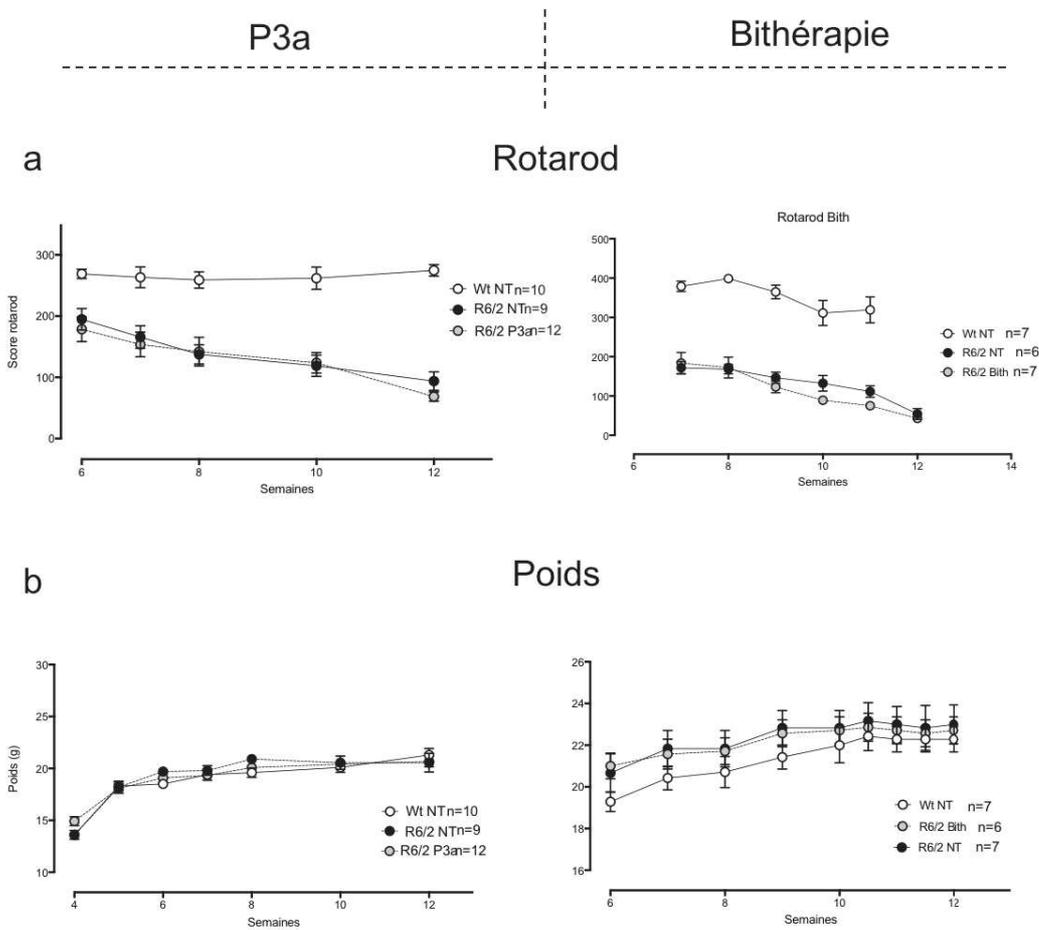
Les résultats du test de mémoire sont présentés Figure II-50c. Pour la cohorte P3a nous observons que les Wt NT ne se sont pas souvenus de l'ancien objet alors que les R6/2 NT oui, tout comme les R6/2 P3a. Les contrôles négatifs et positifs donnant l'inverse de ce à quoi l'on s'attendait, ces résultats ne sont malheureusement pas interprétables. En revanche, pour la bithérapie on observe que les souris R6/2 NT ont des déficits de mémoire alors que les WtNT et les R6/2 bithérapie ont une mémoire opérationnelle.

Nous avons également observé la distance parcourue durant la session dans le champ ouvert (Figure II-50d). Avec la cohorte P42T, nous observons une tendance à la diminution de la distance parcourue chez les R6/2NT par rapport aux Wt NT. En revanche, l'effet positif de P42T n'était pas notable. Avec la cohorte P3a, les 3 conditions semblent similaires, confirmant que dans cette cohorte les souris R6/2 présentaient des défauts moins prononcés que dans les autres cohortes. Néanmoins, avec la cohorte bithérapie on observe une diminution significative de la distance parcourue chez les R6/2 NT par rapport aux Wt NT. Ces données suggèrent dans ce cas une synergie des actions de P42T et de P3a dans la mesure où les R6/2 P42T ne sont pas significativement différentes des Wt NT.

Nous avons également analysé les temps d'immobilité des souris (Figure II-50e). Dans la cohorte P42T, les R6/2 NT ont tendance à passer plus de temps immobiles que les Wt NT, et les R6/2 P42T ont des taux d'immobilité proches des souris R6/2 NT. Pour la cohorte P3a, là encore les souris R6/2 NT n'ont pas des valeurs significativement différentes des WtNT, ni les souris R6/2 P3a.

La Figure II-51a montre également l'évolution du score de Rotarod. Les R6/2 NT présentent d'important déficits de la coordination motrice, et ni le traitement par P3a, ni la bithérapie ne semble avoir d'effet protecteur. Nous constatons les mêmes résultats avec l'évolution du poids présenté sur la Figure II-51b

Figure II-51 Effet du traitement par P3a et de la bithérapie sur l'évolution du poids et du score de Rotarod



Cette figure représente l'évolution du score de Rotarod et du poids des différentes souris dans différentes conditions comme présentées dans la figure. Les analyses statistiques ont été réalisées avec un Two-way Anova en comparant les R6/2NT et R6/2 traitées au cours du temps. Aucune différence significative dû aux traitements n'est notée.

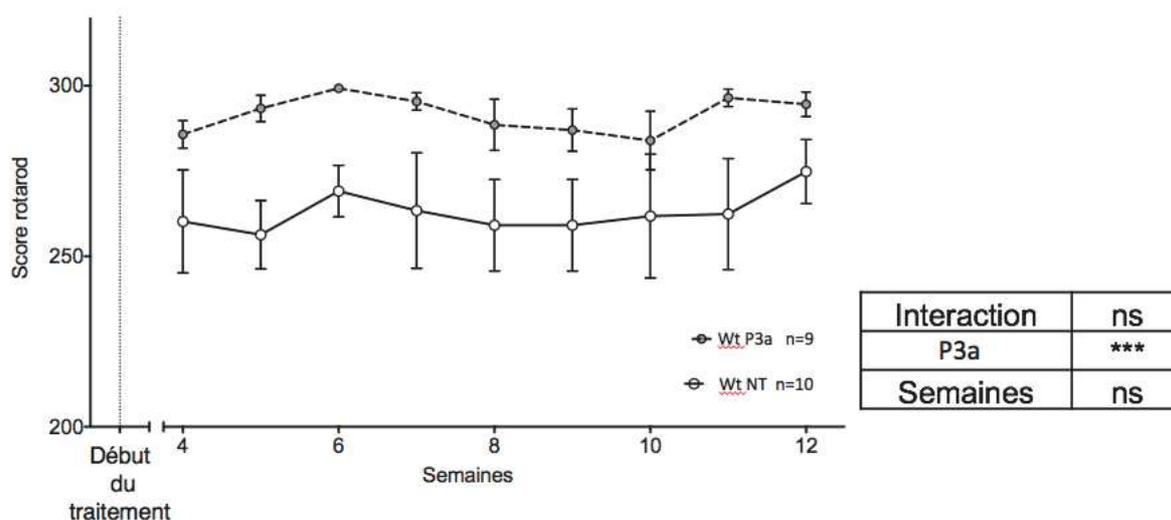
Pour conclure cette série de résultats, nous pouvons noter que pour la cohorte P3a, les résultats montrent peu d'effet de P3a notamment sur le Rotarod. En revanche, pour les autres tests le faible écart entre les valeurs obtenues entre les souris Wt NT et R6/2 NT ne permet pas de conclure sur l'effet de P3a. Pour ce qui est de la cohorte bithérapie, nous retrouvons des résultats obtenus sur la cohorte P42, bien que certains effets soient plus statistiquement soulignés. Néanmoins, nous observons que la bithérapie permet de récupérer de certains phénotypes qui ne sont pas récupérés avec P42 seul. Ces effets pourraient potentiellement être dû à P3a.

II.4.2. Effet de P3 sur les souris Wt

Tout comme nous l'avons fait avec P42, nous avons également observé l'effet que pouvait avoir P3 sur des souris Wt. Et comme avec P42, nous n'avons pas observé d'effet flagrant de P3 sur le comportement des souris Wt. Les résultats de ces analyses sont présentés

dans les Données supplémentaires 4. Cependant, les résultats du Rotarod (Figure II-52) nous montrent que les Wt P3a semblent avoir de meilleurs scores que les Wt NT, effet souligné statistiquement par une « *Two-way Anova* ». Le traitement des souris commençant à la semaine 2, donc 2 semaines avant la première acquisition au Rotarod, nous n'avons pas pu discriminer si c'était le traitement par P3a qui avait permis cette augmentation ou si cet effet était dû à une variation entre les groupes.

Figure II-52 Effet de P3a sur les souris sauvages et l'évolution de leur score au Rotarod

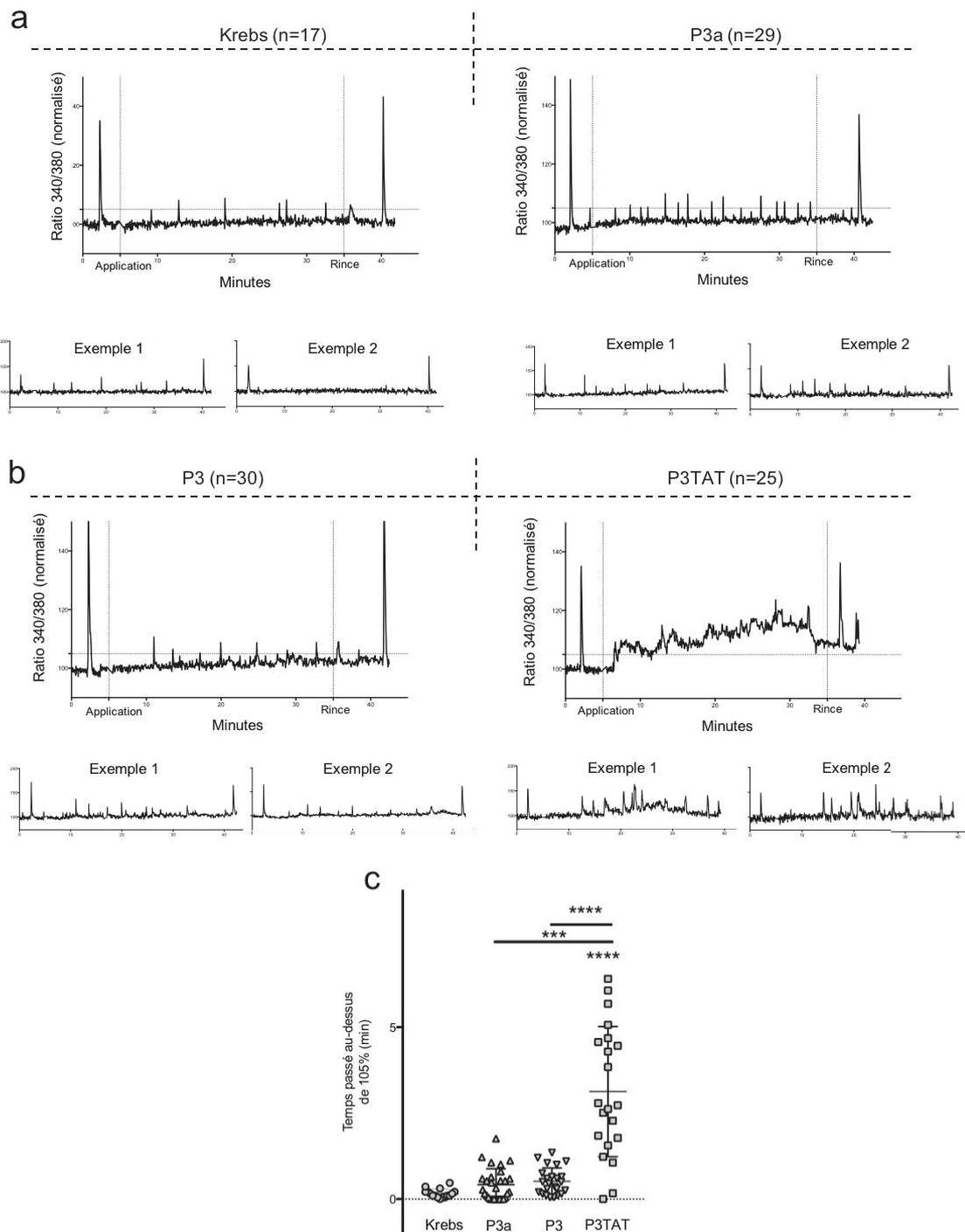


*Cette figure représente l'évolution du score de Rotarod entre des souris WtNT et des souris WtP3a. L'analyse statistique a été réalisée avec un Two-way Anova. P3a a un effet significatif, $p^{***}=0,0007$.*

Afin d'infirmer ou de confirmer un éventuel effet de P3a sur les Wt, nous avons observé l'effet de P3a en imagerie calcique sur des neurones d'hippocampes. Les résultats sont présentés dans la Figure II-53a et c.

Bien que nous observons une tendance à l'augmentation du nombre d'entrées calciques, P3a ne semble pas avoir d'effet statistiquement significatif. Nous avons également observé l'effet d'autre forme de P3 et notamment la forme non acétylé (P3) et P3 conjugué avec TAT (P3TAT). Les résultats sur l'activité calcique sont présentés dans la Figure II-53b et c.

Figure II-53 Effet de l'application de P3 et de ses différentes formes sur l'activité calcique de neurones d'hippocampe

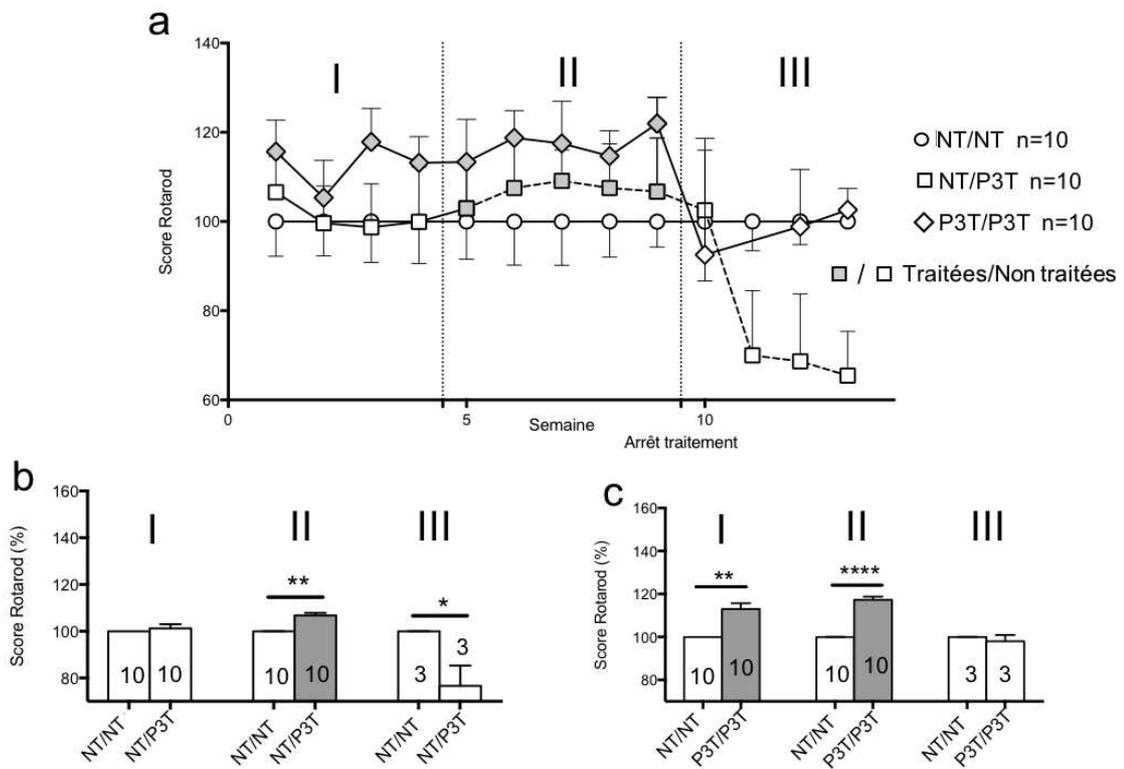


Action de différentes formes de P3 sur l'activité de calcique. Les tests sont effectués sur des cellules neuronales d'hippocampe en culture de 15 jours. La concentration de calcium intracellulaire (changements de $[Ca^{2+}]_i$) ont été mesurés dans les neurones à l'aide de la sonde calcique fura-2. Le rapport de fluorescence Fura-2 après excitation à 340 ou 380 nm (F340/F380) a été normalisé à la ligne de base (2 premières minutes). Du DHPG (50 mM) a été appliqué à 2.5 min. À 5 min, le débit de perfusion a été arrêté et 1 ml de milieu extracellulaire contenant ou non du P3a (10 mM) ou P3 (10 mM) ou P3TAT (10mM) a été appliqué. Après 25 min, le débit de perfusion a été rétabli pour laver. Enfin, les cellules ont été soumises à nouveau à du DHPG (50 mM). Pour chaque condition, deux traces exemple sont données en-dessous de chaque trace moyenne. a-Condition contrôle avec l'application de Krebs (gauche) et application de P3a (droite). b-Application de P3 (gauche) et application de P3TAT (droite). c- Représentation du temps passé (en min) au-dessus du seuil de 105% de l'activité basal (100%) pour chaque condition. L'analyse statistique a été réalisée avec un Kruskal-wallis suivi d'un post-hoc avec le test de Dunn. P3TATvsKrebs, $p^{****}<0,0001$; P3TATvsP3, $p^{****}<0,0001$; P3TATvsP3a, $p^{***}=0,0009$.

Sur cette Figure II-53, nous observons que P3 a un effet similaire à l'application de P3a. Néanmoins, nous observons que P3TAT a un effet significatif sur les entrées de calcium dans les neurones statistiquement souligné dans la Figure II-53c. Des exemples de profils d'activités calciques sont également présentés pour chaque condition.

Afin de vérifier cet effet, nous avons testé P3TAT délivré par Aonys[®] sur les souris sauvages (P3T). Pour cela nous avons utilisé trois groupes de 10 souris Wt âgées de 12 semaines pour lesquelles nous avons suivi l'évolution de l'activité motrice au cours de 13 semaines. Les résultats sont présentés dans la Figure II-54.

Figure II-54 Effet de P3T sur l'évolution du score de Rotarod de souris sauvages



Cette figure représente l'évolution du score de Rotarod de 3 groupes de souris sauvages traités avec P3TAT dans Aonys[®] ou non (seulement avec Aonys[®] vide) (NT). I, II et III représentent différentes étapes de l'expérience. a- Pendant les 5 premières semaines (I), le groupe NT/P3T (carré sur le graphique) n'est pas traité, le groupe P3T/P3T (losange) si. De la 5^{ème} à la 10^{ème} semaine (II) les deux groupes NT/P3T et P3T/P3T sont traités. Après la 10^{ème} semaine, les deux groupes NT/P3T et P3T/P3T ne sont plus traités. Le groupe contrôle (rond) n'est jamais traité. b, c- Représentent les scores de Rotarod obtenus dans chaque période I, II, III pour chaque condition par rapport au WtNT. Les analyses statistiques sont réalisées avec un test de Mann-Whitney. b- II : NT/NTvsNT/P3, $p^{**}=0,0075$; III : NT/NTvsNT/P3, $p^{*}=0,041$. c- I : NT/NTvsP3T/P3T, $p^{**}=0,0089$; II : NT/NTvsP3T/P3T, $p^{****}<0,0001$.

Le groupe contrôle a été traité dès le début de l'expérimentation avec des microémulsions de type Aonys[®] vides (NT/NT). Un autre groupe a été traité avec Aonys[®] contenant P3T à partir de la 5^{ème} jusqu'à la 10^{ème} semaine (NT/P3T). Et un groupe traité dès la première semaine avec Aonys[®] contenant P3TAT jusqu'à la 10^{ème} semaine (P3T/P3T).

De manière intéressante, les souris NT/P3T dont le traitement commence à la 5^{ème} semaine et finit à la 10^{ème} ont de la 1^{ère} à la 4^{ème} (I) semaine un score similaire au souris NT/NT, mais de la 5^{ème} à la 9^{ème} (II) semaine ce score est significativement plus élevé. De la même manière, on observe chez les souris P3T/P3T dont le traitement dure de la 1^{ère} à la 10^{ème} semaine un score significativement plus important par rapport au score obtenu avec les NT/NT. De plus, lorsqu'on arrête le traitement à la 10^{ème} semaine (III) les P3T/P3T retrouvent des valeurs normales, tandis que les NT/P3T obtiennent des valeurs beaucoup plus basses que celles des souris contrôles. En revanche, nous n'avons pas d'effet de P3a sur le poids des souris (Données supplémentaires 5). Nous avons également analysé la transmission synaptique, avec la mesure de LTP, du PPR (*paired pulse ratio*) mais également la pente du courbe I/O (input/output), mais aucun de ces paramètres ne varient chez les souris traitées avec P3T par rapport aux souris contrôles (Données supplémentaires 6).

Finalement, les études de P3a et de la bithérapie P3a/P42T nous apportent quelques informations. En effet, malgré le fait que les données sur la cohorte traitée par P3a ne permettent pas de savoir si P3a seul a un effet ou non, on observe que la bithérapie P3a/P42T semble amplifier à certains égards l'effet protecteur de P42T seul. De plus, l'étude de P3 en condition physiologique a révélé que P3 pouvait avoir un effet important en particulier conjugué avec TAT. Un traitement par P3TAT qui semble plus actif aurait donc plus de chance de se montrer efficace. Ceci soulève néanmoins une question concernant l'action de P3 en condition sauvage. Le groupe d'Edwin Chan [192] observe que l'affinité de P3 avec un domaine PolyQ augmente avec le nombre de PolyQ, et est donc particulièrement importante avec un ARN codant pour un large PolyQ. Néanmoins, Zhang *et al* [192] montrent également que P3 interagit avec des ARN codant pour des PolyQ plus petits notamment avec un ARN codant pour un PolyQ 27 glutamines. Des PolyQ de cet ordre de grandeur sont physiologiquement présents dans l'organisme, par exemple dans la Htt. P3 pourrait donc avoir des effets secondaires passant par une interaction avec les ARN codant pour ces domaines PolyQ, ce qui pourrait expliquer ce que l'on observe en condition physiologique.

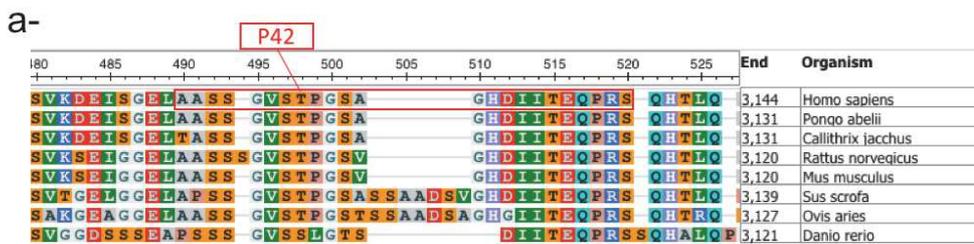
Chapitre III. Discussion générale

Ma thèse a consisté à mieux comprendre comment P42, une partie de la Htt, protège des phénotypes pathologiques induits dans des modèles de la maladie de Huntington (MH). Ceci a été effectué dans le but de notamment optimiser son pouvoir thérapeutique. Mes travaux se sont donc logiquement articulés autour de deux axes. Un axe plus fondamental qui s'intéressait à l'effet de P42 sur la transcription du BDNF et ou de TrkB, mais également, sur le transport le long des axones de DNT1 l'homologue du BDNF chez la drosophile, que ce soit en condition pathologique de MH mais également en condition physiologique. Puis, un second axe concernant une recherche plus appliquée, portait sur l'observation de l'effet thérapeutique de P42T chez des souris R6/2, le suivi de son effet grâce entre autres au Hamlet[®], et son optimisation avec un traitement de bithérapie avec les peptides P42 et P3.

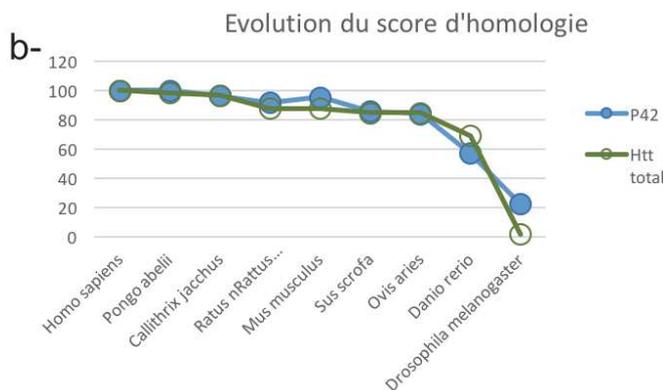
Partie 1. Axe : recherche fondamentale

L'axe fondamental de mes recherches concerne en particulier l'effet de P42 sur différents mécanismes connus pour être dépendants de la Htt et/ou affectés par la mHtt. En effet P42 est un domaine de la Htt, une séquence endogène présente naturellement dans de nombreux vertébrés et relativement bien conservée, de l'Homme jusqu'aux poissons zèbres en passant par la souris comme on peut le voir dans la Figure III-1a.

Figure III-1 Evolution et conservation du domaine P42



a- Représentation de la séquence de P42 dans différentes espèces de vertébrés. b- Evolution du score d'homologie du P42 humain en fonction des espèces.



L'alignement des séquences avec Blast (NCBI) permet le calcul d'un score d'alignement qui prend en compte le nombre de similarités mais également le nombre de substitution et la taille des « gaps ». Ainsi, on note qu'avec *Pongo abelii*, un hominidé tout comme *homo sapiens* le score est maximum. Puis ce score diminue plus ou moins progressivement au fur et à mesure que l'on s'éloigne de l'Homme d'un point de vue phylogénique, comme on peut le voir sur la Figure III-1b. Ceci montre que P42 tout comme la Htt en général est un domaine très conservé au sein des vertébrés. De plus par rapport aux invertébrés et notamment la drosophile, on observe que P42 est beaucoup plus conservé que le reste de la Htt.

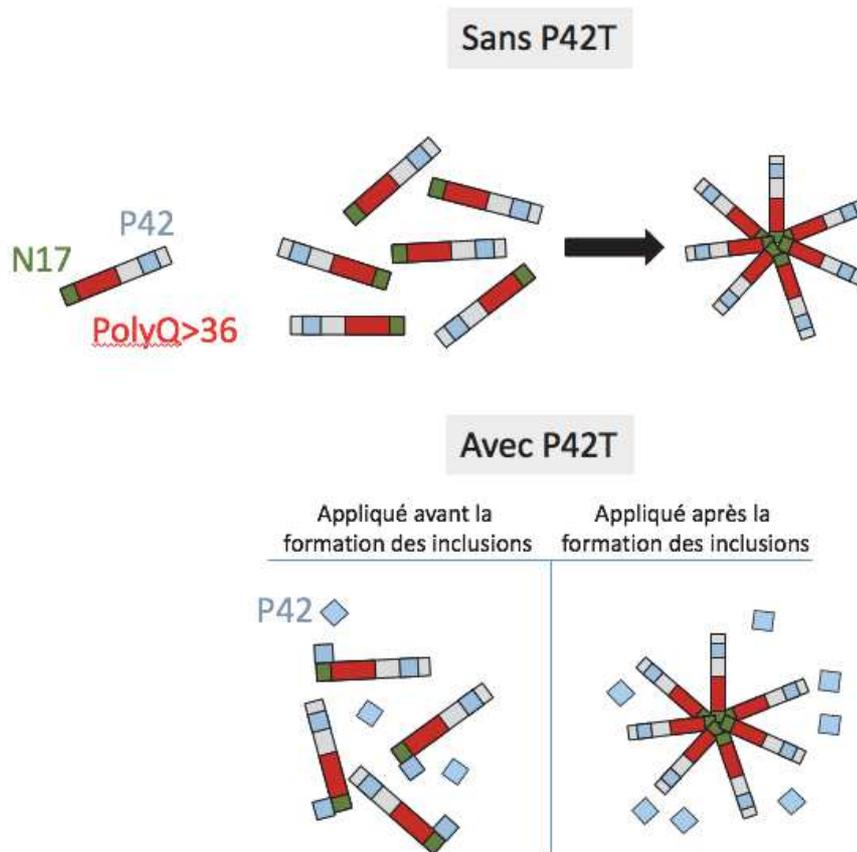
Les propriétés de ce domaine de la Htt composé de 23 acides aminés, situé chez l'homme de la position 480 à la 502 ont été identifiées dans l'équipe de Florence Maschat [27]–[29]. Bien que peu étudiée par ailleurs [5], [193] deux sites de phosphorylation ont néanmoins été recensés par Watkin *et al* [194] sur la Thréonine 488 et la sérine 491. De nombreux sites de clivages ont également été référencés autour de ce domaine P42 et notamment les plus proches en position 469 avec un site de clivage à la calpaïne et en 513 avec un site de clivage aux caspases [5], [193], suggérant que dans certaines conditions les coupures au niveau de ces sites de clivages permettraient de former un peptide endogène comprenant P42.

Mais que ce soit en tant que peptide isolé ou en tant que partie intégrante de la Htt, la question du rôle de P42 reste ouverte. Dans le cadre de ma thèse j'ai été amené à observer l'effet de P42 sur de nombreux mécanismes impliquant la Htt normale ou la mHtt. J'ai notamment analysé son implication dans le phénomène d'agrégation, mais aussi dans la voie du BDNF/TrkB ou encore dans le transport vésiculaire.

III.1.1. P42 en condition pathologique

P42 a précédemment été montré comme capable d'empêcher la formation de gros agrégats ou d'inclusions [27]–[29] dans plusieurs modèles de MH. Les résultats présentés dans ma thèse montrent que P42 appliqué en post-symptomatique chez la souris donc après la formation de ces inclusions n'est pas capable de les éliminer, ce qui confirme le fait que P42 agit sur les inclusions en empêchant leur formation et non pas en favorisant leur dégradation. Les inclusions semblent être formées par l'interaction des domaines N-17 (les 17 premiers acides aminés de la Htt) entre eux [42]. Or des résultats préliminaires réalisés dans notre équipe semblent montrer que P42 interagirait *in vivo* (directement ou *via* un intermédiaire) avec N17. Si cela est confirmé ce résultat suggérerait que P42 appliqué avant la formation de ces inclusions pourrait se fixer au domaine N-17, bloquant ainsi leurs interactions et la formation d'inclusions. Appliqué après la formation des inclusions P42 n'aurait plus cet effet. Ce modèle est schématisé dans la Figure III-2.

Figure III-2 Modèle de l'interaction P42/N17 et de son importance dans l'agrégation



Cependant mes résultats montrent que P42T appliqué en post-symptomatique aurait un effet sur plusieurs phénotypes induits dans la MH, sans que ceci soit associé à une diminution du nombre d'inclusions.

En effet j'ai analysé dans un modèle murin de MH : les souris R6/2, la taille des ventricules dans le cerveau, plusieurs phénotypes comportementaux, la plasticité synaptique et l'expression de certaines protéines, en particulier le taux de TrkB dans le striatum. Tous ces paramètres affectés en condition de MH étaient sauvés, pour certains partiellement pour d'autres complètement par un traitement par P42 sans pour autant diminuer la quantité d'inclusions. L'effet positif de P42 sur ces paramètres passe donc par une voie indépendante de son effet sur le processus d'agrégation. Bien que nous ayons observé que le traitement par P42 permettait de sauver de manière précoce le taux de protéines TrkB dans le striatum, d'autres expérimentations doivent être réalisées pour savoir à quel niveau P42 agit sur la physiologie de TrkB. De plus j'ai analysé le transport de DNT1, l'homologue du BDNF chez la drosophile [182]. Nous avons observé qu'en condition mutante le transport de DNT1 était altéré comme de nombreux autres « cargos » transportés le long des axones dans les neurones

[81], [82], [87], [184], [195] dont NPY [27]. Nous avons également observé que l'expression de P42 permettait de protéger de certaines altérations du transport vésiculaire induites par l'expression de la mHtt. Nous notons que P42 semble permettre de rétablir le déplacement antérograde et également la vitesse de déplacement des vésicules le long des axones.

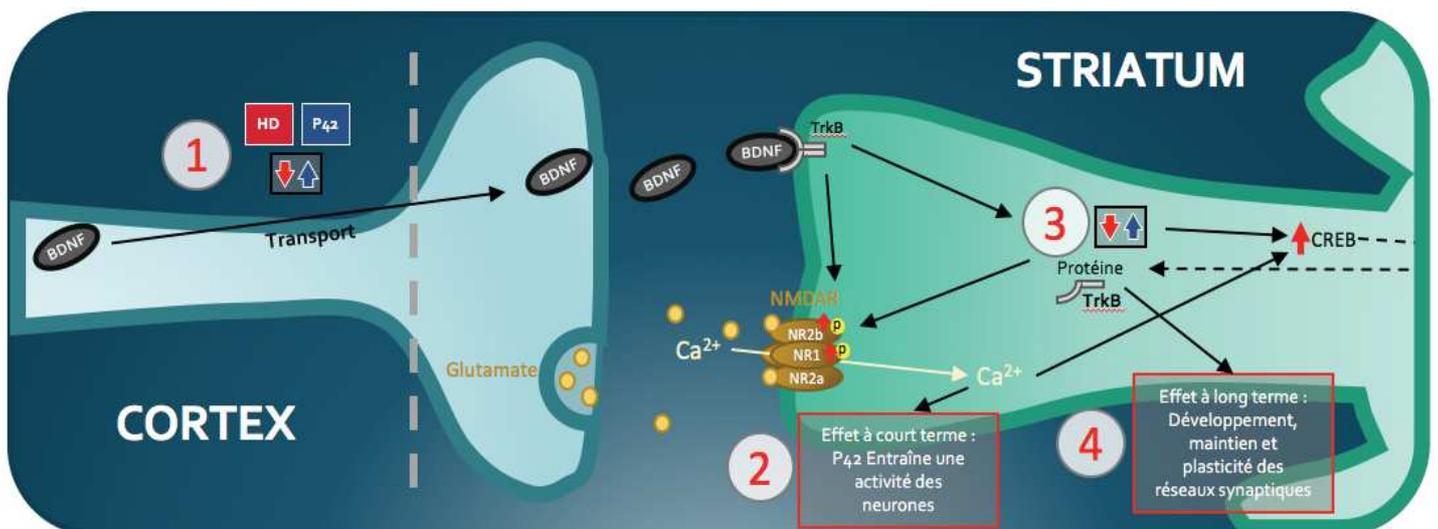
Ces différents éléments nous permettent d'envisager que P42 rétablit de nombreux phénotypes pathologiques soit en agissant sur l'expression de TrkB soit pourrait agir plus indirectement en rétablissant le transport de BDNF dans le cortex sans améliorer pour autant son taux de transcription, ce qui favoriserait la libération de BDNF vers le striatum, activerait TrkB et favoriserait également indirectement son expression dans cette structure.

Cette dernière hypothèse est corrélée avec les derniers travaux de l'équipe de Frédéric Saudou [184]. Ces travaux sont axés autour de la modélisation d'une liaison corticostriatale grâce à un système de chambre microfluidique. En utilisant ce système ils ont pu observer que l'état des neurones du cortex (mutants ou sauvages) ont un effet dominant sur les neurones du striatum. Et notamment que des neurones corticaux sauvages entraînent une activité normale des neurones striataux même s'ils expriment la mHtt.

Ces résultats montrent que le bon fonctionnement de l'élément pré-synaptique, les neurones corticaux, est crucial pour l'activité physiologique du striatum.

Dans notre cas la restauration du transport et notamment du mouvement antérograde du BDNF vers la jonction corticostriatale pourrait être l'élément déclencheur de toute une cascade d'événements corroborés par les résultats que j'ai obtenu pendant la thèse, comme schématisé sur la Figure III-3.

Figure III-3 Schéma du modèle de l'effet de P42 sur le transport du BDNF et de ses conséquences



1-P42 rétablit le transport de BDNF et ainsi augmente la libération de BDNF dans la fente synaptique. 2-L'activation de TrkB entraîne l'activation des récepteurs NMDA via une phosphorylation des sous-unités NR2b et NR1, et des entrées de calcium dans les neurones striataux. 3-L'activation de TrkB entraîne indirectement une augmentation de la protéine TrkB. 4-À long terme ces effets entraînent des effets sur le développement, le maintien et la plasticité des réseaux synaptiques.

Ainsi, comme illustré sur le schéma ci-dessus, l'augmentation du transport antérograde de BDNF par P42 dans les neurones corticaux (1 sur la figure) entraînerait une augmentation de libération de BDNF dans la fente synaptique corticostriatale. Augmentant ainsi l'activation de TrkB dans le striatum [196], ce qui a de nombreuses conséquences. Entre autres, premièrement, cette activation de TrkB permet l'augmentation du calcium intracellulaire *via* des interactions avec les domaines intracellulaires des récepteurs NMDA au glutamate [129], [130], expliquant les rapides variations de courants calciques intervenant lors de l'application de P42 (2). Deuxièmement cette activation de TrkB permettrait également de manière indirecte l'augmentation de la protéine TrkB dans le striatum (3) ce que nous avons observé dans le striatum des souris traitées par P42T. Ceci pourrait résulter soit de l'augmentation de l'activité de CREB, qui entraîne une augmentation de la transcription de nombreux gènes dont le gène codant pour TrkB [197] soit de la traduction locale d'ARNm latents de *trkB* [198]. Ces résultats confirment l'effet observé de P42 en électrophysiologie sur l'élément postsynaptique. Cette augmentation de TrkB augmenterait l'interaction BDNF/TrkB au niveau de la jonction corticostriatale. À long terme cela permettrait une meilleure signalisation de la voie BDNF/TrkB ce qui entrainerait une amélioration des nombreux phénotypes observés en condition pathologique de MH (4).

Néanmoins il est important de contraster cette interprétation avec les éléments suivants. Premièrement, l'éventuelle restauration du transport du BDNF n'impliquerait pas la restauration de sa transcription, la quantité de BDNF délivré au striatum serait donc en dessous de ce qui se produit de manière physiologique ce qui expliquerait que certains phénotypes ne soient que partiellement restaurés avec un traitement par P42T. Deuxièmement, malgré les résultats observés par l'équipe de Frédéric Saudou [184], certains éléments propres à l'élément post-synaptique ne semblent pas dépendre de l'élément pré-synaptique comme la sensibilité des récepteurs NMDA et l'adressage de TrkB à la membrane, ce qui pourrait impliquer le fait que le seul rétablissement de l'élément pré-synaptique *in vivo* ne soit pas toujours suffisant pour rétablir entièrement la liaison corticostriatale.

Pour confirmer/infirmer ces hypothèses différentes expérimentations peuvent être envisagées comme par exemple l'utilisation d'antagonistes du BDNF spécifiques à TrkB en présence de P42, expériences que nous avons initiées, ou encore la mesure des taux de protéines/transcrits après l'application directe de P42TAT par exemple sur des neurones en culture. De plus l'étude des récepteurs de DNT1 chez la drosophile : Kek6 et Toll7 [199] récemment découverts, et l'étude de l'effet de P42 sur ces deux protéines permettrait

potentiellement de mieux identifier l'effet de P42 sur la voie BDNF/TrkB et identifier les différents protagonistes. Finalement il serait intéressant de confirmer les résultats obtenus chez la drosophile concernant le transport de DNT1 en observant le transport de BDNF en utilisant le système de culture de neurones de souris dans des chambres microfluidiques présenté plus tôt.

Néanmoins une question subsiste : comment P42 rétablit le transport vésiculaire au niveau moléculaire ? Des éléments de réponse peuvent être apportés en mettant en relief les résultats que nous avons obtenus sur le transport de DNT1 et les travaux de Gauthier *et al* [81] sur l'interaction Htt et HAP1 au sein même du complexe moteur, mais aussi avec les travaux de Zala *et al* [197] sur la vitesse des vésicules et les travaux de Colin *et al* [82] sur le sens de déplacement des vésicules.

Gauthier *et al* observent que la Htt interagit à travers HAP1 avec la Dynactine et favorise la formation des complexes moteurs impliquant la Dynéine et la Kinésine. Ceci a pour conséquence d'augmenter le nombre de vésicules de BDNF circulantes le long des microtubules. L'expression d'une Htt avec un trop long domaine PolyQ entraîne l'altération de cette interaction. Colin *et al* [82] montrent que la phosphorylation de la S421 de la Htt favorise le déplacement des vésicules dans le sens antérograde au détriment du déplacement rétrograde. Zala *et al* [85] observent que l'absence de Htt diminue la vitesse des vésicules entre autres de BDNF le long des microtubules. En effet la Htt favorise la fixation de GAPDH au niveau des vésicules, permettant ainsi la production locale d'énergie nécessaire au déplacement des vésicules.

Nous montrons que l'expression d'une mHtt entraîne à la fois une augmentation du nombre de vésicules de DNT1 en pause et une diminution de la vitesse des vésicules, ce qui pourrait être expliqué par un effet dominant négatif, la mHtt empêchant le fonctionnement physiologique de la Htt endogène.

En condition pathologique induite par l'expression d'une mHtt, l'expression de P42 permet de rétablir la vitesse de déplacement des vésicules altérée par l'expression de mHtt. P42 pourrait agir soit en interagissant directement avec la GAPDH et la vésicule soit en bloquant l'effet dominant négatif de la mHtt. De plus P42 permet également d'augmenter le nombre de vésicules circulantes et de rétablir le mouvement antérograde diminué lors de l'expression d'une mHtt. Là encore soit P42 interagit directement avec le complexe moteur soit bloque l'effet négatif de la mHtt potentiellement par une interaction entre la mHtt et P42.

III.1.2. P42 en condition physiologique

Afin d'en apprendre davantage sur le fonctionnement de P42 nous avons également observé l'effet de P42 en condition physiologique, sans la présence de mHtt.

Lorsque nous avons observé le transport de vésicules de NPY chez la drosophile nous n'avons pas observé d'effet dû à la seule expression de P42. Et tandis que la Htt normale augmente le nombre de vésicules circulantes, la coexpression de cette même protéine avec P42 bloque cet effet, favorisant ainsi l'hypothèse d'une interaction entre P42 et la Htt.

Partie 2. Axe : recherche appliquée

Une partie des recherches étaient orientées vers une recherche plus appliquée. Premièrement nous avons observé que le traitement par P42T permet de ralentir le développement de la maladie chez la souris même lors de traitements à un stade relativement avancé de la maladie. Ces résultats s'ajoutent à ceux observés par Arribat *et al* (Y2) qui montrent que le peptide a un effet protecteur lorsqu'il est appliqué à des stades précoces de la maladie. D'un point de vue thérapeutique cela implique que P42T pourrait être utilisé non seulement en prévention de la MH mais également lorsque les premiers symptômes sont déjà apparus. Ces résultats sont particulièrement importants surtout lorsqu'ils sont mis en relief avec les résultats des études des populations qui montrent que 1 personne sur 400 aurait plus de 36 CAG [4] et les études qui soulignent le phénomène d'instabilité des répétitions des CAG [14]. En effet l'ensemble de ces données montrent qu'il pourrait y avoir, ces prochaines années, une augmentation de cas de MH sans antécédents familiaux et donc seulement détectables une fois les premiers symptômes apparus.

Deuxièmement nous avons étudié le développement de la MH et du traitement par P42T des souris R6/2 à l'aide du Hamlet test[®]. Le Hamlet est un test permettant un suivi longitudinal de différents phénotypes comportementaux, moteurs, psychiatriques et cognitifs. Grâce au Hamlet nous avons pu observer l'efficacité de P42T mais également ses limites dans le temps. Ces données peuvent être le point de départ de plusieurs études orientées sur l'optimisation du traitement et de son effet dans le temps, que ce soit par une augmentation de dose, un changement de l'administration ou de bithérapie avec d'autres agents.

Troisièmement nous avons observé l'effet d'une bithérapie de P42 avec P3. P3 est un peptide permettant de bloquer l'effet toxique de l'ARN codant pour les domaines PolyQ trop importants. L'intérêt d'une bithérapie P42/P3 réside dans le fait que P42 agirait plus sur les dérèglements au niveau de la protéine mHtt et P3 sur les problèmes dus au transcrits de la mHtt. Néanmoins les résultats obtenus avec P3 ne sont pas concluants et les résultats avec la bithérapie ne sont pas aussi importants que ce que l'on attendait mais sont néanmoins

encourageants. L'utilisation de P3 conjugué avec TAT a montré *in cellulo* qu'il était plus actif que P3 seul. Un traitement et une bithérapie avec P3TAT pourrait s'avérer plus efficace qu'avec P3 seul.

De plus, l'une des raisons de l'arrêt du développement du BDNF en tant qu'agent thérapeutique pour la MH est que dans la MH il y a un problème au niveau de sa transcription mais également de son transport. Or les résultats de mes recherches montrent que P42 pourrait rétablir le transport de BDNF ce qui pourrait entraîner un regain d'intérêt à l'utilisation du BDNF en bithérapie avec P42. Quelques études préliminaires que j'ai réalisées appuient cette hypothèse. Le Hamlet qui est de par nature un environnement ultra-enrichi, augmenterait le taux de BDNF. J'ai observé que des souris R6/2 traitées par P42T et entraînées au Hamlet avaient une meilleure coordination motrice que des souris R6/2 mais également que des souris R6/2 seulement traitées par P42T ou des souris R6/2 seulement passées au Hamlet.

Partie 3. Conclusion générale

La Huntingtine est une protéine ayant de nombreux rôles dans la physiologie de l'organisme et sa mutation est responsable de la maladie de Huntington. L'étude de P42, partie de la Huntingtine et protecteur de certains phénotypes pathologiques induits dans la maladie de Huntington, tient autant de la recherche fondamentale que de la recherche appliquée.

D'un point de vue fondamental nous avons pu constater que P42 agissait sur la voie de signalisation du BDNF en augmentant les taux de transcrits et de protéines du BDNF ou de son récepteur TrkB le long de l'axe corticostriatal dans le modèle de la maladie de Huntington que sont les souris R6/2. De plus les études sur la drosophile ont permis de mettre en évidence que P42 permettait de restaurer le transport de DNT1 l'homologue du BDNF altéré en présence de Huntingtine mutante.

Ces résultats nous permettent de penser que P42 va principalement rétablir le transport de BDNF et restaurer ainsi en partie la voie de signalisation BDNF/TrkB élément clef dans la maladie de Huntington

Actuellement aucun traitement n'est encore disponible pour soigner cette maladie. L'intérêt de trouver et de développer une molécule protectrice de la maladie est donc grand. Une partie de ma thèse était consacré à l'analyse et à l'optimisation de P42 en tant qu'agent thérapeutique. Ce que j'ai observé est que P42 est capable d'agir une fois les premiers symptômes apparus montrant ainsi que son utilisation dans des stades avancés de la maladie de Huntington est d'un point de vue thérapeutique très intéressant.

Matériels et méthodes

Synthèse peptidique et formulation

Pour assurer la diffusion de P42, nous avons conçu un peptide de fusion où P42 (un peptide de 23aa) a été conjugué au peptide pénétrant TAT de 11aa (YGRKKRRQRRR). Le peptide P42TAT (AASSGVSTPGSAGHDIITEQPRS-GG-YGRKKRRQRRR) a été synthétisé et purifié par la société GenScript. Le peptide de fusion P42TAT (GenScript, pureté > 95%) est dilué dans l'eau et cette solution est mélangée à un mélange lipidique (technologie Aonys[®], Medesis Pharma, Baillargues) composé de lipides polaires spécifiques auto-assemblés, de tensioactifs et de co-tensioactifs lécithine et éthanol (teneur en eau finale de 12%). Après quelques secondes de mélange, une micro-émulsion eau-dans-huile (inverse) se forme. Ces microémulsions répondent aux critères d'un fluide newtonien (liquide limpide et isotrope). Les microémulsions Aonys[®] sont conçues pour l'administration d'ingrédients pharmaceutiques actifs, appelés ici traitement P42T, par application sur la muqueuse buccale et rectale.

Souris transgéniques R6/2 et traitement P42T

Des procédures de soins et de traitement des animaux ont été réalisées dans les soins des animaux de l'Université CECEMA, conformément aux directives du Ministère de l'Agriculture (accord : D34-172-13).

Le modèle de souris R6/2, basé sur l'expression de l'exon 1 humain étendu de polyQ est un modèle bien caractérisé montrant des symptômes précoces et aigus et conduisant à une mort prématurée à l'âge de 3 mois. Initialement, des mâles R6/2 hétérozygotes ont été obtenus auprès de Jackson Laboratory (stock 006494) et croisés avec des femelles C57BL/6-CBA. Les souris ont été génotypées par PCR en utilisant un ADN de queue, avec les amorces suivantes : Sens-50-CGGCTGAGGCAGCAGCGGCTGT-30;

Antisens-50-GCAGCAGCAGCAGCAACAGCCGCCACCGCC-30.

Les femelles issues des croisements ont été traitées de la semaine 2 à la semaine 12 (traitement pré-symptomatique), tandis que les mâles issus des croisements ont été traités à partir de la semaine 7 (traitement post-symptomatique) jusqu'à la semaine 12. À la semaine 13, les souris ont été sacrifiées et les structures cérébrales disséquées et congelées. Les cohortes ont été divisées en plusieurs groupes comprenant des souris Wt et R6/2, traitées avec une microémulsion AonysVR (NT) vide ou avec des microémulsions P42TAT-AonysVR. Les administrations ont été effectuées 5 jours par semaine, à la même heure de la journée. Des traitements avec des microémulsions vides ou contenant du P42TAT (traitement P42T) (1 ml/kg, et un peptide dosé à 1200 mg/kg) ont été administrés par 2 injections à travers des dépôts de muqueuse buccales et rectales.

RT-qPCR

Les zones cérébrales de souris disséquées ont été congelées et homogénéisées dans du réactif TRIZOL (Ambion), suivi par une extraction d'ARN comme indiqué par le fabricant. Après centrifugation, traitement au chloroforme et précipitation, le culot a été remis en suspension et les échantillons traités par DNase1. Des quantités égales d'échantillons d'ARN (1 mg) ont été

transcrites et l'ADNc a été mélangé avec LightCycler 480 SYBRGreen et amplifié dans un système RT-PCR LightCycler, avec les amorces suivantes :

BDNF Exon IV: forward-5' -CAGAGCAGCTGCCTTGATGTT-3' ; reverse-5' -GCCTTGTCCTGGACGTTTA-3'

TrkB Transcrit variant 1 de EMBL/GenBank m55291, 2026 : forward-5' -GTTGGCGAGACATTCCAAG-3' ; reverse-5' -GGGGGTTTTCAAT GACAGG-3'

Actine : forward-50 -GCCAGAGCAGTAATCTCCTTCT-3' ; reverse-5' -AGTGTGACGTTGACATCCGTA-3'.

Chaque échantillon a été analysé en triplicat et la quantification relative a été normalisée par rapport à la β -actine en tant que gène de référence. Les données ont été exprimées en % par rapport aux souris Wt (100%).

Western blot

Différentes zones de cerveaux de souris ont été disséquées et congelées. Les échantillons ont été homogénéisés sur de la glace dans du tampon de lyse (Tris-HCl 100 mM pH 7,2, NaCl 400 mM, EDTA 4 mM, Triton 0,2%, NaN₃ 0,05%, gélatine 0,5%, PMSF 1 mM, anti-Protéase 1 X (Complete™, Mini, EDTA-free, Sigma-Aldrich). Après une centrifugation de 10 min à 15 000g à 4°C, les surnageants ont été recueillis et les concentrations de protéines ont été évaluées. Le contenu en protéines a été quantifié avec le kit BCA Protein Assay (Pierce). Un total de 50 mg de protéines totales a été chargé dans un gel de polyacrylamide à 4-15% (gels préfabriqués Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™, Bio-Rad). Le système Stain-Free™ utilise des gels d'acrylamide de 2,2,2-trichloroéthanol afin de quantifier les niveaux de protéines totaux chargés pour chaque puit. Après la migration, les gels ont été activés par exposition aux UV (45 s) et imagés avec le système Chemidoc (Bio-Rad). Les gels ont ensuite été transférés sur une membrane de nitrocellulose de 20 mm (Amersham™, Protran™, GE Healthcare). Les blots ont été bloqués dans du PBST (1X PBS, 0,1% Tween 20) contenant 5% de lait écrémé en poudre pendant 30 min et incubés avec des anticorps primaires pendant une nuit à 4°C. Le BDNF a été détecté en utilisant un anticorps AB1534 (1: 500, Merck) dilué dans du lait PBST 5%. La protéine TrkB a été détectée en utilisant un anticorps sc-12 (1: 300, Santa Cruz) dilué dans du lait PBST à 5%. Après trois lavages de 5 minutes avec du PBST, les membranes ont été incubées pendant 1 h avec l'anticorps anti-lapin conjugué à l'HRP 111-035-144 (1: 5000, Jackson Immunoresearch) pour visualiser les anticorps BDNF ou TrkB, puis lavés trois fois 5 min. Pour visualiser le signal, les membranes ont été incubées dans le substrat Clarity™ Western ECL (Bio-Rad) pendant 5 min, et photographiées avec le système Chemidoc (Bio-Rad). Pour quantifier, le logiciel Biorad calcule le facteur de normalisation pour chaque puit par rapport à la référence (le puit Wt NT), en définissant un facteur de normalisation. Ensuite, le logiciel quantifie l'intensité de chaque bande dans les différents puits et la valeur normalisée évaluée pour chaque puit.

Analyses histologiques

Des coupes coronales de cerveau d'une épaisseur de 50 μ m ont été coupées avec un microtome électronique (Microm HM 650 V). Des coupes de -0,60 à -0,80 mm du bregma ont été utilisées pour les immunomarquages avec des anticorps monoclonaux anti-Htt (MAB5374, 1: 1000, Millipore) et DAPI.

Pour chaque animal, des photos ont été prises avec le scanner à lames Hamamatsu nanozoomer. Les aires des ventricules latéraux ont été mesurées avec un logiciel NDP (Nanozoomer Digital Pathology Virtual SlideViewer). La mesure de la taille des ventricules a été faite à l'aide de la macro présentée dans Données supplémentaires 7.

Les quantifications du nombre et de la taille des agrégats ont été notées avec le logiciel ImageJ à partir d'images de 256 μm x 256 μm . Des images représentatives de ces immunomarquages obtenues avec le microscope confocal (Leica SPE) sont montrées. Le comptage des agrégats a été réalisé à l'aide de la macro présentée dans Données supplémentaires 8.

Test de coordination motrice

La coordination motrice a été évaluée à l'aide d'un Rotarod (Stoelting, Ugo Basile, Varese, Italie), chaque semaine, à partir de la semaine 4. Le premier jour, les souris ont été entraînées à une vitesse d'accélération de 4,5 à 40 tours par minute. Par la suite, deux essais ont été effectués pendant deux jours consécutifs. Dans chaque essai, les souris ont été placées sur le Rotarod à une vitesse constante de 4,5 tr / min pendant 5 s, accéléré à une vitesse constante, jusqu'à 40 tr / min, pendant un maximum de 5 min. L'essai quotidien était composé de deux séances de 5 min séparées par 5-10 min. La latence pour tomber du Rotarod a été enregistrée chaque jour pour chaque souris, et la moyenne des deux derniers essais a été utilisée pour l'analyse statistique.

Test d'anxiété

L'anxiété a été évaluée dans avec le test boîte noire/boîte blanche. L'appareil se compose de deux compartiments en PVC, l'un avec un sol et des murs blancs (30 cm x 25 cm x 25 cm de hauteur), l'autre avec des murs et un toit noir. Une porte à guillotine sépare les deux compartiments. Le compartiment transparent est intensément éclairé. Chaque souris (âgée de 9 semaines) a été placée dans le compartiment transparent et l'activité exploratoire a été enregistrée sur bande vidéo pendant 10 min. Le temps total passé et le nombre d'entrées dans le compartiment obscur ont été enregistrés et analysés à l'aide du logiciel Videotrack[®] (Viewpoint, Lissieu, France).

Test de mémoire

Des souris âgées de 9 et 11 semaines ont été utilisées pour le test de reconnaissance d'objet en champ ouvert. L'appareil de test est un champ ouvert (50 cm x 50 cm x 50 cm de hauteur). Le test est composé de trois sessions. Session 1 (habituation) : les souris explorent librement le champ pendant 10 min. Session 2 (entraînement) : deux objets identiques ont été placés dans le champ et les souris ont exploré pendant 10 min. Session 3 (test) : 1 h après l'entraînement, un des objets a été remplacé par un nouveau alors que l'autre est resté inchangé et les souris ont exploré pendant 10 min. Pendant chaque session, les mouvements des animaux ont été enregistrés en utilisant les logiciels VideotrackVR et NosetrackVR (Viewpoint). Pendant les sessions 2 et 3, le nombre de contact du nez avec les objets a été mesuré et les résultats ont été exprimés en distance parcourue (en cm), en % du temps passé dans les zones et en indice de reconnaissance préférentielle en position 2 sur le nombre total de contacts avec les deux objets, exprimé en pourcentage. Notez que les souris R6/2 ne présentent des déficits de mémoire qu'à la semaine 11.

Cultures enrichies de neurones hippocampiques

Des cultures neuronales primaires ont été établies à partir d'hippocampes de rats embryonnaires de 18 jours. Les rats Sprague-Dawley provenaient de Janvier (France). Après pré-incubation avec VerseneTM, les cellules d'hippocampe ont été dissociées mécaniquement etensemencées à une densité de 2 10⁶ cellules/boîte dans des boîtes à huit puits contenant des

lamelles de verre. Les boîtes de culture et les lamelles ont été recouvertes de poly-L-lysine (15 mg/ml), puis de DMEM/HAM F12 contenant 10% de sérum de veau fœtal. Les cellules ont été cultivées dans un milieu défini contenant du DMEM/HAM F12, additionné de glucose, 33 mM; la glutamine, 2 mM; pénicilline, 100 U/ml; streptomycine, 100 mg/ml; bicarbonate de sodium, 13 mM; transferrine, 50 mg/ml; insuline, 0,5 mg/ml; b-estradiol, 1 pM; triiodothyronine, 3 nM; progestérone, 20 nM; sélénite de sodium, 46 nM; et putrescine, 100 mM. Toutes les expériences ont été réalisées sur des cultures cellulaires cultivées pendant au moins 10 jours *in vitro* (DIV).

Électrophysiologie

Des expériences ont été réalisées sur des coupes de cerveau (épaisseur de 300 µm) obtenues à partir de souris R6/2 âgées de 8 à 16 semaines et de souris Wt du même âge. Après décapitation, les cerveaux ont été rapidement disséqués et placés dans du milieu « Krebs » glacé (124 mM NaCl, KCl 3,5 mM, NaHCO₃ 25 mM, NaH₂PO₄ 1,25 mM, CaCl₂ 1 mM, MgSO₄ 2 mM, D-glucose 10 mM), et HEPES 10 mM (barbotage avec O₂/CO₂, 95/5) pH 7,4. Les tranches ont ensuite été coupées avec un Vibratome (VT1000S, Leica, France) et maintenues à température ambiante pendant au moins 1 h dans le même tampon additionné de 1 mM de CaCl₂. Ce tampon supplémenté, également appelé milieu extracellulaire, a été utilisé pour d'autres enregistrements.

Des enregistrements électrophysiologiques de la transmission synaptique ont été effectués sur la zone CA1 de la région hippocampique avec des réseaux multi-électrodes (MEA) ou des enregistrements conventionnels avec des électrodes de verre. Pour les enregistrements MEA, les coupes ont été transférées vers un MEA (MEA60, Multi Channel Systems, Reutlingen, Allemagne) continuellement perfusé avec le milieu extracellulaire décrit ci-dessus (débit 2 ml/min). Au besoin, des molécules ont été directement appliquées par superfusion. Les MEA comprenaient 60 électrodes extracellulaires. La distance inter-électrodes était de 200 µm. Chaque électrode individuelle du réseau pouvait être utilisée soit comme une électrode d'enregistrement, soit comme une électrode de stimulation. Une maille en nylon a été positionnée au-dessus de la tranche pour obtenir un contact électrique satisfaisant entre la surface de la tranche et le réseau d'électrodes. La stimulation afférente a été obtenue avec un stimulateur externe (STG-1004, Multi Channel Systems) en appliquant des impulsions de courant biphasique à une électrode du réseau situé dans la voie collatérale de Schaffer de l'hippocampe. L'intensité de stimulation (60-300 µA) et la durée (70-200 ms) ont été adaptées pour éviter les réponses multiphasiques dues à une stimulation excessive. Les potentiels post-synaptiques excitateurs de champ (fEPSPs) ont ensuite été enregistrés dans la zone CA1 par des électrodes de la matrice. Les signaux ont ensuite été enregistrés et analysés (MC Rack, Multi Channel Systems). Pour les enregistrements à base d'électrodes de verre, les tranches d'hippocampe ont été transférées dans une chambre d'enregistrement, placée sous un microscope droit (DMF, Leica) et superfusé avec le milieu extracellulaire (débit de 2 ml/min). Les EPSP de champ (fEPSP) ont été enregistrés dans le champ dendritique des neurones de l'hippocampe CA1 avec des microélectrodes de verre (résistance 4-5 MΩ) remplies de milieu extracellulaire comme décrit ci-dessus. Les fEPSP ont été générés en stimulant la voie collatérale-commissurale de Schaffer en utilisant une électrode bipolaire avec des impulsions de courant d'intensité : 200 µA et de durée : 200 ms. Les signaux électrophysiologiques ont été amplifiés (Axopatch 200B, Axon Instruments) et numérisés (Digidata 1200A, Axon Instruments). Les fEPSP ont été en outre enregistrés et analysés avec le logiciel WinWCP du Dr John Dempster (Université de Strathclyde). Pour les méthodes d'enregistrement, les signaux synaptiques de base ont été évoqués en utilisant une fréquence de 0,066 Hz. L'intensité du stimulus pour la réponse de base a été adaptée pour donner environ 50% de la réponse maximale. La facilitation par impulsions paires (paired-pulse stimulation) a été

mesurée après l'application d'impulsions consécutives avec des intervalles de 50 ms. La LTP a été induite en stimulant à 100 Hz pendant 1 s. L'ampleur des effets sur la transmission synaptique a été déterminée en mesurant les amplitudes des fEPSP. Les données sont présentées sous forme de moyenne \pm S.E.M. sur des graphiques traçant des données groupées. Chaque individu (n) correspond à une expérience réalisée sur une tranche de souris différentes. Les expériences ont été réalisées à température ambiante.

Mesures de la concentration de Ca^{2+} cytosolique

La concentration en calcium intracellulaire ($[Ca^{2+}]_i$) a été mesurée avec la sonde fluorescente fura-2. A cet effet, des cellules hippocampiques cultivées sur des lamelles de verre carrés (10-10 mm) ont été chargées de fura-2 par incubation de 30 min à 37°C avec 2 mM de fura-2-AM et 0,02% d'acide pluronique dans la solution extracellulaire de Krebs (définie ci-dessus). $[Ca^{2+}]_i$ a été surveillé par vidéomicroscopie. Après rinçage, la lamelle de verre a été transférée dans la chambre d'enregistrement montée sur un microscope inversé (Leica, DMIRB). L'émission de Fura-2 a été obtenue en excitant alternativement à 340 et 380 nm avec une roue à filtres rotative (Sutter Instruments) et en surveillant les émissions fluorescentes (F340 et F380) à 510 nm. Le rapport des émissions à 510 nm (F340/F380) a été enregistré toutes les 2 secondes. Les signaux fluorescents ont été collectés avec une caméra CCD (Hamamatsu Photonics), numérisés et analysés avec un logiciel d'analyse d'images (Acquacosmos, Hamamatsu). Tout au long des enregistrements, les lamelles ont été superfusées en permanence (débit : 1 ml/min) avec la solution extracellulaire, sauf lorsque des peptides, dont le P42TAT, ont été testés. Pour cela, l'écoulement a été arrêté et des peptides ou des solutions véhicule ont été directement ajoutés au bain d'enregistrement pendant 25 min. Ce paradigme a été utilisé en raison de la faible quantité de peptide disponible. Lorsque requis, les molécules ont été appliquées avec un système alimenté par gravité. Sur les graphiques, les données sont présentées sous forme de rapport de fluorescence fura-2 F340/F380 obtenu dans des cellules individuelles. Les ratios ont été normalisés à leur valeur de référence respective mesurée avant tout traitement. Les données sont exprimées en tant que rapport normalisé des émissions ou F340/F380. Les valeurs n représentent la population entière de cellules enregistrées à partir d'au moins trois cultures différentes.

Statistiques

Les données sont présentées en moyenne \pm S.E.M. Les analyses statistiques ont été effectuées en utilisant le test t-test ou non-paramétrique de Mann-Whitney, lorsque deux conditions ont été comparées, et avec le test de paires appariées de Wilcoxon si nécessaire. Une ANOVA unidirectionnelle ou bidirectionnelle (comme indiqué) ou une ANOVA de Kruskal-Wallis non paramétrique ont également été utilisées lorsque plus de deux conditions ont été comparées (valeur H). Egalement quand deux ou trois variables étaient considérées en même temps, des tests de Two ou Three way ANOVA ont été utilisés. Une valeur P inférieure à 0,05 a été considérée comme statistiquement significative, mais P < 0,10, a été noté comme suggérant une tendance notable. Les niveaux statistiques étaient indiqués dans le texte et les figures comme : *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001. Tous les calculs statistiques ont été effectués à l'aide du logiciel Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA, États-Unis).

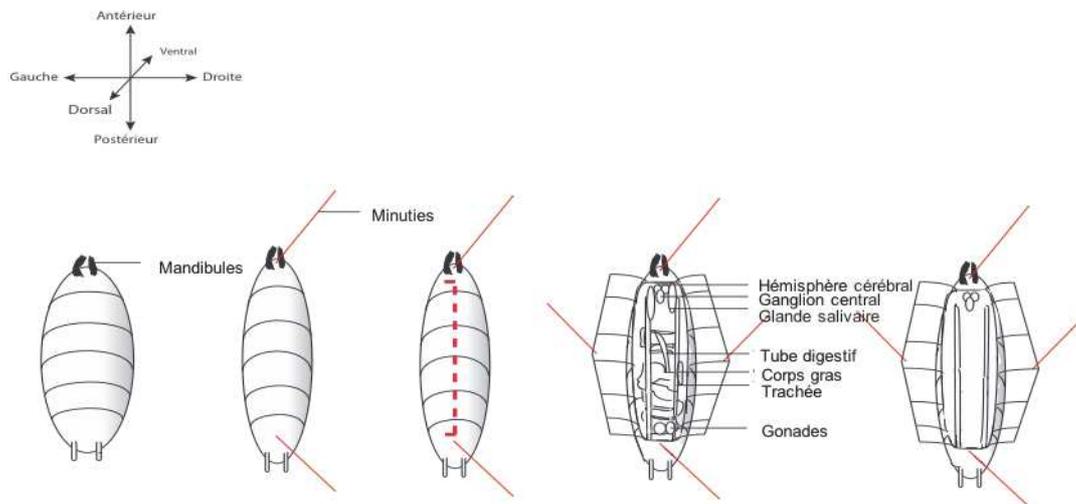
Suivi non-invasif des vésicules dans les nerfs segmentaires des larves vivantes

Suivant le protocole de Talmat-Amar *et al* (2011), nous avons anesthésié des larves de troisième stade exprimant NPY-GFP ou DNT1-GFP dans leurs motoneurones avec de l'éther pendant 2 min. Les larves vivantes ont été montées le côté ventral vers le haut sur une lame dans de l'agarose à 1% avec une lamelle, et vues avec un microscope à fluorescence pour suivre le mouvement des vésicules dans les nerfs entre les segments A2-A3. Des films de 60 images ont été enregistrés avec une image toutes les secondes, pour un nerf par larve (n = 9-13) et 10 vésicules par nerf. Pour quantifier le nombre de vésicules, le nombre total de vésicules a été compté sur une distance de 21 μ m dans la première image de chaque film. Pour l'analyse du mouvement, 20 vésicules ont été sélectionnées au hasard dans la première image de chaque film et suivies par ImageJ (en utilisant le plugin " manual vesicle tracking "). Les vésicules ayant une vitesse inférieure à 0,01 μ m/s ont été comptées comme faisant une pause). Les plugins ont été développés par F. Cordelières (Institut Curie, Orsay, France).

Dissection des larves de drosophiles

Les motoneurones des larves femelles du troisième stade ont été disséqués comme représenté sur la figure ci-dessous et immunomarkés selon Franco *et al.* [200]. Les images ont été acquises par microscopie confocale.

Dissection d'une larve de drosophile



Le Hamlet test[®]

Le Hamlet est inventé par Tanguy Maurice et développé par ViewPoint (Lissieu, France). L'appareil a un diamètre de 1,6 m et des murs de 30 cm de hauteur. Il est placé à 30 cm au-dessus du sol et situé dans une pièce de l'animalerie avec des meubles de laboratoire standard et des affiches sur les murs. La pièce était uniformément éclairée (200 lux). Le hameau est à un seul niveau avec une agora en son centre et des rues (30 x 8 cm) s'étendant en étoile vers cinq compartiments fonctionnalisés, appelés maisons (taille similaire : 28 x 16 cm). Les murs

et les passerelles sont en plexiglas blanc ou noir, transparents aux infrarouges. L'agora servait d'aire de rassemblement et de boîte de départ pour les entraînements et les tests. Les maisons fonctionnalisées contenaient un distributeur de nourriture (Imetronic, Pessac, France) (fonction physiologique codée : Manger), deux distributeurs d'eau (Imetronic) (Boire), un Novomaze® (Viewpoint) (Cacher), une roue (Courir) ou un compartiment pour une souris étrangère (Interaction). Une grille métallique séparait la souris étrangère, tandis que les autres maisons pouvaient être entrées librement. Les animaux ont été placés dans le hameau par groupe de 10 maximum, 4 h/jour pendant les périodes d'entraînement, et pendant 10 jours. Après chaque séance, le labyrinthe a été nettoyé avec une solution d'alcool isopropylique à 70%. La mémoire topographique pourrait être évaluée en utilisant plusieurs procédures. En effet, il est possible d'utiliser la privation d'eau ou de nourriture, mais ici nous avons utilisé la privation d'eau. Après la période de 10 jours d'entraînement, le biberon a été retiré de la cage de stabulation 15h avant le test. Les animaux privés ont ensuite été placés dans l'agora individuellement et libres d'explorer le hameau pendant une session de 10 min. Le comportement exploratoire a été filmé (Videotrack, Viewpoint) et analysé pendant l'entraînement en terme d'activité dans chaque maison, nombre de tours de roue, nombre de granulés mangés et nombre de coups de langue dans les maisons Courir, Manger et Boire ; la latence pour atteindre la maison but (Boire) et les autres maisons, nombre d'erreurs (entrées dans une rue ne dirigeant pas vers la maison but), nombre d'entrées dans la maison but et les autres maisons et le temps passé dans chaque maison. Les souris utilisées dans le Hamlet étaient âgées de 8 semaines au début du protocole.

Données supplémentaires

Données supplémentaires 1 Normalisation avec stainfree

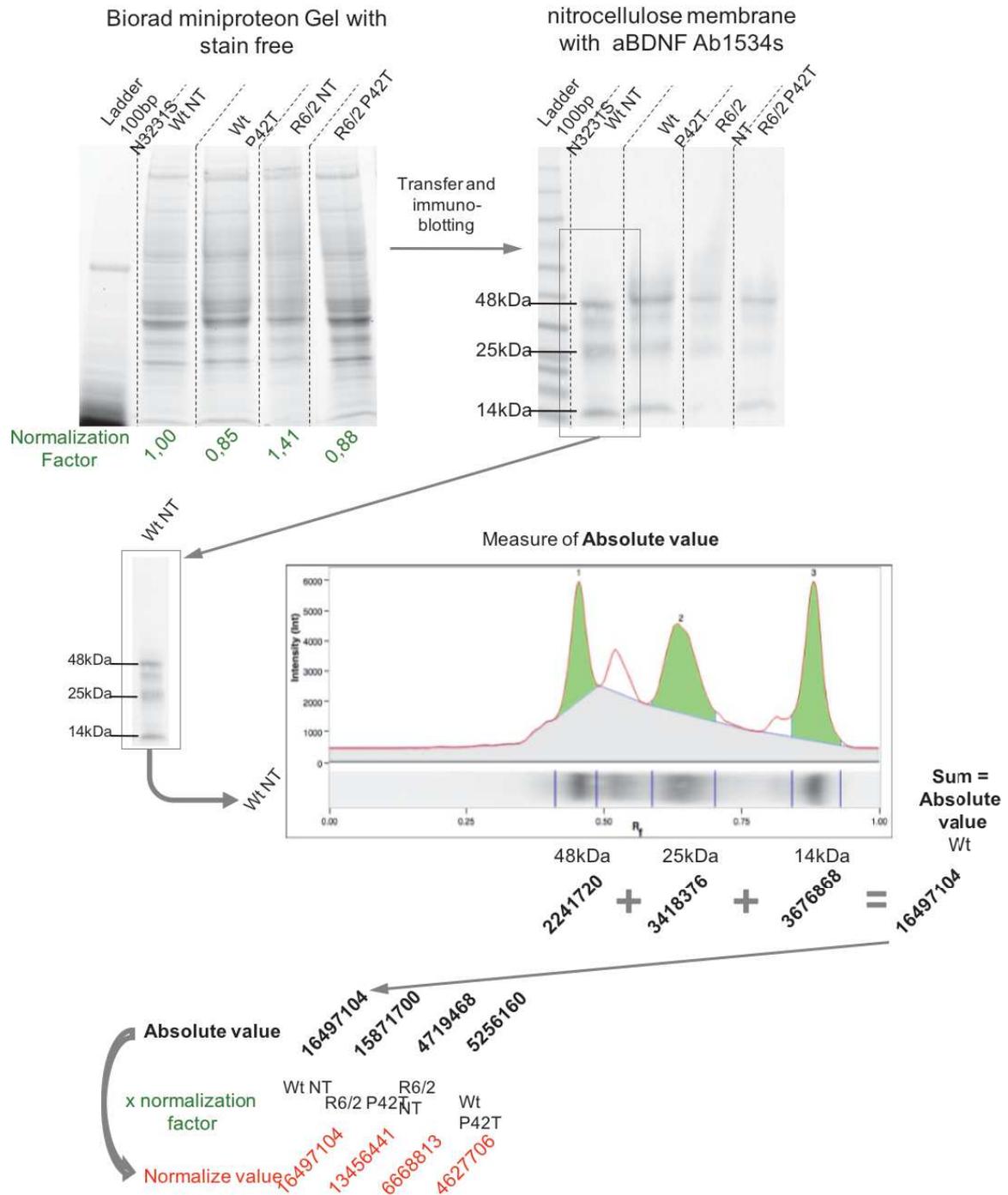
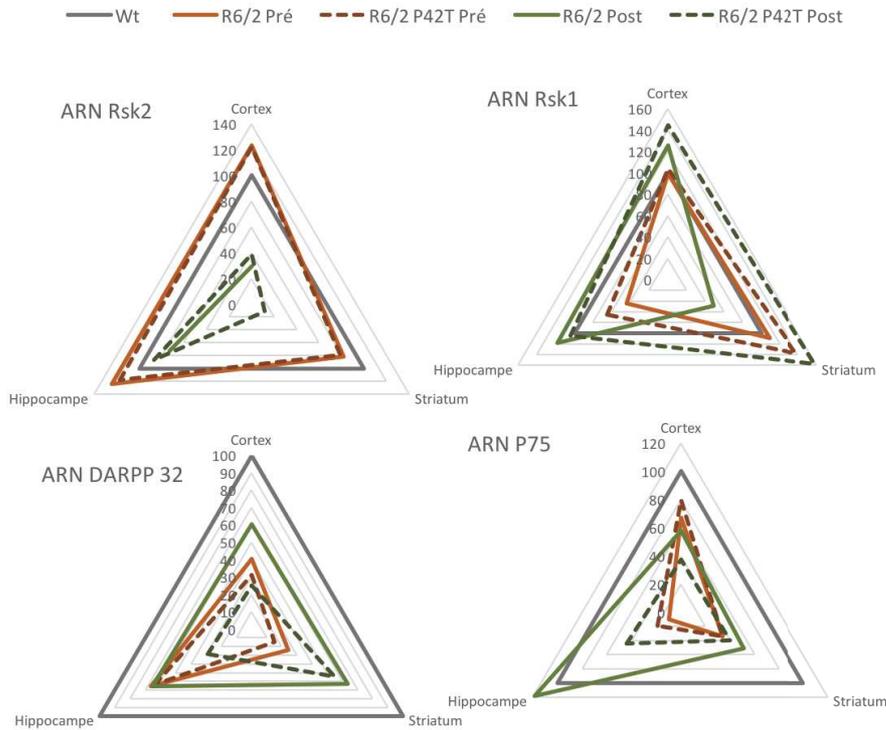
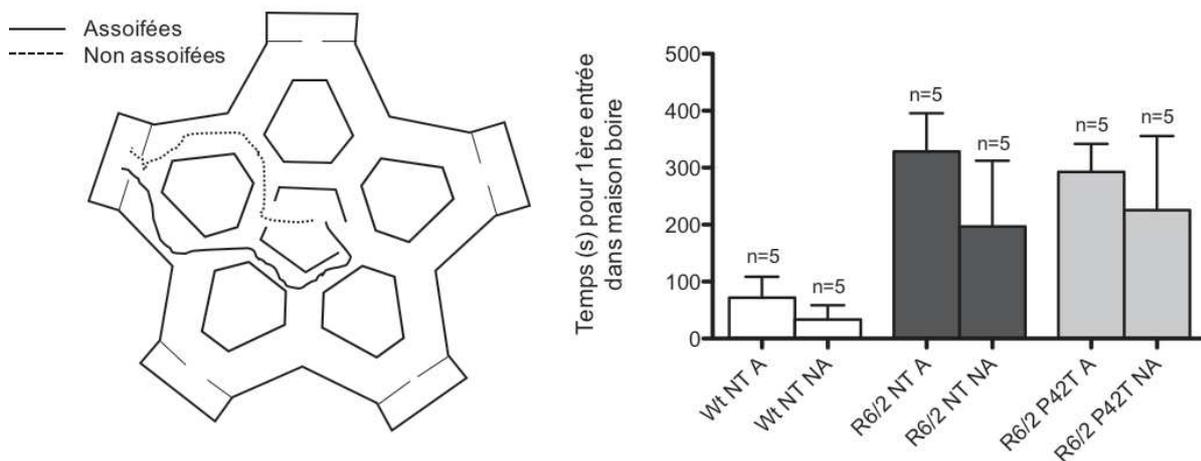


Figure représentant les différentes étapes de la quantification par stainfree. Premièrement, après avoir migré dans un gel stainfree, le gel est illuminé aux UV et les protéines sont révélées. Ensuite, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose et immunomarquées. Le signal obtenu est ensuite normalisé par rapport aux protéines totales observées sur le gel.

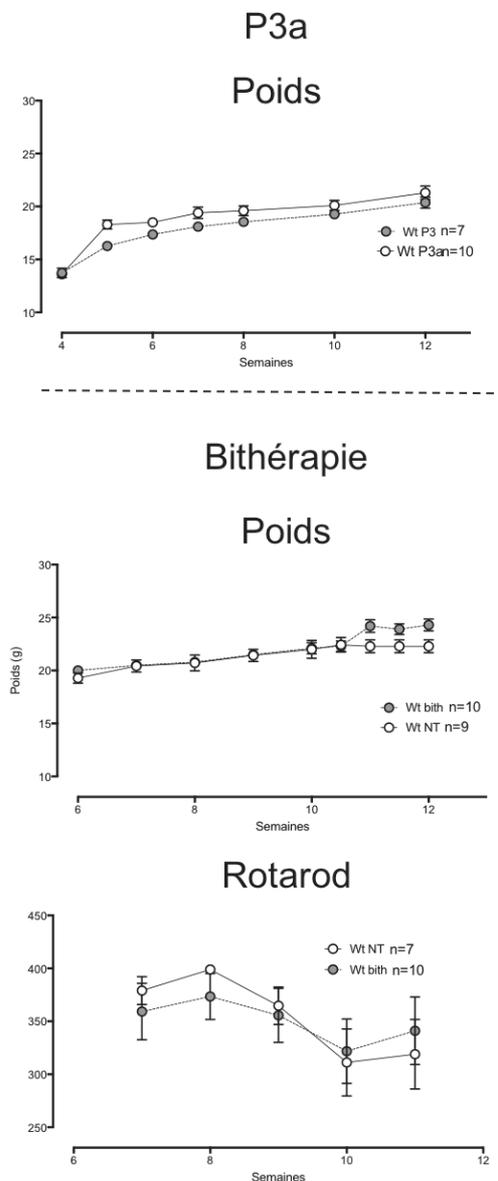
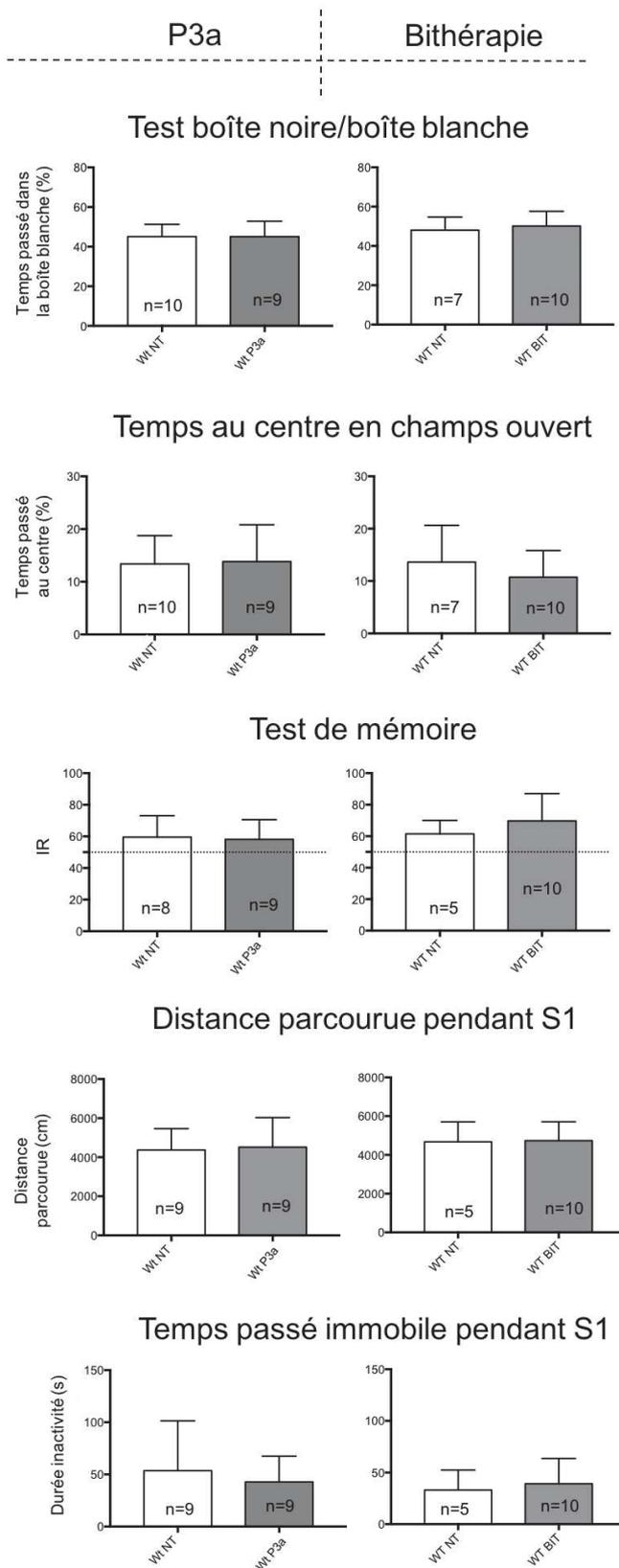
Données supplémentaires 2 Taux de transcrits de Rsk1, Rsk2, DARPP32, P75

Analyses d'autres transcrits dépendants de la voie BDNF/TrkB : Rsk1, Rsk2, DARPP32, P75. Dans différentes conditions et dans le cortex, le striatum et l'hippocampe. Les taux de transcrits sont normalisés par rapport à la β -tubuline et rapportés aux valeurs obtenues chez les souris Wt (100%).

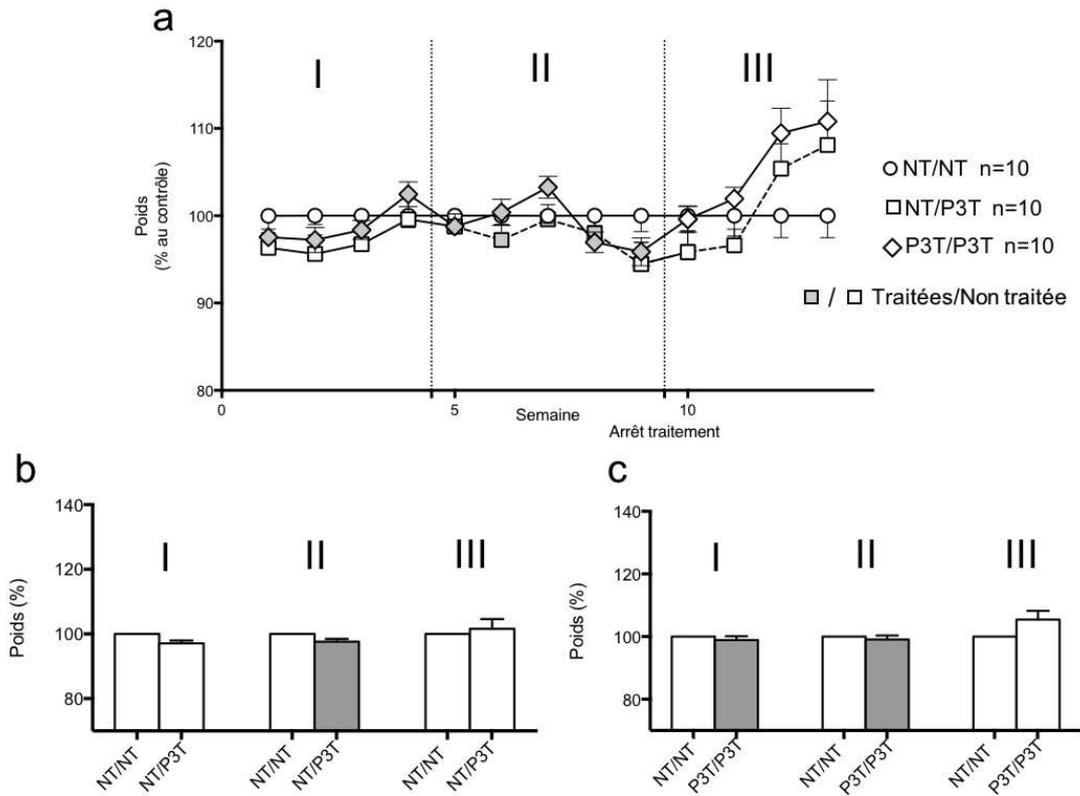
Données supplémentaires 3 Résultats du test de mémoire du Hamlet

Les résultats du test de mémoire topographique sont représentés sur le Hamlet (à gauche) et analysés sur le graphique (à droite). Aucune différence significative n'est observée entre les souris assoifées (A) et non assoifées (NA). Une tendance est néanmoins notable à une diminution du temps mis pour aller dans la maison « boire » chez les souris NA. Le contraire était attendu.

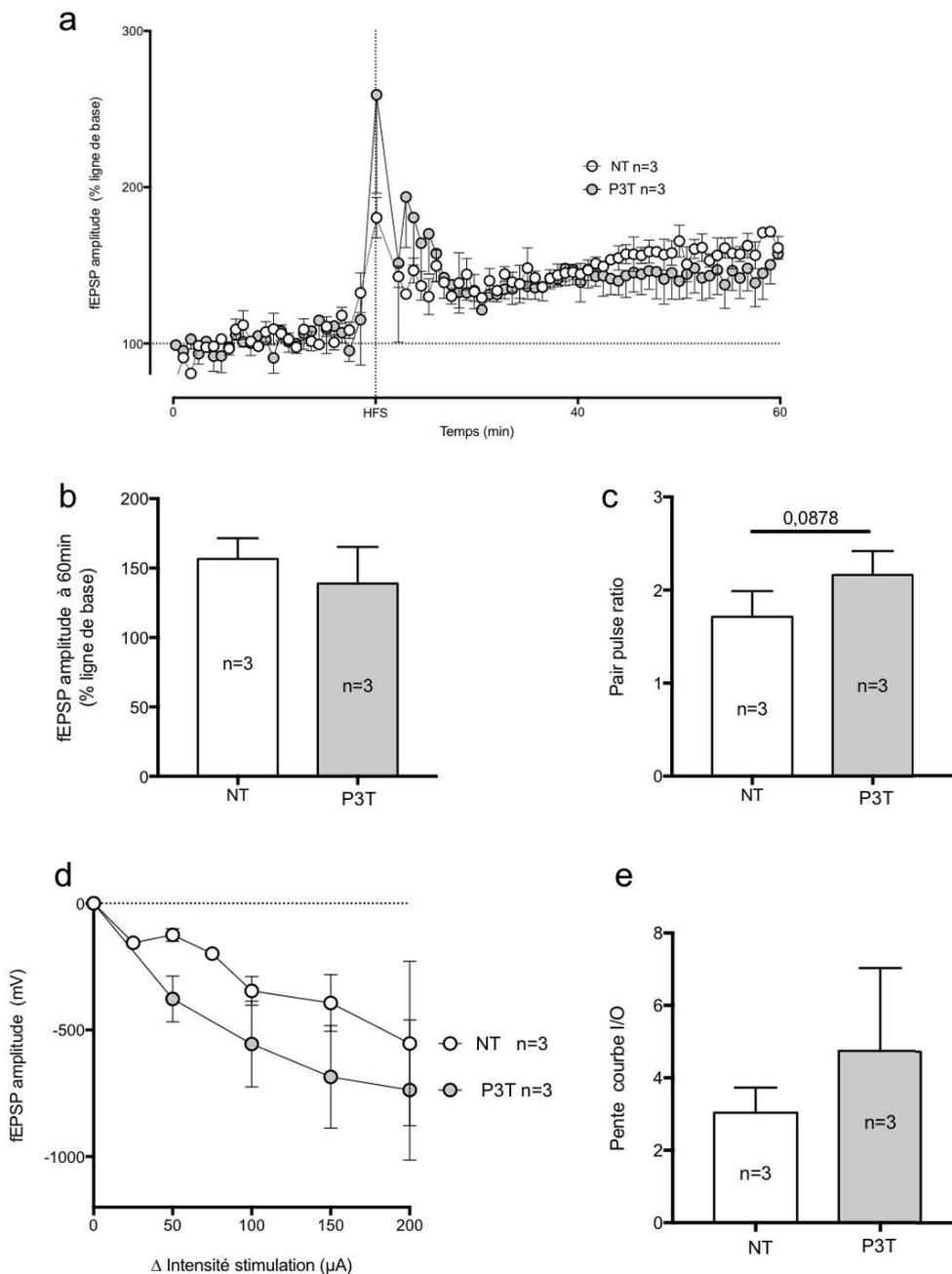
Données supplémentaires 4 Effet de P3a et de la bithérapie sur des souris sauvages



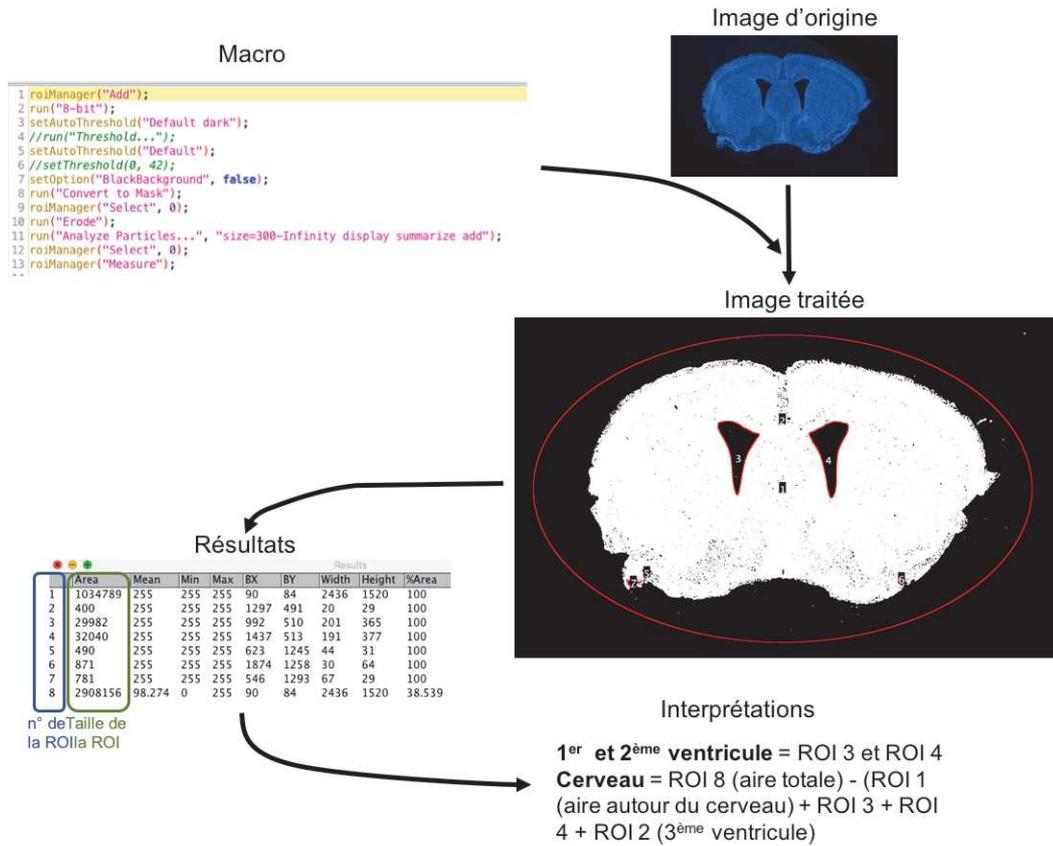
Les résultats des différents tests de comportement présentés dans le corps de la thèse pour les souris Wt traitées avec P3a. Aucune différence significative n'est observée.

Données supplémentaires 5 Effet de P3TAT sur l'évolution du poids des souris sauvages

*L'évolution du poids des souris *Wt* traitées avec P3T. Aucune différence significative n'est observée.*

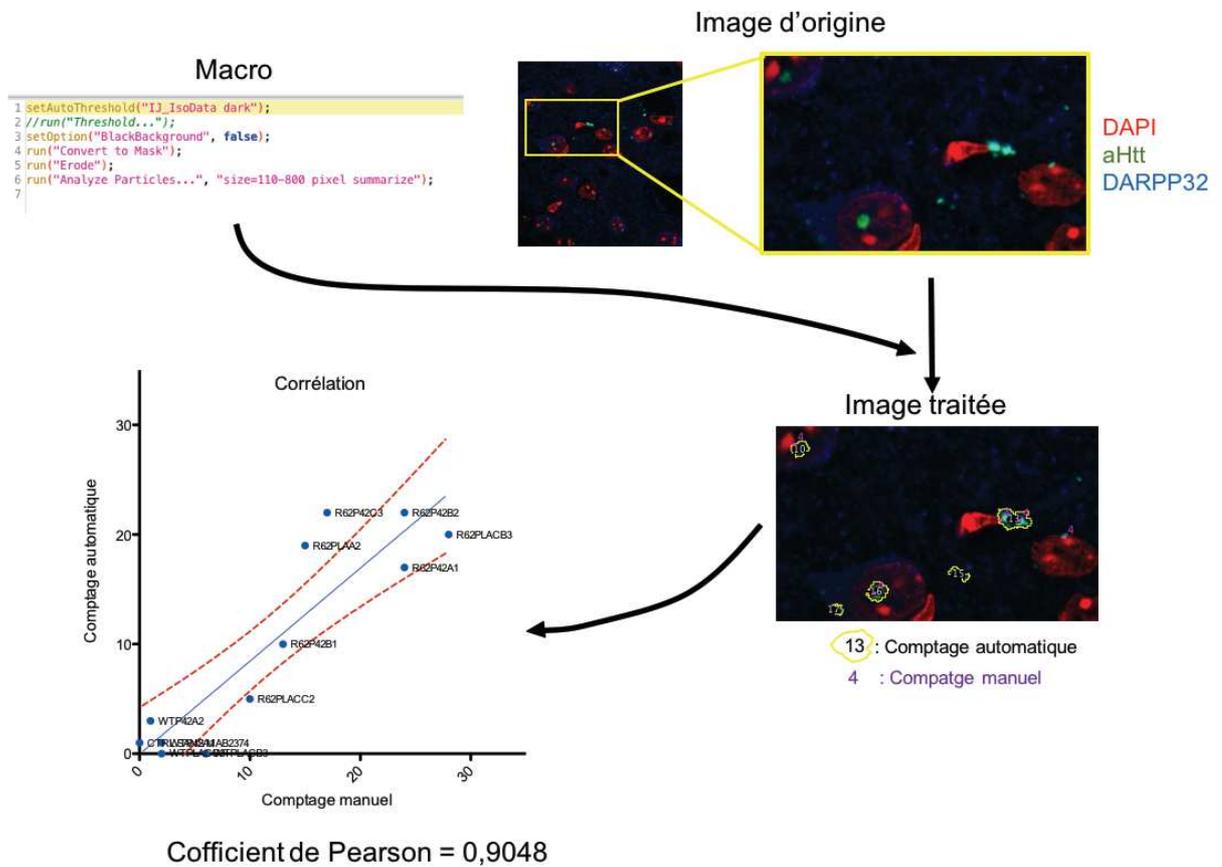
Données supplémentaires 6 Effet du traitement par P3TAT sur la transmission synaptique

a- Impact de P3T sur la plasticité synaptique. a- fEPSP enregistrés dans la zone CA1 de l'hippocampe en stimulant la voie des collatérales de Schaffer / fibres commissurales. Les fEPSP ont été évoqués dans des conditions basales en stimulant à 0.066 Hz. La LTP a été obtenue en appliquant une stimulation brève à haute fréquence (HFS: 100 Hz, 1 s). LTP induite par HFS observé chez les souris Wt (blanc), R6 2 (noire) et R6/2 P42T (gris). Les données correspondent aux amplitudes moyennes de fEPSP normalisées à la transmission basale. b- Le graphique montre les valeurs moyennes des groupes pour la LTP de souris WT traitées ou non avec P3T, comme indiqué. L'analyse statistique a été effectuée 60 min après la délivrance de HFS. En utilisant le test de Mann-Whitney : Aucune différence significative n'est notée c- PPR, en utilisant le test de Mann-Whitney : Aucune différence significative n'est notée. d,e- Représentations des résultats obtenus avec un protocole I/O. d- Représente l'évolution de l'amplitude du fEPSP en fonction de l'intensité de la stimulation. e- Représente les pentes des courbes présentées dans d, en utilisant le test de Mann-Whitney : Aucune différence significative n'est notée.

Données supplémentaires 7 Macro pour la mesure de la taille des ventricules

Déroulement de l'analyse automatique de la taille des ventricules et du cerveau. Les tranches du cerveau correspondant à 0,6 ou 0,8 mm du Bregma ont été sélectionnées avec le scanner à tranches Nanozoomer Hamatsu. Les photos ont ensuite été traitées avec la macro présentée dans la figure. Ce qui permettait la délimitation et la mesure des zones représentatives par les ventricules et le cerveau.

Données supplémentaires 8 Macro pour la détection et le comptage automatique des agrégats



Comptage automatique des agrégats de mHtt dans le striatum. La corrélation entre le comptage automatique et le comptage manuel est présentée et statistiquement quantifiée avec un coefficient de Pearson à 0,9048.

Bibliographie

- [1] « A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. The Huntington's Disease Collaborative Research Group », *Cell*, vol. 72, n° 6, p. 971-983, mars 1993.
- [2] S. Finkbeiner, « Huntington's Disease », *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 3, n° 6, juin 2011.
- [3] S. Frank, « Treatment of Huntington's disease », *Neurother. J. Am. Soc. Exp. Neurother.*, vol. 11, n° 1, p. 153-160, janv. 2014.
- [4] C. Kay, M. R. Hayden, et B. R. Leavitt, « Epidemiology of Huntington disease », *Handb. Clin. Neurol.*, vol. 144, p. 31-46, 2017.
- [5] F. Saudou et S. Humbert, « The Biology of Huntingtin », *Neuron*, vol. 89, n° 5, p. 910-926, mars 2016.
- [6] C. Zuccato, M. Valenza, et E. Cattaneo, « Molecular mechanisms and potential therapeutical targets in Huntington's disease », *Physiol. Rev.*, vol. 90, n° 3, p. 905-981, juill. 2010.
- [7] M. S. Okun et N. Thommi, « Americo Negrette (1924 to 2003): diagnosing Huntington disease in Venezuela », *Neurology*, vol. 63, n° 2, p. 340-343, juill. 2004.
- [8] L. Mangiarini *et al.*, « Exon 1 of the HD Gene with an Expanded CAG Repeat Is Sufficient to Cause a Progressive Neurological Phenotype in Transgenic Mice », *Cell*, vol. 87, n° 3, p. 493-506, nov. 1996.
- [9] F. Trettel *et al.*, « Dominant phenotypes produced by the HD mutation in STHdh(Q111) striatal cells », *Hum. Mol. Genet.*, vol. 9, n° 19, p. 2799-2809, nov. 2000.
- [10] J. L. Marsh, J. Pallos, et L. M. Thompson, « Fly models of Huntington's disease », *Hum. Mol. Genet.*, vol. 12 Spec No 2, p. R187-193, oct. 2003.
- [11] D. R. Langbehn, R. R. Brinkman, D. Falush, J. S. Paulsen, M. R. Hayden, et International Huntington's Disease Collaborative Group, « A new model for prediction of the age of onset and penetrance for Huntington's disease based on CAG length », *Clin. Genet.*, vol. 65, n° 4, p. 267-277, avr. 2004.
- [12] A. Wexler, « Stigma, history, and Huntington's disease », *Lancet Lond. Engl.*, vol. 376, n° 9734, p. 18-19, juill. 2010.
- [13] A. Dürr, V. Hahn-Barma, A. Brice, C. Pêcheux, C. Dodé, et J. Feingold, « Homozygosity in Huntington's disease », *J. Med. Genet.*, vol. 36, n° 2, p. 172-173, févr. 1999.
- [14] Y. P. Goldberg *et al.*, « Molecular analysis of new mutations for Huntington's disease: intermediate alleles and sex of origin effects », *Nat. Genet.*, vol. 5, n° 2, p. 174-179, oct. 1993.
- [15] A. Semaka, C. Kay, C. N. Doty, J. A. Collins, N. Tam, et M. R. Hayden, « High frequency of intermediate alleles on Huntington disease-associated haplotypes in British Columbia's general population », *Am. J. Med. Genet. Part B Neuropsychiatr. Genet. Off. Publ. Int. Soc. Psychiatr. Genet.*, vol. 162B, n° 8, p. 864-871, déc. 2013.
- [16] S. Podvin, H. T. Reardon, K. Yin, C. Mosier, et V. Hook, « Multiple clinical features of Huntington's disease correlate with mutant HTT gene CAG repeat lengths and neurodegeneration », *J. Neurol.*, juin 2018.
- [17] A. D. Ha et V. S. C. Fung, « Huntington's disease », *Curr. Opin. Neurol.*, vol. 25, n° 4, p. 491-498, août 2012.

- [18] T. H. Turner *et al.*, « Behavioral measures of saccade latency and inhibition in manifest and premanifest Huntington's disease », *J. Mot. Behav.*, vol. 43, n° 4, p. 295-302, 2011.
- [19] S. Frank, « Treatment of Huntington's disease », *Neurother. J. Am. Soc. Exp. Neurother.*, vol. 11, n° 1, p. 153-160, janv. 2014.
- [20] C. A. Ross et S. J. Tabrizi, « Huntington's disease: from molecular pathogenesis to clinical treatment », *Lancet Neurol.*, vol. 10, n° 1, p. 83-98, janv. 2011.
- [21] R. I. Scahill, R. Andre, S. J. Tabrizi, et E. H. Aylward, « Structural imaging in premanifest and manifest Huntington disease », *Handb. Clin. Neurol.*, vol. 144, p. 247-261, 2017.
- [22] H.-C. Fan *et al.*, « Polyglutamine (PolyQ) diseases: genetics to treatments », *Cell Transplant.*, vol. 23, n° 4-5, p. 441-458, 2014.
- [23] A. Karam et Y. Trottier, « Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies in Spinocerebellar Ataxia Type 7 », *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 1049, p. 197-218, 2018.
- [24] K. Kiebertz, R. Reilmann, et C. W. Olanow, « Huntington's disease: Current and future therapeutic prospects », *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.*, mai 2018.
- [25] A. Deb, S. Frank, et C. M. Testa, « New symptomatic therapies for Huntington disease », *Handb. Clin. Neurol.*, vol. 144, p. 199-207, 2017.
- [26] H. B. Kordasiewicz *et al.*, « Sustained Therapeutic Reversal of Huntington's Disease by Transient Repression of Huntingtin Synthesis », *Neuron*, vol. 74, n° 6, p. 1031-1044, juin 2012.
- [27] Y. Arribat, N. Bonneaud, Y. Talmat-Amar, S. Layalle, M.-L. Parmentier, et F. Maschat, « A huntingtin peptide inhibits polyQ-huntingtin associated defects », *PLoS One*, vol. 8, n° 7, p. e68775, 2013.
- [28] Y. Arribat *et al.*, « Systemic delivery of P42 peptide: a new weapon to fight Huntington's disease », *Acta Neuropathol. Commun.*, vol. 2, p. 86, 2014.
- [29] B. Mugat, M.-L. Parmentier, N. Bonneaud, H. Y. E. Chan, et F. Maschat, « Protective role of Engrailed in a Drosophila model of Huntington's disease », *Hum. Mol. Genet.*, vol. 17, n° 22, p. 3601-3616, nov. 2008.
- [30] M. Jiang *et al.*, « Neuroprotective role of Sirt1 in mammalian models of Huntington's disease through activation of multiple Sirt1 targets », *Nat. Med.*, vol. 18, n° 1, p. 153-158, déc. 2011.
- [31] F. Cicchetti *et al.*, « Mutant huntingtin is present in neuronal grafts in Huntington disease patients », *Ann. Neurol.*, vol. 76, n° 1, p. 31-42, juill. 2014.
- [32] A. Rosser et C. N. Svendsen, « Stem cells for cell replacement therapy: a therapeutic strategy for HD? », *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.*, vol. 29, n° 11, p. 1446-1454, sept. 2014.
- [33] A. Killoran et K. M. Biglan, « Therapeutics in Huntington's Disease », *Curr. Treat. Options Neurol.*, févr. 2012.
- [34] J. S. Paulsen *et al.*, « Prediction of manifest Huntington's disease with clinical and imaging measures: a prospective observational study », *Lancet Neurol.*, vol. 13, n° 12, p. 1193-1201, déc. 2014.
- [35] A. Ruzo *et al.*, « Discovery of novel isoforms of huntingtin reveals a new hominid-specific exon », *PLoS One*, vol. 10, n° 5, p. e0127687, 2015.
- [36] L. Romo, A. Ashar-Patel, E. Pfister, et N. Aronin, « Alterations in mRNA 3'UTR isoform abundance accompany gene expression changes in human Huntington's disease brains », *Cell Rep.*, vol. 20, n° 13, p. 3057-3070, sept. 2017.
- [37] J. S. Kauffman, A. Zinovyeva, K. Yagi, K. W. Makabe, et R. A. Raff, « Neural

- expression of the Huntington's disease gene as a chordate evolutionary novelty », *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.*, vol. 297, n° 1, p. 57-64, juin 2003.
- [38] T. Maiuri, T. Woloshansky, J. Xia, et R. Truant, « The huntingtin N17 domain is a multifunctional CRM1 and Ran-dependent nuclear and ciliary export signal », *Hum. Mol. Genet.*, vol. 22, n° 7, p. 1383-1394, avr. 2013.
- [39] J. S. Steffan, « SUMO Modification of Huntingtin and Huntington's Disease Pathology », *Science*, vol. 304, n° 5667, p. 100-104, avr. 2004.
- [40] M. W. Kim, Y. Chelliah, S. W. Kim, Z. Otwinowski, et I. Bezprozvanny, « Secondary Structure of Huntingtin Amino-Terminal Region », *Structure*, vol. 17, n° 9, p. 1205-1212, sept. 2009.
- [41] F. A. C. Klein *et al.*, « Pathogenic and non-pathogenic polyglutamine tracts have similar structural properties: towards a length-dependent toxicity gradient », *J. Mol. Biol.*, vol. 371, n° 1, p. 235-244, août 2007.
- [42] E. Rockabrand *et al.*, « The first 17 amino acids of Huntingtin modulate its sub-cellular localization, aggregation and effects on calcium homeostasis », *Hum. Mol. Genet.*, vol. 16, n° 1, p. 61-77, janv. 2007.
- [43] C. L. Wellington *et al.*, « Caspase cleavage of mutant huntingtin precedes neurodegeneration in Huntington's disease », *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, vol. 22, n° 18, p. 7862-7872, sept. 2002.
- [44] I. A. Hendriks, R. C. J. D'Souza, B. Yang, M. Verlaan-de Vries, M. Mann, et A. C. O. Vertegaal, « Uncovering global SUMOylation signaling networks in a site-specific manner », *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 21, n° 10, p. 927-936, oct. 2014.
- [45] B. Schilling *et al.*, « Huntingtin phosphorylation sites mapped by mass spectrometry. Modulation of cleavage and toxicity », *J. Biol. Chem.*, vol. 281, n° 33, p. 23686-23697, août 2006.
- [46] L. M. Thompson *et al.*, « IKK phosphorylates Huntingtin and targets it for degradation by the proteasome and lysosome », *J. Cell Biol.*, vol. 187, n° 7, p. 1083-1099, déc. 2009.
- [47] X. Gu *et al.*, « Serines 13 and 16 are critical determinants of full-length human mutant huntingtin induced disease pathogenesis in HD mice », *Neuron*, vol. 64, n° 6, p. 828-840, déc. 2009.
- [48] J. Cornett *et al.*, « Polyglutamine expansion of huntingtin impairs its nuclear export », *Nat. Genet.*, vol. 37, n° 2, p. 198-204, févr. 2005.
- [49] M. A. Andrade et P. Bork, « HEAT repeats in the Huntington's disease protein », *Nat. Genet.*, vol. 11, n° 2, p. 115-116, oct. 1995.
- [50] M. Tartari *et al.*, « Phylogenetic comparison of huntingtin homologues reveals the appearance of a primitive polyQ in sea urchin », *Mol. Biol. Evol.*, vol. 25, n° 2, p. 330-338, févr. 2008.
- [51] C. A. Ross et M. A. Poirier, « Opinion: What is the role of protein aggregation in neurodegeneration? », *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 6, n° 11, p. 891-898, nov. 2005.
- [52] T. Ratovitski *et al.*, « Huntingtin protein interactions altered by polyglutamine expansion as determined by quantitative proteomic analysis », *Cell Cycle*, vol. 11, n° 10, p. 2006-2021, mai 2012.
- [53] D. I. Shirasaki *et al.*, « Network organization of the huntingtin proteomic interactome in mammalian brain », *Neuron*, vol. 75, n° 1, p. 41-57, juill. 2012.
- [54] S. A. Reis *et al.*, « Striatal neurons expressing full-length mutant huntingtin exhibit decreased N-cadherin and altered neuritogenesis », *Hum. Mol. Genet.*, vol. 20, n° 12, p. 2344-2355, juin 2011.
- [55] B. P. Culver *et al.*, « Proteomic analysis of wild-type and mutant huntingtin-associated

- proteins in mouse brains identifies unique interactions and involvement in protein synthesis », *J. Biol. Chem.*, vol. 287, n° 26, p. 21599-21614, juin 2012.
- [56] A. Davranche *et al.*, « Huntingtin affinity for partners is not changed by polyglutamine length: aggregation itself triggers aberrant interactions », *Hum. Mol. Genet.*, vol. 20, n° 14, p. 2795-2806, juill. 2011.
- [57] A. Sittler *et al.*, « SH3GL3 associates with the Huntingtin exon 1 protein and promotes the formation of polyglu-containing protein aggregates », *Mol. Cell*, vol. 2, n° 4, p. 427-436, oct. 1998.
- [58] G. Wang, X. Liu, M. A. Gaertig, S. Li, et X.-J. Li, « Ablation of huntingtin in adult neurons is nondeleterious but its depletion in young mice causes acute pancreatitis », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 113, n° 12, p. 3359-3364, mars 2016.
- [59] S. Zeitlin, J. P. Liu, D. L. Chapman, V. E. Papaioannou, et A. Efstratiadis, « Increased apoptosis and early embryonic lethality in mice nullizygous for the Huntington's disease gene homologue », *Nat. Genet.*, vol. 11, n° 2, p. 155-163, oct. 1995.
- [60] S. Zhang, M. B. Feany, S. Saraswati, J. T. Littleton, et N. Perrimon, « Inactivation of Drosophila Huntingtin affects long-term adult functioning and the pathogenesis of a Huntington's disease model », *Dis. Model. Mech.*, vol. 2, n° 5-6, p. 247-266, juin 2009.
- [61] A. E. Molero, S. Gokhan, S. Gonzalez, J. L. Feig, L. C. Alexandre, et M. F. Mehler, « 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.*, vol. 106, n° 51, p. 21900-21905, déc. 2009.
- [62] B. R. Leavitt *et al.*, « Wild-type huntingtin protects neurons from excitotoxicity », *J. Neurochem.*, vol. 96, n° 4, p. 1121-1129, juill. 2018.
- [63] Y. Zhang *et al.*, « Depletion of wild-type huntingtin in mouse models of neurologic diseases », *J. Neurochem.*, vol. 87, n° 1, p. 101-106, oct. 2003.
- [64] N. Michelle, C. E. B.D, S. J. S, et Z. S. O, « Deletion of the Huntingtin Proline-Rich Region does not Significantly Affect Normal Huntingtin Function in Mice », *J. Huntingtonaposs Dis.*, n° 1, p. 71-87, 2012.
- [65] M. Barnat, J. Le Fric, C. Benstaali, et S. Humbert, « Huntingtin-Mediated Multipolar-Bipolar Transition of Newborn Cortical Neurons Is Critical for Their Postnatal Neuronal Morphology », *Neuron*, vol. 93, n° 1, p. 99-114, janv. 2017.
- [66] J. D. Godin *et al.*, « Huntingtin is required for mitotic spindle orientation and mammalian neurogenesis », *Neuron*, vol. 67, n° 3, p. 392-406, août 2010.
- [67] G. Keryer *et al.*, « Ciliogenesis is regulated by a huntingtin-HAP1-PCM1 pathway and is altered in Huntington disease », *J. Clin. Invest.*, vol. 121, n° 11, p. 4372-4382, nov. 2011.
- [68] A. Karam *et al.*, « A novel function of Huntingtin in the cilium and retinal ciliopathy in Huntington's disease mice », *Neurobiol. Dis.*, vol. 80, p. 15-28, août 2015.
- [69] D. Rigamonti *et al.*, « Wild-Type Huntingtin Protects from Apoptosis Upstream of Caspase-3 », *J. Neurosci.*, vol. 20, n° 10, p. 3705-3713, mai 2000.
- [70] L. Ho, R. Brown, M. Maxwell, A. Wytenbach, et D. Rubinsztein, « Wild type huntingtin reduces the cellular toxicity of mutant huntingtin in mammalian cell models of Huntington's disease », *J. Med. Genet.*, vol. 38, n° 7, p. 450-452, juill. 2001.
- [71] I. Dragatsis, M. S. Levine, et S. Zeitlin, « Inactivation of Hdh in the brain and testis results in progressive neurodegeneration and sterility in mice », *Nat. Genet.*, vol. 26, n° 3, p. 300-306, nov. 2000.
- [72] M. Brentnall, L. Rodriguez-Menocal, R. L. De Guevara, E. Cepero, et L. H. Boise, « Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis », *BMC Cell Biol.*, vol. 14, p. 32, juill. 2013.

- [73] L. Galvan *et al.*, « The striatal kinase DCLK3 produces neuroprotection against mutant huntingtin », *Brain J. Neurol.*, vol. 141, n° 5, p. 1434-1454, mai 2018.
- [74] M. Jiang *et al.*, « Small-molecule TrkB receptor agonists improve motor function and extend survival in a mouse model of Huntington's disease », *Hum. Mol. Genet.*, vol. 22, n° 12, p. 2462-2470, juin 2013.
- [75] G. R. Lewin et B. D. Carter, « Neurotrophic factors. Preface », *Handb. Exp. Pharmacol.*, vol. 220, p. v-vi, 2014.
- [76] C. A. Altar *et al.*, « Anterograde transport of brain-derived neurotrophic factor and its role in the brain », *Nature*, vol. 389, n° 6653, p. 856-860, oct. 1997.
- [77] S. Ginés *et al.*, « Reduced expression of the TrkB receptor in Huntington's disease mouse models and in human brain », *Eur. J. Neurosci.*, vol. 23, n° 3, p. 649-658, févr. 2006.
- [78] G. Liot, D. Zala, P. Pla, G. Mottet, M. Piel, et F. Saudou, « Mutant Huntingtin alters retrograde transport of TrkB receptors in striatal dendrites », *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, vol. 33, n° 15, p. 6298-6309, avr. 2013.
- [79] C. Zuccato *et al.*, « Widespread disruption of repressor element-1 silencing transcription factor/neuron-restrictive silencer factor occupancy at its target genes in Huntington's disease », *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, vol. 27, n° 26, p. 6972-6983, juin 2007.
- [80] C. Zuccato, « Loss of Huntingtin-Mediated BDNF Gene Transcription in Huntington's Disease », *Science*, vol. 293, n° 5529, p. 493-498, juill. 2001.
- [81] L. R. Gauthier *et al.*, « Huntingtin Controls Neurotrophic Support and Survival of Neurons by Enhancing BDNF Vesicular Transport along Microtubules », *Cell*, vol. 118, n° 1, p. 127-138, juill. 2004.
- [82] E. Colin *et al.*, « Huntingtin phosphorylation acts as a molecular switch for anterograde/retrograde transport in neurons », *EMBO J.*, vol. 27, n° 15, p. 2124-2134, août 2008.
- [83] J. R. McGuire, J. Rong, S.-H. Li, et X.-J. Li, « Interaction of Huntingtin-associated protein-1 with kinesin light chain: implications in intracellular trafficking in neurons », *J. Biol. Chem.*, vol. 281, n° 6, p. 3552-3559, févr. 2006.
- [84] A. E. Twelvetrees *et al.*, « Delivery of GABAARs to synapses is mediated by HAP1-KIF5 and disrupted by mutant huntingtin », *Neuron*, vol. 65, n° 1, p. 53-65, janv. 2010.
- [85] D. Zala, E. Colin, H. Rangone, G. Liot, S. Humbert, et F. Saudou, « Phosphorylation of mutant huntingtin at S421 restores anterograde and retrograde transport in neurons », *Hum. Mol. Genet.*, vol. 17, n° 24, p. 3837-3846, déc. 2008.
- [86] X.-J. Li, A. L. Orr, et S. Li, « Impaired mitochondrial trafficking in Huntington's disease », *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1802, n° 1, p. 62-65, janv. 2010.
- [87] D. Zala, M.-V. Hinckelmann, et F. Saudou, « Huntingtin's function in axonal transport is conserved in *Drosophila melanogaster* », *PloS One*, vol. 8, n° 3, p. e60162, 2013.
- [88] Y. C. Wong et E. L. F. Holzbaaur, « The regulation of autophagosome dynamics by huntingtin and HAP1 is disrupted by expression of mutant huntingtin, leading to defective cargo degradation », *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, vol. 34, n° 4, p. 1293-1305, janv. 2014.
- [89] J. P. Caviston, A. L. Zajac, M. Tokito, et E. L. F. Holzbaaur, « Huntingtin coordinates the dynein-mediated dynamic positioning of endosomes and lysosomes », *Mol. Biol. Cell*, vol. 22, n° 4, p. 478-492, févr. 2011.
- [90] Z.-Y. Chen *et al.*, « Variant brain-derived neurotrophic factor (BDNF) (Met66) alters the intracellular trafficking and activity-dependent secretion of wild-type BDNF in neurosecretory cells and cortical neurons », *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, vol. 24, n° 18,

p. 4401-4411, mai 2004.

[91] C. Zuccato *et al.*, « Huntingtin interacts with REST/NRSF to modulate the transcription of NRSE-controlled neuronal genes », *Nat. Genet.*, vol. 35, n° 1, p. 76-83, sept. 2003.

[92] P. Conforti *et al.*, « Binding of the repressor complex REST-mSIN3b by small molecules restores neuronal gene transcription in Huntington's disease models », *J. Neurochem.*, vol. 127, n° 1, p. 22-35, oct. 2013.

[93] C. Soldati, A. Bithell, P. Conforti, E. Cattaneo, et N. J. Buckley, « Rescue of gene expression by modified REST decoy oligonucleotides in a cellular model of Huntington's disease: REST decoys in a Huntington's disease model », *J. Neurochem.*, vol. 116, n° 3, p. 415-425, févr. 2011.

[94] S. Aigner et G. W. Yeo, « Terminal Differentiation: REST », in *Encyclopedia of Neuroscience*, Elsevier, 2009, p. 921-927.

[95] E. Marcora, K. Gowan, et J. E. Lee, « Stimulation of NeuroD activity by huntingtin and huntingtin-associated proteins HAP1 and MLK2 », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 100, n° 16, p. 9578-9583, août 2003.

[96] S.-H. Li *et al.*, « Interaction of Huntington disease protein with transcriptional activator Sp1 », *Mol. Cell. Biol.*, vol. 22, n° 5, p. 1277-1287, mars 2002.

[97] A. W. Dunah *et al.*, « Sp1 and TAFII130 transcriptional activity disrupted in early Huntington's disease », *Science*, vol. 296, n° 5576, p. 2238-2243, juin 2002.

[98] M. Ravache, C. Weber, K. Mérienne, et Y. Trottier, « Transcriptional activation of REST by Sp1 in Huntington's disease models », *PloS One*, vol. 5, n° 12, p. e14311, déc. 2010.

[99] J. S. Steffan *et al.*, « The Huntington's disease protein interacts with p53 and CREB-binding protein and represses transcription », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 97, n° 12, p. 6763-6768, juin 2000.

[100] M. Murphy *et al.*, « Transcriptional repression by wild-type p53 utilizes histone deacetylases, mediated by interaction with mSin3a », *Genes Dev.*, vol. 13, n° 19, p. 2490-2501, oct. 1999.

[101] R. Gemayel *et al.*, « Variable Glutamine-Rich Repeats Modulate Transcription Factor Activity », *Mol. Cell*, vol. 59, n° 4, p. 615-627, août 2015.

[102] A. Zarrinpar, R. P. Bhattacharyya, et W. A. Lim, « The structure and function of proline recognition domains », *Sci. STKE Signal Transduct. Knowl. Environ.*, vol. 2003, n° 179, p. RE8, avr. 2003.

[103] B. Khalil, N. El Fissi, A. Aouane, M.-J. Cabirol-Pol, T. Rival, et J.-C. Liévens, « PINK1-induced mitophagy promotes neuroprotection in Huntington's disease », *Cell Death Dis.*, vol. 6, p. e1617, janv. 2015.

[104] J. Chakraborty, U. Rajamma, et K. P. Mohanakumar, « A mitochondrial basis for Huntington's disease: therapeutic prospects », *Mol. Cell. Biochem.*, vol. 389, n° 1-2, p. 277-291, avr. 2014.

[105] Y. S. Choo, G. V. W. Johnson, M. MacDonald, P. J. Detloff, et M. Lesort, « Mutant huntingtin directly increases susceptibility of mitochondria to the calcium-induced permeability transition and cytochrome c release », *Hum. Mol. Genet.*, vol. 13, n° 14, p. 1407-1420, juill. 2004.

[106] E. Brouillet, « The 3-NP Model of Striatal Neurodegeneration », *Curr. Protoc. Neurosci.*, vol. 67, p. 9.48.1-14, avr. 2014.

[107] L. Cui, H. Jeong, F. Borovecki, C. N. Parkhurst, N. Tanese, et D. Krainc, « Transcriptional Repression of PGC-1 α by Mutant Huntingtin Leads to Mitochondrial

- Dysfunction and Neurodegeneration », *Cell*, vol. 127, n° 1, p. 59-69, oct. 2006.
- [108] A. V. Tzingounis et J. I. Wadiche, « Glutamate transporters: confining runaway excitation by shaping synaptic transmission », *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 8, n° 12, p. 935-947, déc. 2007.
- [109] Y. Sun, A. Savanenin, P. H. Reddy, et Y. F. Liu, « Polyglutamine-expanded huntingtin promotes sensitization of N-methyl-D-aspartate receptors via post-synaptic density 95 », *J. Biol. Chem.*, vol. 276, n° 27, p. 24713-24718, juill. 2001.
- [110] T.-S. Tang, X. Chen, J. Liu, et I. Bezprozvanny, « Dopaminergic signaling and striatal neurodegeneration in Huntington's disease », *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, vol. 27, n° 30, p. 7899-7910, juill. 2007.
- [111] A. Tarditi *et al.*, « Early and transient alteration of adenosine A2A receptor signaling in a mouse model of Huntington disease », *Neurobiol. Dis.*, vol. 23, n° 1, p. 44-53, juill. 2006.
- [112] G. Marsicano *et al.*, « CB1 cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity », *Science*, vol. 302, n° 5642, p. 84-88, oct. 2003.
- [113] U. Träger *et al.*, « HTT-lowering reverses Huntington's disease immune dysfunction caused by NFκB pathway dysregulation », *Brain J. Neurol.*, vol. 137, n° Pt 3, p. 819-833, mars 2014.
- [114] J. Branco-Santos *et al.*, « Protein phosphatase 1 regulates huntingtin exon 1 aggregation and toxicity », *Hum. Mol. Genet.*, vol. 26, n° 19, p. 3763-3775, 01 2017.
- [115] L. M. Yager, A. F. Garcia, A. M. Wunsch, et S. M. Ferguson, « The ins and outs of the striatum: Role in drug addiction », *Neuroscience*, vol. 301, p. 529-541, août 2015.
- [116] A. Stocco, C. Lebiere, et J. R. Anderson, « Conditional Routing of Information to the Cortex: A Model of the Basal Ganglia's Role in Cognitive Coordination », *Psychol. Rev.*, vol. 117, n° 2, p. 541-574, avr. 2010.
- [117] S. Ikemoto, « Brain reward circuitry beyond the mesolimbic dopamine system: A neurobiological theory », *Neurosci. Biobehav. Rev.*, vol. 35, n° 2, p. 129-150, nov. 2010.
- [118] A. B. Nelson et A. C. Kreitzer, « Reassessing models of basal ganglia function and dysfunction », *Annu. Rev. Neurosci.*, vol. 37, p. 117-135, 2014.
- [119] A. Cattaneo, N. Cattane, V. Begni, C. M. Pariante, et M. A. Riva, « The human BDNF gene: peripheral gene expression and protein levels as biomarkers for psychiatric disorders », *Transl. Psychiatry*, vol. 6, n° 11, p. e958-e958, nov. 2016.
- [120] C. Zuccato *et al.*, « Progressive loss of BDNF in a mouse model of Huntington's disease and rescue by BDNF delivery », *Pharmacol. Res.*, vol. 52, n° 2, p. 133-139, août 2005.
- [121] T. Timmusk *et al.*, « Multiple promoters direct tissue-specific expression of the rat BDNF gene », *Neuron*, vol. 10, n° 3, p. 475-489, mars 1993.
- [122] F. Zheng, X. Zhou, C. Moon, et H. Wang, « Regulation of brain-derived neurotrophic factor expression in neurons », *Int. J. Physiol. Pathophysiol. Pharmacol.*, vol. 4, n° 4, p. 188-200, déc. 2012.
- [123] T. Yoshida *et al.*, « Decreased serum levels of mature brain-derived neurotrophic factor (BDNF), but not its precursor proBDNF, in patients with major depressive disorder », *PloS One*, vol. 7, n° 8, p. e42676, 2012.
- [124] J. H. Hartwig, M. Thelen, A. Rosen, P. A. Janmey, A. C. Nairn, et A. Aderem, « MARCKS is an actin filament crosslinking protein regulated by protein kinase C and calcium-calmodulin », *Nature*, vol. 356, n° 6370, p. 618-622, avr. 1992.
- [125] L. Minichiello *et al.*, « Essential role for TrkB receptors in hippocampus-mediated learning », *Neuron*, vol. 24, n° 2, p. 401-414, oct. 1999.

- [126] R. Wen *et al.*, « Leptin exerts proliferative and anti-apoptotic effects on goose granulosa cells through the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway », *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, vol. 149, p. 70-79, mai 2015.
- [127] K. Deinhardt et M. V. Chao, « Trk receptors », *Handb. Exp. Pharmacol.*, vol. 220, p. 103-119, 2014.
- [128] M. Bibel, E. Hoppe, et Y. A. Barde, « Biochemical and functional interactions between the neurotrophin receptors trk and p75NTR », *EMBO J.*, vol. 18, n° 3, p. 616-622, févr. 1999.
- [129] S. E. Slack, S. Pezet, S. B. McMahon, S. W. N. Thompson, et M. Malcangio, « Brain-derived neurotrophic factor induces NMDA receptor subunit one phosphorylation via ERK and PKC in the rat spinal cord », *Eur. J. Neurosci.*, vol. 20, n° 7, p. 1769-1778, oct. 2004.
- [130] M. Mizuno, K. Yamada, J. He, A. Nakajima, et T. Nabeshima, « Involvement of BDNF receptor TrkB in spatial memory formation », *Learn. Mem. Cold Spring Harb. N.*, vol. 10, n° 2, p. 108-115, avr. 2003.
- [131] M. V. Caldeira *et al.*, « Brain-derived Neurotrophic Factor Regulates the Expression and Synaptic Delivery of α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole Propionic Acid Receptor Subunits in Hippocampal Neurons », *J. Biol. Chem.*, vol. 282, n° 17, p. 12619-12628, avr. 2007.
- [132] X. Jiang, J. Zhou, D. C. Mash, A. M. Marini, et R. H. Lipsky, « Human BDNF isoforms are differentially expressed in cocaine addicts and are sorted to the regulated secretory pathway independent of the Met66 substitution », *Neuromolecular Med.*, vol. 11, n° 1, p. 1-12, 2009.
- [133] F. Zheng et H. Wang, « NMDA-mediated and self-induced bdnf exon IV transcriptions are differentially regulated in cultured cortical neurons », *Neurochem. Int.*, vol. 54, n° 5-6, p. 385-392, juin 2009.
- [134] R. Katoh-Semba *et al.*, « Riluzole enhances expression of brain-derived neurotrophic factor with consequent proliferation of granule precursor cells in the rat hippocampus », *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, vol. 16, n° 10, p. 1328-1330, août 2002.
- [135] F. Squitieri *et al.*, « Riluzole protects Huntington disease patients from brain glucose hypometabolism and grey matter volume loss and increases production of neurotrophins », *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, vol. 36, n° 7, p. 1113-1120, juill. 2009.
- [136] C. Henneberger, R. Jüttner, T. Rothe, et R. Grantyn, « Postsynaptic action of BDNF on GABAergic synaptic transmission in the superficial layers of the mouse superior colliculus », *J. Neurophysiol.*, vol. 88, n° 2, p. 595-603, août 2002.
- [137] F. Aguado *et al.*, « BDNF regulates spontaneous correlated activity at early developmental stages by increasing synaptogenesis and expression of the K⁺/Cl⁻ co-transporter KCC2 », *Development*, vol. 130, n° 7, p. 1267-1280, avr. 2003.
- [138] P. Penzes *et al.*, « The Neuronal Rho-GEF Kalirin-7 Interacts with PDZ Domain-Containing Proteins and Regulates Dendritic Morphogenesis », *Neuron*, vol. 29, n° 1, p. 229-242, janv. 2001.
- [139] A. Yoshii et M. Constantine-Paton, « BDNF induces transport of PSD-95 to dendrites through PI3K-AKT signaling after NMDA receptor activation », *Nat. Neurosci.*, vol. 10, n° 6, p. 702-711, juin 2007.
- [140] M. Bergami, B. Berninger, et M. Canossa, « Conditional deletion of TrkB alters adult hippocampal neurogenesis and anxiety-related behavior », *Commun. Integr. Biol.*, vol. 2, n° 1, p. 14-16, 2009.
- [141] C. R. Furini, J. I. Rossato, L. L. Bitencourt, J. H. Medina, I. Izquierdo, et M. Cammarota, « Beta-adrenergic receptors link NO/sGC/PKG signaling to BDNF expression

- during the consolidation of object recognition long-term memory », *Hippocampus*, vol. 20, n° 5, p. 672-683, mai 2010.
- [142] V. W. S. Kung, R. Hassam, A. J. Morton, et S. Jones, « Dopamine-dependent long term potentiation in the dorsal striatum is reduced in the R6/2 mouse model of Huntington's disease », *Neuroscience*, vol. 146, n° 4, p. 1571-1580, juin 2007.
- [143] K. Yamada et T. Nabeshima, « Brain-derived neurotrophic factor/TrkB signaling in memory processes », *J. Pharmacol. Sci.*, vol. 91, n° 4, p. 267-270, avr. 2003.
- [144] M. Korte, P. Carroll, E. Wolf, G. Brem, H. Thoenen, et T. Bonhoeffer, « Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic factor », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 92, n° 19, p. 8856-8860, sept. 1995.
- [145] P. Bekinschtein, M. Cammarota, et J. H. Medina, « BDNF and memory processing », *Neuropharmacology*, vol. 76 Pt C, p. 677-683, janv. 2014.
- [146] B. Knusel *et al.*, « Ligand-induced down-regulation of Trk messenger RNA, protein and tyrosine phosphorylation in rat cortical neurons », *Neuroscience*, vol. 78, n° 3, p. 851-862, juin 1997.
- [147] M. T. Sommerfeld, R. Schweigreiter, Y. A. Barde, et E. Hoppe, « Down-regulation of the neurotrophin receptor TrkB following ligand binding. Evidence for an involvement of the proteasome and differential regulation of TrkA and TrkB », *J. Biol. Chem.*, vol. 275, n° 12, p. 8982-8990, mars 2000.
- [148] D. del Toro, J. M. Canals, S. Ginés, M. Kojima, G. Egea, et J. Alberch, « Mutant huntingtin impairs the post-Golgi trafficking of brain-derived neurotrophic factor but not its Val66Met polymorphism », *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, vol. 26, n° 49, p. 12748-12757, déc. 2006.
- [149] D. M. Frim *et al.*, « Effects of biologically delivered NGF, BDNF and bFGF on striatal excitotoxic lesions », *Neuroreport*, vol. 4, n° 4, p. 367-370, avr. 1993.
- [150] D. Zala *et al.*, « Vesicular glycolysis provides on-board energy for fast axonal transport », *Cell*, vol. 152, n° 3, p. 479-491, janv. 2013.
- [151] J. M. Canals *et al.*, « Brain-derived neurotrophic factor regulates the onset and severity of motor dysfunction associated with enkephalinergic neuronal degeneration in Huntington's disease », *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, vol. 24, n° 35, p. 7727-7739, sept. 2004.
- [152] A. van Dellen, C. Blakemore, R. Deacon, D. York, et A. J. Hannan, « Delaying the onset of Huntington's in mice », *Nature*, vol. 404, n° 6779, p. 721-722, avr. 2000.
- [153] E. Hockly *et al.*, « Environmental enrichment slows disease progression in R6/2 Huntington's disease mice », *Ann. Neurol.*, vol. 51, n° 2, p. 235-242, févr. 2002.
- [154] J. K. Ryu *et al.*, « Proactive transplantation of human neural stem cells prevents degeneration of striatal neurons in a rat model of Huntington disease », *Neurobiol. Dis.*, vol. 16, n° 1, p. 68-77, juin 2004.
- [155] T. L. Spires *et al.*, « Environmental enrichment rescues protein deficits in a mouse model of Huntington's disease, indicating a possible disease mechanism », *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, vol. 24, n° 9, p. 2270-2276, mars 2004.
- [156] T. R. Rosenstock *et al.*, « FK506 ameliorates cell death features in Huntington's disease striatal cell models », *Neurochem. Int.*, vol. 59, n° 5, p. 600-609, oct. 2011.
- [157] C. Sinadinos *et al.*, « Live axonal transport disruption by mutant huntingtin fragments in *Drosophila* motor neuron axons », *Neurobiol. Dis.*, vol. 34, n° 2, p. 389-395, mai 2009.
- [158] M. A. Pouladi, A. J. Morton, et M. R. Hayden, « Choosing an animal model for the study of Huntington's disease », *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 14, n° 10, p. 708-721, oct. 2013.
- [159] J. Y. Li, N. Popovic, et P. Brundin, « The Use of the R6 Transgenic Mouse Models of Huntington's Disease in Attempts to Develop Novel Therapeutic Strategies », *NeuroRx*, vol.

2, n° 3, p. 447-464, juill. 2005.

[160] A. Giralt, A. Saavedra, O. Carretón, X. Xifró, J. Alberch, et E. Pérez-Navarro, « Increased PKA signaling disrupts recognition memory and spatial memory: role in Huntington's disease », *Hum. Mol. Genet.*, vol. 20, n° 21, p. 4232-4247, nov. 2011.

[161] G. J. Klapstein *et al.*, « Electrophysiological and morphological changes in striatal spiny neurons in R6/2 Huntington's disease transgenic mice », *J. Neurophysiol.*, vol. 86, n° 6, p. 2667-2677, déc. 2001.

[162] K. Q. Nguyen, V. V. Rymar, et A. F. Sadikot, « Impaired TrkB Signaling Underlies Reduced BDNF-Mediated Trophic Support of Striatal Neurons in the R6/2 Mouse Model of Huntington's Disease », *Front. Cell. Neurosci.*, vol. 10, p. 37, 2016.

[163] N. Nischan *et al.*, « Covalent attachment of cyclic TAT peptides to GFP results in protein delivery into live cells with immediate bioavailability », *Angew. Chem. Int. Ed Engl.*, vol. 54, n° 6, p. 1950-1953, févr. 2015.

[164] S. Lehmann *et al.*, « Systemic delivery of siRNA down regulates brain prion protein and ameliorates neuropathology in prion disorder », *PLoS One*, vol. 9, n° 2, p. e88797, 2014.

[165] S. Couly *et al.*, « Improvement of BDNF signalling by P42 peptide in Huntington's disease », *Hum. Mol. Genet.*, juin 2018.

[166] Z. C. Baquet, J. A. Gorski, et K. R. Jones, « Early striatal dendrite deficits followed by neuron loss with advanced age in the absence of anterograde cortical brain-derived neurotrophic factor », *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, vol. 24, n° 17, p. 4250-4258, avr. 2004.

[167] A. Ciamei et A. J. Morton, « Progressive imbalance in the interaction between spatial and procedural memory systems in the R6/2 mouse model of Huntington's disease », *Neurobiol. Learn. Mem.*, vol. 92, n° 3, p. 417-428, oct. 2009.

[168] B. K. Y. Wong *et al.*, « Hyperactivity, startle reactivity and cell-proliferation deficits are resistant to chronic lithium treatment in adult Nr2e1^{frc/frc} mice », *Genes Brain Behav.*, vol. 9, n° 7, p. 681-694, oct. 2010.

[169] T. Saarelainen *et al.*, « Activation of the TrkB neurotrophin receptor is induced by antidepressant drugs and is required for antidepressant-induced behavioral effects », *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, vol. 23, n° 1, p. 349-357, janv. 2003.

[170] D. F. Delotterie, C. Mathis, J.-C. Cassel, H. Rosenbrock, C. Dorner-Ciossek, et A. Marti, « Touchscreen tasks in mice to demonstrate differences between hippocampal and striatal functions », *Neurobiol. Learn. Mem.*, vol. 120, p. 16-27, avr. 2015.

[171] R. J. McDonald et N. M. White, « A triple dissociation of memory systems: Hippocampus, amygdala, and dorsal striatum », *Behav. Neurosci.*, vol. 127, n° 6, p. 835-853, déc. 2013.

[172] J. R. Whitlock, A. J. Heynen, M. G. Shuler, et M. F. Bear, « Learning induces long-term potentiation in the hippocampus », *Science*, vol. 313, n° 5790, p. 1093-1097, août 2006.

[173] E. Edelmann, E. Cepeda-Prado, M. Franck, P. Lichtenecker, T. Brigadski, et V. Leßmann, « Theta Burst Firing Recruits BDNF Release and Signaling in Postsynaptic CA1 Neurons in Spike-Timing-Dependent LTP », *Neuron*, vol. 86, n° 4, p. 1041-1054, mai 2015.

[174] S. Schildt, T. Endres, V. Lessmann, et E. Edelmann, « Acute and chronic interference with BDNF/TrkB-signaling impair LTP selectively at mossy fiber synapses in the CA3 region of mouse hippocampus », *Neuropharmacology*, vol. 71, p. 247-254, août 2013.

[175] S. B. Lang, V. Stein, T. Bonhoeffer, et C. Lohmann, « Endogenous brain-derived neurotrophic factor triggers fast calcium transients at synapses in developing dendrites », *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, vol. 27, n° 5, p. 1097-1105, janv. 2007.

[176] K. Botsakis *et al.*, « BNN-20, a synthetic microneurotrophin, strongly protects

- dopaminergic neurons in the “weaver” mouse, a genetic model of dopamine-denervation, acting through the TrkB neurotrophin receptor », *Neuropharmacology*, vol. 121, p. 140-157, juill. 2017.
- [177] P. Tapley, F. Lamballe, et M. Barbacid, « K252a is a selective inhibitor of the tyrosine protein kinase activity of the trk family of oncogenes and neurotrophin receptors », *Oncogene*, vol. 7, n° 2, p. 371-381, févr. 1992.
- [178] D. A. Simmons *et al.*, « Up-regulating BDNF with an ampakine rescues synaptic plasticity and memory in Huntington’s disease knockin mice », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 106, n° 12, p. 4906-4911, mars 2009.
- [179] M. Anglada-Huguet, A. Giralt, L. Rué, J. Alberch, et X. Xifró, « Loss of striatal 90-kDa ribosomal S6 kinase (Rsk) is a key factor for motor, synaptic and transcription dysfunction in Huntington’s disease », *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.*, vol. 1862, n° 7, p. 1255-1266, juill. 2016.
- [180] V. Rawat, W. Goux, M. Piechaczyk, et S. R. D’Mello, « c-Fos Protects Neurons Through a Noncanonical Mechanism Involving HDAC3 Interaction: Identification of a 21-Amino Acid Fragment with Neuroprotective Activity », *Mol. Neurobiol.*, vol. 53, n° 2, p. 1165-1180, mars 2016.
- [181] K. R. Weiss et J. T. Littleton, « Characterization of axonal transport defects in *Drosophila* Huntingtin mutants », *J. Neurogenet.*, vol. 30, n° 3-4, p. 212-221, déc. 2016.
- [182] B. Zhu *et al.*, « *Drosophila* Neurotrophins Reveal a Common Mechanism for Nervous System Formation », *PLoS Biol.*, vol. 6, n° 11, p. e284, 2008.
- [183] « GAL4 system in *drosophila*: A fly geneticist’s swiss army knife - Duffy - 2002 - genesis - Wiley Online Library », août 2018.
- [184] A. Virlogeux *et al.*, « Reconstituting Corticostriatal Network on-a-Chip Reveals the Contribution of the Presynaptic Compartment to Huntington’s Disease », *Cell Rep.*, vol. 22, n° 1, p. 110-122, janv. 2018.
- [185] L. Crouzier, D. Gilibert, M. Rossel, F. Trousse, et T. Maurice, « Topographical memory analyzed in mice using the Hamlet test, a novel complex maze », *Neurobiol. Learn. Mem.*, vol. 149, p. 118-134, mars 2018.
- [186] L. Crouzier et T. Maurice, « Assessment of Topographic Memory in Mice in a Complex Environment Using the Hamlet Test », *Curr. Protoc. Mouse Biol.*, vol. 8, n° 2, p. e43, juin 2018.
- [187] T. Baraldi *et al.*, « Cognitive stimulation during lifetime and in the aged phase improved spatial memory, and altered neuroplasticity and cholinergic markers of mice », *Exp. Gerontol.*, vol. 48, n° 8, p. 831-838, août 2013.
- [188] Q. Zhang *et al.*, « Assessing a peptidyl inhibitor-based therapeutic approach that simultaneously suppresses polyglutamine RNA- and protein-mediated toxicities in patient cells and *Drosophila* », *Dis. Model. Mech.*, vol. 9, n° 3, p. 321-334, mars 2016.
- [189] Q. Zhang *et al.*, « A brain-targeting lipidated peptide for neutralizing RNA-mediated toxicity in Polyglutamine Diseases », *Sci. Rep.*, vol. 7, n° 1, p. 12077, sept. 2017.
- [190] Q. Zhang *et al.*, « A peptidyl inhibitor for neutralizing expanded CAG RNA-induced nucleolar stress in polyglutamine diseases », *RNA N. Y. N.*, vol. 24, n° 4, p. 486-498, 2018.
- [191] H. Tsoi, T. C.-K. Lau, S.-Y. Tsang, K.-F. Lau, et H. Y. E. Chan, « CAG expansion induces nucleolar stress in polyglutamine diseases », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 109, n° 33, p. 13428-13433, août 2012.
- [192] Q. Zhang *et al.*, « Assessing a peptidyl inhibitor-based therapeutic approach that simultaneously suppresses polyglutamine RNA- and protein-mediated toxicities in patient cells and *Drosophila* », *Dis. Model. Mech.*, vol. 9, n° 3, p. 321-334, mars 2016.
- [193] C. Zuccato, M. Valenza, et E. Cattaneo, « Molecular mechanisms and potential

- therapeutical targets in Huntington's disease », *Physiol. Rev.*, vol. 90, n° 3, p. 905-981, juill. 2010.
- [194] E. E. Watkin *et al.*, « Phosphorylation of mutant huntingtin at serine 116 modulates neuronal toxicity », *PloS One*, vol. 9, n° 2, p. e88284, 2014.
- [195] S. Gunawardena *et al.*, « Disruption of axonal transport by loss of huntingtin or expression of pathogenic polyQ proteins in *Drosophila* », *Neuron*, vol. 40, n° 1, p. 25-40, sept. 2003.
- [196] G. R. Lewin et B. D. Carter, Éd., *Neurotrophic Factors*, vol. 220. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2014.
- [197] L. Lei et L. F. Parada, « Transcriptional regulation of Trk family neurotrophin receptors », *Cell. Mol. Life Sci. CMLS*, vol. 64, n° 5, p. 522-532, mars 2007.
- [198] M. Righi, E. Tongiorgi, et A. Cattaneo, « Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) induces dendritic targeting of BDNF and tyrosine kinase B mRNAs in hippocampal neurons through a phosphatidylinositol-3 kinase-dependent pathway », *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, vol. 20, n° 9, p. 3165-3174, mai 2000.
- [199] B. Sutcliffe, M. G. Forero, B. Zhu, I. M. Robinson, et A. Hidalgo, « Neuron-Type Specific Functions of DNT1, DNT2 and Spz at the *Drosophila* Neuromuscular Junction », *PLoS ONE*, vol. 8, n° 10, p. e75902, oct. 2013.
- [200] B. Franco *et al.*, « Shaggy, the homolog of glycogen synthase kinase 3, controls neuromuscular junction growth in *Drosophila* », *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, vol. 24, n° 29, p. 6573-6577, juill. 2004.

Article publié



ORIGINAL ARTICLE

Improvement of BDNF signalling by P42 peptide in Huntington's disease

Simon Couly^{1,†}, Alexia Paucard^{1,†}, Nathalie Bonneaud¹, Tangui Maurice¹, Lorraine Benigno², Christophe Jourdan¹, Catherine Cohen-Solal³, Michel Vignes³ and Florence Maschat^{1,*}

¹MMDN, Univ-Montpellier, EPHE, INSERM, UMR-S1198, Montpellier F-34095, France, ²Medesis Pharma, Baillargues F-34670, France and ³IBMM-UMR5247, Univ-Montpellier, Montpellier F-34095, France

*To whom correspondence should be addressed at: MMDN, INSERM U1198, Université de Montpellier, Place E. Bataillon, CC 105, 34095 Montpellier Cedex 05, France. Tel: +33 0467144270; Fax: +33 0467149295; Email: florence.maschat@umontpellier.fr

Abstract

Huntington's disease (HD) is caused by a mutation in the Huntingtin (HTT) protein. We previously reported that the 23aa peptide of HTT protein, P42, is preventing HD pathological phenotypes, such as aggregation, reduction of motor performances and neurodegeneration. A systemic treatment with P42 during the pre-symptomatic phase of the disease showed therapeutic potential in R6/2 mice. We here tested P42 effects when administered during the post-symptomatic phase. The P42 treatment alleviated deficits in motor performances, even when symptoms have already started. Because changes in the level and activity of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) have been shown to play a central role in HD, we analysed the influence of P42 on BDNF deficit and associated phenotypes. Our data suggest that P42 is involved in the spatio-temporal control of *bdnf* and *trkB* mRNA and their protein levels. Related to this enhancement of BDNF-TrkB signalling, R6/2 mice treated with P42, exhibit reduced anxiety, better learning and memory performances, and better long-term potentiation (LTP) response. Finally we identified a direct influence of P42 peptide on neuronal plasticity and activity. These results suggest that P42 offers an efficient therapeutic potential not only by preventing aggregation of mutant HTT at early stages of the disease, but also by favouring some physiological functions of normal HTT, as P42 is naturally part of it, at the different stages of the disease. This makes P42 peptide potentially suitable not only to prevent, but also to treat HD.

Introduction

Huntington's disease (HD) is a rare neurodegenerative disease, with a prevalence varying between regions across the world, with the highest rate among the Caucasians with 1.3–1.7 per 10 000 (1–3). It is a genetic disease that results from abnormal expansion of a polyQ domain in the Huntingtin (HTT) protein. When this domain contains more than 35 Glutamines (Q), the polyQ-HTT protein is mutant. The HTT protein is quite large (3144 aa) and is normally cleaved (4). N-terminus fragments with

expanded polyQ, derived either from protein cleavage or from the use of alternative splicing site on the mRNA, are highly toxic (5–7). When accumulating, these mutant polyQ-HTT fragments form aggregates, and drive neurodegeneration primarily affecting the striatum but also other brain areas at late stages of the disease, leading to a loss of the brain volume and an enlargement of ventricles (8). Severe motor, but also cognitive and psychiatric symptoms are also associated with the disease (9,10). Loss of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) was found to play an

[†]These authors contributed equally to this work.

Received: March 30, 2018. Revised: May 22, 2018. Accepted: May 23, 2018

© The Author(s) 2018. Published by Oxford University Press. All rights reserved.

For permissions, please email: journals.permissions@oup.com

important role in motor but also in cognitive and neuropsychiatric defects in HD, and to contribute to striatal neurodegeneration (11). A decrease of both *bdnf* mRNA and protein is detected in cerebral cortex from HD patients (12) and in R6/2 mouse model of HD (13). The level of expression and the transport of the BDNF were identified to be key contributors of striatal neurodegeneration and HD pathogenesis (14). Notably, HTT enhances BDNF vesicular transport along microtubules (15). Although BDNF has emerged as a key regulator in the selective vulnerability of striatal neurons in HD, its activity also requires the modulation of its receptor, Tropomyosin-related kinase B (TrkB) (16). In particular an increase in dendritic trafficking of *trkB* mRNA and its local translation could contribute to a rapid response to BDNF (17).

The identification of a curative treatment against this disease is still actively sought. HD is an autosomal dominant disease, and the only presence of one mutated allele is sufficient for the occurrence of the symptoms. Associated to that, it has been observed that the ratio between normal HTT and mutant polyQ-HTT is crucial in the onset and progression of the disease (15,18–24). We indeed found that polyQ-HTT aggregation in HeLa cells is prevented in the presence of around 600aa N-terminal part of normal HTT from Human or *Drosophila* (23). This led to identify, within normal human HTT, a 23aa peptidic domain (P42), sharing homologies with *Drosophila* that prevents aggregation process in HeLa cells. *In vivo*, we found that P42 was protective of different phenotypes induced by the expression of the polyQ-HTT in *Drosophila* (25), but also in R6/2 mouse model of HD (26). Transgenic R6/2 mice express the first exon1 of mutant human HTT in presence of around 120 CAG repeats corresponding to a very severe model of HD (10). However this model recapitulates many of the clinical features of HD, including lower motor performances with enhanced involuntary reflex movements, body weight loss, reduction of brain volume and decreased BDNF signalling associated with a loss of memory and enhanced anxiety, corresponding to a panel of HD symptoms in humans (17,27,28). Therefore, this model is particularly suitable to test treatments, since the first symptoms of R6/2 mice start at around week 6, leading to their death when 14 weeks old (9).

Therapeutic peptides present advantages, as being potentially not toxic, but also some inconveniences. Indeed most of them do not cross the blood–brain barrier and when entering cells they are rapidly degraded. To overcome these problems, we previously tested an original strategy for P42 delivery, where P42TAT fusion peptide was dissolved in the aqueous phase of water-in-oil microemulsions (Aonys[®] technology developed by Medesis pharma, Baillargues, France). This P42TAT-Aonys[®] treatment (referred as P42T treatment) allows non-invasive buccal/rectal mucosal repetitive administrations of the peptide. Such treatment with P42T in R6/2 mice has already been tested from week 2 before onset of symptoms, confirming the potential use of P42T as a preventive treatment of HD (26).

In order to determine whether P42T could also be used to treat HD symptoms, we tested its actions when applied post-symptomatically, from week 7. In this report, we analysed the phenotypical consequences of a post-symptomatic P42T treatment of R6/2 mice, compared with a pre-symptomatic treatment, and showed that the late action of P42T may occur through an enhancement of the BDNF-TrkB signalling. Finally, we also identified a direct effect of P42T on synaptic plasticity and neuronal activity.

Results

In this report, mice cohorts were treated either with P42TAT fusion peptide formulated in Aonys[®] water-in-oil microemulsions

(P42T) or empty ones used as placebo control (NT). The question we asked was whether a treatment with P42T could be used to treat HD symptoms at later stages of the disease, once the symptoms have already appeared (9), starting the treatment at week 7 (Fig. 1A).

Post-symptomatic treatment with P42T

HD is characterized by a neostriatal volume loss first detected in 6-week-old R6/2 mice (11). This leads to a significant enlargement of the ventricles in 12-week-old placebo R6/2 mice (treated with empty microemulsions) (NT), compared with wild-type (Wt) mice (Fig. 1B, see Supplementary Material, Fig. S1 for genotyping). P42T treatment provided at late stages of the disease was significantly reducing brain atrophy, suggesting a slowdown of the neuronal degeneration of the striatum.

This confirms that P42T treatment is able not only to prevent neuronal defects (26), but also may be useful to treat neurodegeneration induced in the context of the disease.

Other prominent phenotypic changes in R6/2 mice are deficits in their motor performances (10), which we assessed using the rotarod test. At week 7 when the post-symptomatic treatment starts, R6/2 mice all presented significant lower motor performances than Wt mice, without significant differences in R6/2 groups that will be treated or not with P42T from week 7 (ns) (Fig. 1C). On the contrary, we observed that, after the treatment started, P42T-treated R6/2 mice exhibited significantly improved performances over time with respect to placebo R6/2 mice (NT), as evaluated by two-way ANOVA (* $P < 0.05$; Fig. 1C). For instance, at week 8 and week 9, P42T-treated R6/2 mice exhibited 18% better performances compared with untreated R6/2 mice (Fig. 1C).

These data showed that the P42T post-symptomatic treatment improved motor symptoms in R6/2 HD mice.

P42 peptide was previously shown to prevent aggregation process in different models of HD (25), including R6/2 mice when provided during the pre-symptomatic phase, where the number (but not the size) of aggregates was found to be significantly reduced by 50% (26).

Here we monitored the number and the size of the aggregates present in R6/2 mice treated with P42T starting later at week 7. After quantification on brain sections, we found that, unlike after P42T pre-symptomatic treatment, the number and size of these nuclear inclusions were not significantly reduced by post-symptomatic P42T treatment (Fig. 1D).

This indicates that although P42T prevented the formation of aggregates (2,25,26), it failed to destruct them once they are formed.

Therefore, we suspected that the late effects of P42T on the neuronal fate that we observed might involve other modes of action than its previously identified role on aggregation process.

Relationships between P42T and BDNF signalling

Because BDNF plays a central role in HD, we analysed the influence of P42T on BDNF content. A reduction of the *bdnf* expression level in the cortex depletes BDNF in the striatum and leads to severe motor deficits. HTT protein was found to play a crucial role in both the production and the transport of BDNF (15,29), processes that are disrupted in HD. P42 being a part of the HTT protein (25), we asked whether P42T could interfere with BDNF alteration noticed in HD, which might explain an action of P42T, during all the phases of the disease, pre-symptomatic (starting

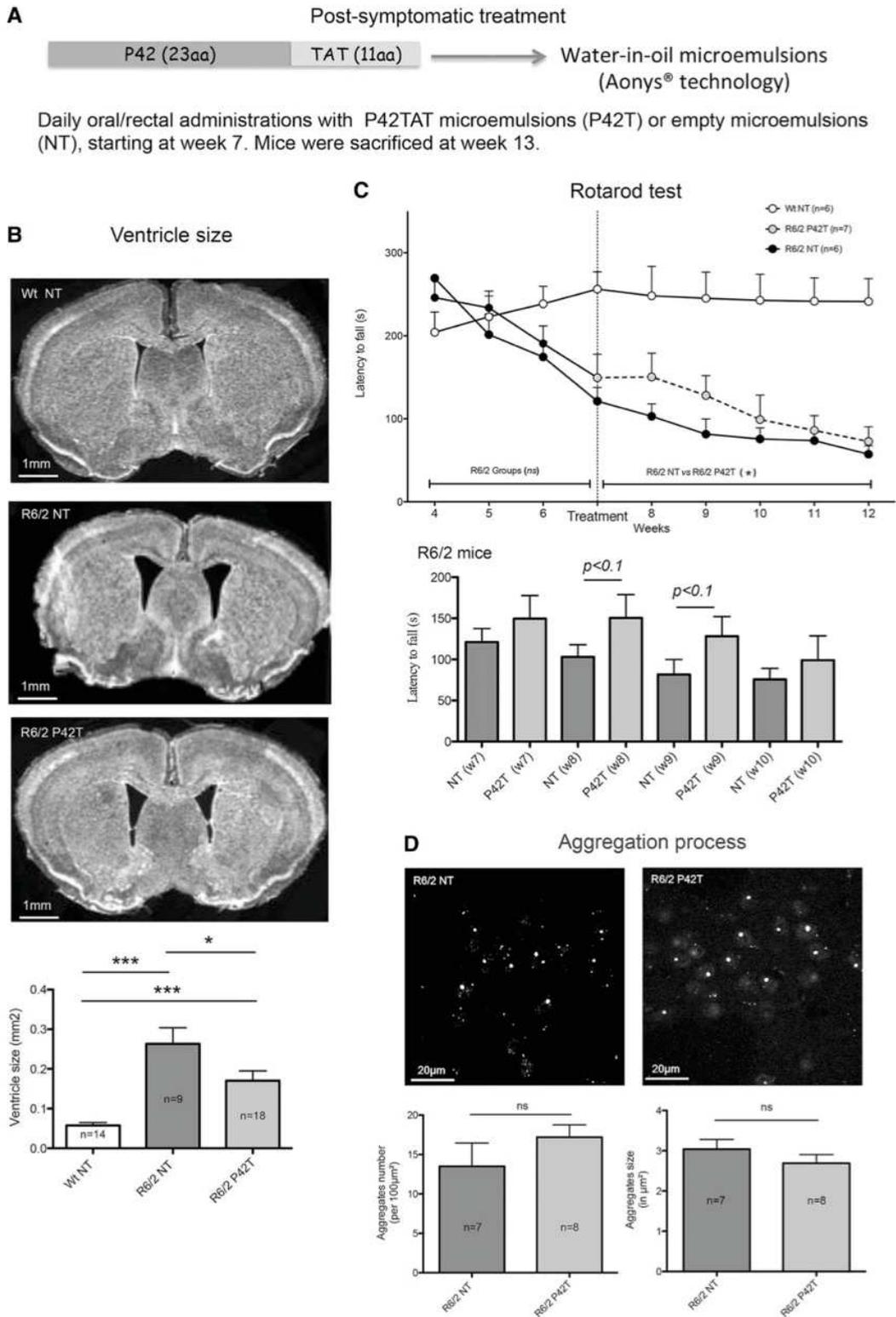


Figure 1. Post-symptomatic treatment with P42 peptide. (A) Experimental design for the P42 treatment. Mice were treated with P42TAT (P42T) or placebo empty Aonys® microemulsions (NT) provided by daily buccal and rectal mucosal administrations, starting at week 7 for post-symptomatic treatment. (B) Analysis of ventricle size: brain sections of Wt NT, and R6/2 NT or R6/2 P42T were stained with DAPI. Slices corresponding to -0.6 or -0.8 mm Bregma point were selected with the slide scanner Nanozoomer Hamatsu and the size of the ventricles measured. Ventricle size varies in the different conditions. Using Mann-Whitney test: Wt NT (0.058 ± 0.007 , $n = 14$) versus R6/2 NT (0.263 ± 0.041 , $n = 10$); *** $P < 0.001$; R6/2 NT (0.263 ± 0.041 , $n = 10$) versus R6/2 P42T (0.170 ± 0.025 , $n = 18$); * $P < 0.05$; Wt (0.058 ± 0.007 , $n = 14$) versus R6/2 P42T (0.170 ± 0.025 , $n = 18$); *** $P < 0.001$. A significant recovery exists but the recovery is not complete. (C) Rotarod test: motor performances were

at week 2) or post-symptomatic (starting at week 7), independently of its action on aggregation process. Therefore we compared the effects of shorter and more immediate treatment (post-symptomatic: 'short-term') and longer (pre-symptomatic: 'long-term') treatment with P42T on BDNF levels of expression (mRNA quantified by RT-qPCR and proteins quantified relative to total proteins, using Stain-Free™ method and western blots, see Supplementary Material, Fig. S2). Analyses were carried out in the cortex and in the striatum (Fig. 2) that have been separately dissected.

We first confirmed that BDNF levels of expression in the cortex (both mRNA and proteins) were significantly reduced in R6/2 mice compared with Wt mice treated with empty microemulsions (Fig. 2A). We also observed that when P42T treatment started during the pre-symptomatic phase of the disease, P42T-treated R6/2 mice presented slightly higher level of expression of *bdnf* mRNA in the cortex ($0.05 < P < 0.1$; Fig. 2A). This suggested that P42T has the ability to interfere on *bdnf* transcriptional level that is affected in HD.

We further tried to better identify the action of P42T on BDNF signalling.

Most of the phenotypes affected in HD result from the BDNF signalling, mediated by the TrkB receptor (30). A reduction of the *trkB* mRNA level of expression has been noticed in HD mouse models, and the effectiveness of BDNF was shown to depend on the proper expression of TrkB (16).

Therefore we decided to analyse the action of P42T on the level of expression of both the *bdnf* and its receptor *trkB* in the cortex when providing the peptide during the pre-symptomatic or the post-symptomatic phases of the disease (Fig. 2).

We first confirmed that, like for *bdnf*, the level of expression of *trkB* mRNA was significantly reduced in the cortex (Fig. 2B) of R6/2 mice.

We also found that whereas a longer pre-symptomatic treatment with P42T drives an enhancement of both *bdnf* and *trkB* mRNA expressions in the cortex (Fig. 2A and B), a short-term post-symptomatic treatment only leads to an improvement of *trkB* in the cortex (Fig. 2B), suggesting that P42T seems to primarily act on *trkB*, therefore ensuring an enhancement of the BDNF signalling activity in the cortex. Protein levels of TrkB were however not reduced in R6/2 cortex (Fig. 2B and C), as observed previously (16). Globally the effects of P42T on both the *bdnf* and *trkB* in the cortex were only detectable at the transcriptional level.

In the striatum (Fig. 2D–F) which is particularly vulnerable to BDNF signalling deficit (16), we found that P42T significantly enhances the *bdnf* transcriptional level when mice undergo a long-term pre-symptomatic treatment, without modifying BDNF protein levels (Fig. 2D). Note that in the striatum BDNF proteins essentially correspond to the mature forms (compare Fig. 2F with 2C). Notably, we have identified that P42T acts primarily at the level of the TrkB protein (Fig. 2E and F), with both long-term and short-term P42T treatments. This significant increase in TrkB protein could ensure a rapid activation of the BDNF signalling in the striatum.

To summarize, in the cortex and in the striatum, only P42T long-term pre-symptomatic treatment increases *bdnf* mRNA

(Fig. 2A and D), whereas P42T treatments (pre- and post-) increase *trkB* mRNA in the cortex (Fig. 2B), and TrkB protein in the striatum (Fig. 2E and F).

These data show that treatment with P42T improves spatio-temporally the expressions of *bdnf* and *trkB*, which would optimize the signalling by BDNF.

Effect of P42T on anxiety and memory in R6/2 mice

These defects of the BDNF signalling pathway in the pathogenesis of HD play a pivotal role, and contribute to synaptic dysfunction and synaptic plasticity deficits, which impacts the cognitive decline and motor deficits observed in HD (11). Since P42T enhances the expression levels of *bdnf* and *trkB*, we tested other defects impaired in HD that are related to a reduction in BDNF signalling.

Associated to severe motor impairments, psychiatric and cognitive problems are present in HD. At the behavioural level, HD pathogenesis drives problems in learning and memory and enhances anxiety, which even precede the onset of motor deficits (31). BDNF-TrkB signalling deficit is required in the learning and memory impairment in HD (32). We therefore tested the effect of P42T treatment on these different behavioural responses.

The light/dark transition test is one of the most widely used test to measure anxiety-like behaviour in mice. The test is based on the natural aversion of mice to brightly illuminated areas and on their spontaneous exploratory behaviour in novel environment. The apparatus consists of a dark chamber and a brightly illuminated chamber. Mice are allowed to move freely between the two chambers. Wt mice spend half of their time in the light box (Fig. 3A). R6/2 mice rather avoid the light box, spending around 35% of their time in the bright compartment ($*P < 0.05$). The effect of P42T on anxiety response in R6/2 mice appeared limited, with statistic tests that did not reach significance. However, we observed that, for both the pre-symptomatic and post-symptomatic treatments, P42T alleviated this trend since P42T-treated R6/2 mice behaved like Wt mice, with non-significant differences (Fig. 3A). This shows that R6/2 mice tend to be less anxious under treatment with P42T.

To confirm this result, we also used an open-field response. Indeed, during the habituation phase (S1), in absence of any object, we analysed the time spent in the central area of the arena. Whereas increased anxiety results in preference for the edges of the arena, decreased anxiety leads to longer exploration of the central part. As expected, R6/2 mice were significantly more anxious than Wt mice, by spending less than half the time in the central part compared with Wt. R6/2 mice treated, pre- or post-symptomatically, with P42T, behave like Wt mice and spend twice more time to explore the central arena (Fig. 3B). This corroborates the trends observed in the light/dark box test, and confirms the benefit of treatment with P42T on anxiety.

Impaired learning that occurs before or concurrent with motor dysfunction or neuron loss has been described in HD mouse models. The memory was assessed by using object recognition task. In the squared arena in presence of two objects (similar in session S2, and one novel in session S3), we analysed the

analysed on Wt NT, and R6/2 NT or R6/2 P42T ($n = 6-7$). Before treatment, R6/2 mice all present similar performances [Two-way ANOVA: $F_{(3, 44)} = 0.69$, $P = 0.56$ —ns: non-significant], that are significantly reduced comparative to Wt NT [two-way ANOVA: $F_{(3, 96)} = 19.26$, $***P < 0.0001$]. A significant effect of P42T treatment is detected over time on R6/2 mice [two-way ANOVA: $F_{(1, 96)} = 4.80$, $*P = 0.0308$]. A closer comparison of P42T treatment on R6/2 mice compared to placebo (NT) shows that there are notable trends of motor improvement during 2 weeks (weeks 8 and 9) (Mann-Whitney test: $0.05 < P < 0.1$ in both cases). (D) Analysis of aggregates in the striatum: aggregates were detected with anti-HTT on brain sections of 13-week-old R6/2 mice, treated with placebo (NT) or with P42T as indicated. Quantifications show that the number and size of aggregates are not changing significantly with P42T post-symptomatic treatment. Data represent means \pm SEM ($n = 7$ or 8 as indicated), and were analysed using Mann-Whitney test (ns: non-significant).

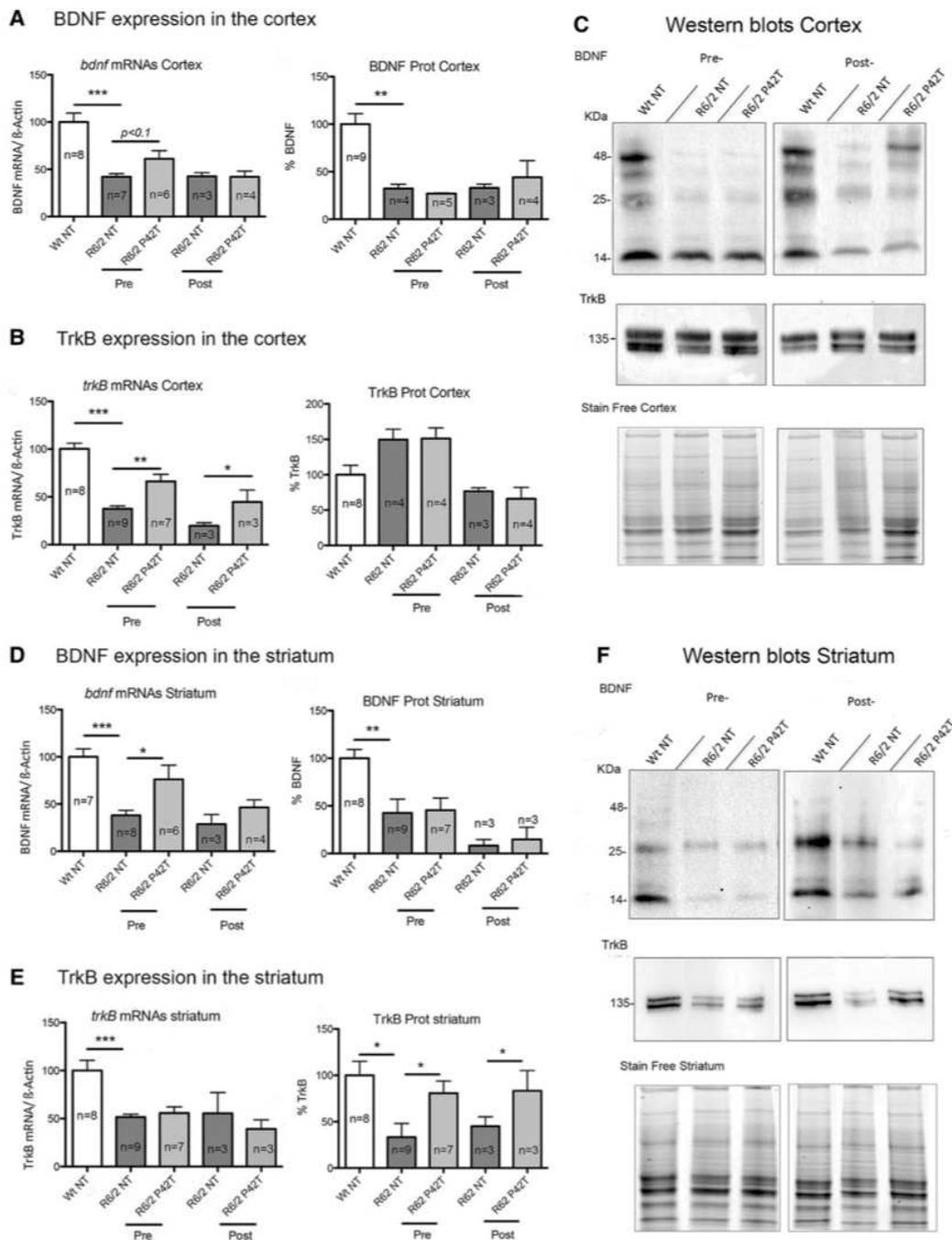


Figure 2. Analysis of BDNF and TrkB levels of expression. mRNA and protein levels were measured from dissected cortex (A–C) and striatum (D–F) of Wt and R6/2 mice treated with P42 (P42T) or not (NT). Treatments were pre-symptomatic (Pre) or post-symptomatic (Post). RT-qPCR were performed on mRNA extracted from dissected tissues. All samples were normalized to β -actin reference, and quantifications were performed on triplicates and are expressed as fold change versus Wt mice (100%). Protein levels from the same animals were analysed by western blots. Three major forms of the BDNF are detected: 48 kDa corresponding to the pro-BDNF, 14 kDa corresponding to the mature BDNF and 25 kDa corresponding to the dimeric form (65). Quantifications were performed on all the three forms. TrkB presents two forms around 135 kDa. Levels of protein expressions were quantified versus total proteins evaluated for each lane by Bio-Rad Stain-Free™ technology for normalization (Supplementary Material, Fig. S2). Quantifications were performed on duplicates, and are expressed versus Wt mice (100%). (A) Quantification of BDNF expression in the cortex: the level of expression of *bdnf* mRNAs in the cortex significantly varies in the different conditions (Kruskal–Wallis: $H = 16.5$, $**P = 0.0024$). Using Mann–Whitney test: Wt NT (used as reference) (100.0 ± 9.49 , $n = 8$) versus R6/2 NT (42.12 ± 3.16 , $n = 7$): $***P = 0.0002$; Pre: R6/2 NT (42.12 ± 3.16 , $n = 7$) versus R6/2 P42T (61.12 ± 8.55 , $n = 6$): $P = 0.069$. Post: R6/2 NT (42.47 ± 3.89 , $n = 3$) versus R6/2 P42T (42.05 ± 6.09 , $n = 4$): $P = 0.50$ (ns). The level of expression of BDNF proteins in the cortex significantly varies in the different conditions. (Kruskal–Wallis: $H = 13.77$, $**P = 0.0080$). Using Mann–Whitney test: Wt NT (used as reference) (100.0 ± 11.11 , $n = 9$) versus R6/2 NT (31.77 ± 8.09 , $n = 4$): $**P = 0.0056$; Pre: R6/2 NT (31.77 ± 8.09 , $n = 4$) versus R6/2 P42T (26.98 ± 0.67 , $n = 5$): $P = 0.319$ (ns). Post: R6/2 NT (32.90 ± 4.01 , $n = 3$) versus R6/2 P42T (44.14 ± 17.45 , $n = 4$): $P = 0.46$ (ns). (B) Quantification of TrkB expression in the cortex: the level of expression of *trkB* mRNAs in the cortex significantly varies in the different conditions. (Kruskal–Wallis: $H = 13.77$, $**P = 0.0080$). Using Mann–Whitney test: Wt NT (used as reference) (100.0 ± 11.11 , $n = 9$) versus R6/2 NT (31.77 ± 8.09 , $n = 4$): $**P = 0.0056$; Pre: R6/2 NT (31.77 ± 8.09 , $n = 4$) versus R6/2 P42T (26.98 ± 0.67 , $n = 5$): $P = 0.319$ (ns). Post: R6/2 NT (32.90 ± 4.01 , $n = 3$) versus R6/2 P42T (44.14 ± 17.45 , $n = 4$): $P = 0.46$ (ns).

number of visits for both objects and define the ratio (%) between the number of visits for object at position 2 over the total number of visits, providing a recognition index (Fig. 3C).

During the training session (S2), Wt or R6/2 mice treated or not with P42T pre- or post-symptomatically, showed a similar exploration of both identical objects whatever their position (Fig. 3C).

During the memory session (S3), untreated Wt, but not R6/2 mice, showed a significant preferential exploration of novel object at position 2 ($^{\#}P < 0.05$ versus theoretical level 50%; Fig. 3C). The P42T treatments restored a preferential exploration of the novel object, indicating that the peptide treatment significantly improved recognition memory. Note that pre-symptomatic or post-symptomatic treatments both induced similar effects, with a recognition index greater than 50%.

We therefore observed that P42T-treated R6/2 mice recovered memory alterations, a behavioural consequence coherent with the effect of P42T on *bdnf* levels.

P42T treatment restores LTP in hippocampal slices prepared from R6/2 mice

Abnormalities in BDNF expression and trafficking detected in HD lead to synaptic dysfunction and synaptic plasticity deficits (33,34), which could account at least in part for the HD symptoms. R6/2 mice indeed present deficits in hippocampal long-term potentiation (LTP), a form of synaptic plasticity widely regarded as a neurobiological substrate for memory (35). Because *bdnf* mRNA levels are substantially reduced in R6/2 mice and since up-regulating endogenous BDNF was shown to restore LTP in HD mice (34), we tested whether P42T that is enhancing the BDNF-TrkB signalling pathway, would reverse LTP deficits in the mutant mice.

For this, LTP was triggered by applying brief high-frequency stimulation (100 Hz, 1 s), in the CA1 area of the hippocampus of R6/2 mice treated or not with P42T (pre-symptomatic treatment), and of age-matched Wt mice as control (Fig. 4). Wt animals show a robust and stable LTP of fEPSP expressed as a percentage of baseline level (Fig. 4A and B in white). In slices from R6/2 mice, this level was significantly decreased to percentage of basal level (Fig. 4A and B in black, see representative fEPSP traces in Fig. 4C). However, in slices from R6/2 mice treated with P42T, LTP level percentage was recovered (Fig. 4A and B in grey) to a normal percentage, not significantly different from the level obtained in control Wt animals (Fig. 4B).

These findings confirm first that mutant HTT severely impairs the induction of LTP (Fig. 4A and B) and second that chronic treatment with P42T delays LTP loss observed in the hippocampus of R6/2 mutant mice.

We further tested whether infusing directly P42TAT peptide (100 nM solution) for 20 min would detectably change baseline transmission in mice brain slices. Acute application of P42TAT peptide (100 nM solution) for 20 min tends to stimulate potentiation on R6/2 mice slices ($P < 0.1$; Fig. 5A and C). Notably, it induced an enduring and significant potentiation of the excitatory synaptic transmission in the CA1 area of the hippocampus of R6/2 mice that were previously treated with P42T (pre-symptomatic treatment) ($^*P < 0.05$; Fig. 5B and C). This shows that the prior exposure with P42T significantly amplifies the response (Fig. 5C).

To confirm this direct effect of P42TAT peptide, we further infused hippocampal slices of Wt mice with three different concentrations of P42TAT peptide solutions (100 nM, 10 μ M and 20 μ M), and identified a dose-response effect (Fig. 6A), with only a slight change of baseline transmission at 100 nM (Fig. 6A in black), as previously shown on R6/2 mice (Fig. 5A), and a significant potentiation with higher concentrations 10 μ M ($^*P = 0.05$; Fig. 6A in grey) and 20 μ M ($^*P = 0.05$; Fig. 6A in white).

These results suggest that P42T is able to facilitate neuronal plasticity acutely, in hippocampal cells, in mutant, but also in Wt mice. Related to this, *trkb* mRNAs and proteins were found significantly enhanced in Wt hippocampal cells after P42T treatment (Supplementary Material, Fig. S3).

Next, we addressed the presynaptic or the postsynaptic origin of changes in synaptic efficacy induced by P42TAT. To this end, we performed paired-pulse stimuli (S1 and S2 stimulations), which consisted of two close stimulating pulses of the same intensity and duration, but with a shorter interval of 50 ms (36,37), before and after the application of 10 μ M P42TAT (Fig. 6B).

If P42TAT is acting at the presynaptic site, we expect a change in the paired-pulse ratio (PPR: S2/S1) after P42TAT incubation. In contrast, we expect the PPR to remain stable for post-synaptic effect, particularly because of the postsynaptic receptor population that should not have time to change during paired-pulse stimulation.

By testing paired pulse before and after P42TAT application (with representative traces shown on Fig. 6B), we found that the PPR remains unchanged (Fig. 6B). While amplitudes of individual currents are enhanced by the treatment (Fig. 6B), the PPR

different conditions. (Kruskal-Wallis: $H = 23.23$, $^{***}P = 0.0001$). Using Mann-Whitney test: Wt NT (used as reference) (100 ± 5.94 , $n = 8$) versus R6/2 NT (37.53 ± 3.04 , $n = 9$): $^{***}P < 0.0001$; Pre: R6/2 NT (37.53 ± 3.04 , $n = 9$) versus R6/2 P42T (66.16 ± 7.55 , $n = 7$): $^{**}P = 0.001$. Post: R6/2 NT (19.71 ± 3.23 , $n = 3$) versus R6/2 P42T (44.72 ± 12.51 , $n = 3$): $^*P = 0.05$. The level of expression of TrkB proteins in the cortex does not significantly vary in the different conditions. Pre: Kruskal-Wallis: $H = 5.81$ $P = 0.055$ (ns). Post: Kruskal-Wallis: $H = 3.06$, $P = 0.2167$ (ns). (C) Representative blots for each antibody (anti-BDNF and anti-TrkB) are depicted. Levels of expressions were quantified against total proteins for each lane, using Stain-Free normalization. (D) Quantification of BDNF expression in the striatum: the level of expression of *bdnf* mRNAs in the striatum significantly varies in the different conditions. (Kruskal-Wallis: $H = 16.03$, $^{**}P = 0.0030$). Using Mann-Whitney test: Wt NT (used as reference) (100.0 ± 8.43 , $n = 7$) versus R6/2 NT (37.92 ± 5.38 , $n = 8$): $^{***}P = 0.0002$; Pre: R6/2 NT (37.92 ± 5.38 , $n = 8$) versus R6/2 P42T (76.02 ± 15.16 , $n = 6$): $^*P = 0.0296$. Post: R6/2 NT (28.68 ± 10.28 , $n = 3$) versus R6/2 P42T (46.46 ± 7.98 , $n = 4$): $P = 0.1143$ (ns). The level of expression of BDNF proteins in the striatum significantly varies in the different conditions. (Kruskal-Wallis: $H = 14.11$, $^{**}P = 0.0070$). Using Mann-Whitney test: Wt NT (used as reference) (100.0 ± 9.18 , $n = 8$) versus R6/2 NT (42.51 ± 14.61 , $n = 4$): $^{**}P = 0.0081$; Pre: R6/2 NT (42.51 ± 14.61 , $n = 4$) versus R6/2 P42T (45.44 ± 12.79 , $n = 5$): $P = 0.3651$ (ns). Post: R6/2 NT (8.26 ± 6.48 , $n = 3$) versus R6/2 P42T (14.86 ± 12.68 , $n = 4$): $P = 0.4286$ (ns). (E) Quantification of TrkB expression in the striatum: the level of expression of *trkb* mRNAs in the striatum significantly varies in the different conditions. (Kruskal-Wallis: $H = 13.02$, $^*P = 0.0112$). Using Mann-Whitney test: Wt NT (used as reference) (100 ± 10.71 , $n = 8$) versus R6/2 NT (51.62 ± 2.99 , $n = 9$): $^{***}P < 0.0001$; Pre: R6/2 NT (51.62 ± 2.99 , $n = 9$) versus R6/2 P42T (55.68 ± 6.55 , $n = 7$): $P = 0.4591$ (ns). Post: R6/2 NT (55.41 ± 21.61 , $n = 3$) versus R6/2 P42T (39.17 ± 9.49 , $n = 3$): $P = 0.35$ (ns). The level of expression of TrkB proteins in the striatum significantly varies in the different conditions. (Kruskal-Wallis: $H = 9.665$, $^*P = 0.0465$). Using Mann-Whitney test: Wt NT (used as reference) (100.0 ± 15.19 , $n = 9$) versus R6/2 NT (33.36 ± 14.77 , $n = 3$): $^*P = 0.0182$; Pre: R6/2 NT (33.36 ± 14.77 , $n = 3$) versus R6/2 P42T (80.75 ± 13.09 , $n = 5$): $^*P = 0.0357$. Post: R6/2 NT (45.06 ± 10.27 , $n = 3$) versus R6/2 P42T (83.29 ± 21.91 , $n = 4$): $^*P = 0.0286$. (F) Representative blots for each antibody (anti-BDNF and anti-TrkB) are depicted. Levels of expressions were quantified against total proteins for each lane, using stain-free normalization. n represents the number of mice analysed. Results correspond to triplicates for mRNA and duplicates for protein levels. Bars represent mean \pm SEM. $^*P < 0.05$; $^{**}P < 0.01$; $^{***}P < 0.001$ with respect to Wt or R6/2 placebo.

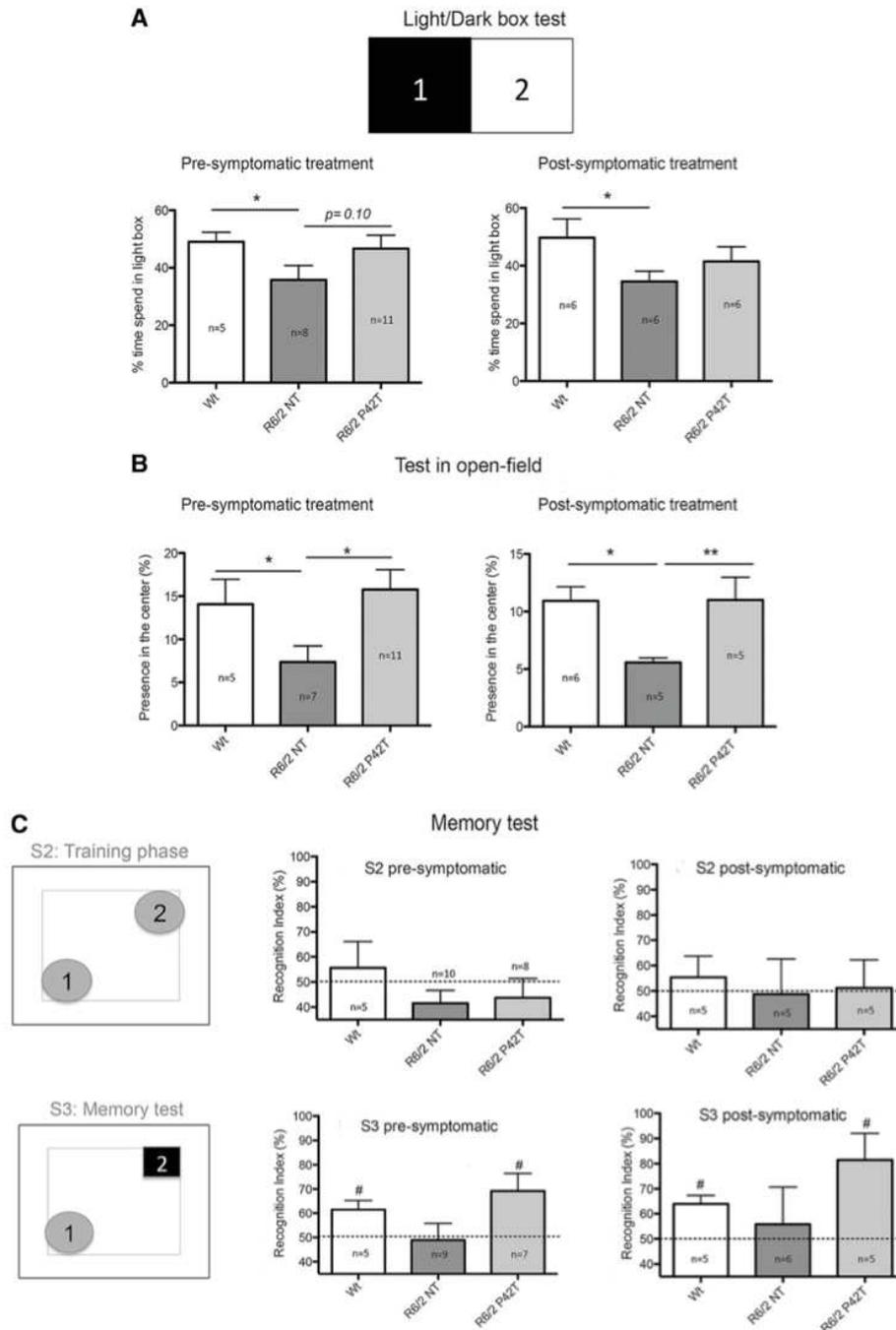


Figure 3. Effect of P42T treatment on behaviours. (A) Measure of anxiety using the light/dark exploration box: 11-week-old mice were used in light/dark box test. Index of bright-space anxiety corresponds to the % of time spent in light. Using Mann–Whitney test: Pre-symptomatic treatment: Wt ($49.0 \pm 3.4\%$, $n = 5$) versus R6/2 ($35.8 \pm 5.0\%$, $n = 8$); * $P < 0.05$. R6/2 ($35.8 \pm 5.0\%$, $n = 8$) versus R6/2 P42T ($46.7 \pm 4.7\%$, $n = 11$); $P = 0.10$. Post-symptomatic treatment: Wt ($49.7 \pm 6.5\%$, $n = 6$) versus R6/2 ($34.5 \pm 3.6\%$, $n = 6$); * $P < 0.05$. R6/2 ($34.5 \pm 3.6\%$, $n = 6$) versus R6/2 P42T ($41.5 \pm 5.1\%$, $n = 6$); $P > 0.10$ (ns). (B) Test in open-field: 11-week-old mice were freely exploring the chamber during 10 min. The % of time spent in the centre of the arena was measured. Using Mann–Whitney test: Pre-symptomatic treatment: Wt ($14.1 \pm 2.9\%$, $n = 5$) versus R6/2 ($7.4 \pm 1.9\%$, $n = 7$); * $P < 0.05$. R6/2 ($7.4 \pm 1.9\%$, $n = 7$) versus R6/2 P42T ($15.8 \pm 2.3\%$, $n = 11$); * $P < 0.05$. Post-symptomatic treatment: Wt ($10.9 \pm 1.2\%$, $n = 6$) versus R6/2 ($5.6 \pm 0.4\%$, $n = 5$); * $P < 0.05$. R6/2 ($5.6 \pm 0.4\%$, $n = 5$) versus R6/2 P42T ($11.0 \pm 2.0\%$, $n = 5$); ** $P < 0.01$. (C) Measure of recognition memory using the object recognition test: 11-week-old mice were first allowed to freely explore the arena during 10 min (Session 1), and several parameters tested, among which is time spent in the centre of the arena (see in B). During the training phase (Session 2, S2), mice explored the same object in two positions. During the memory test (Session 3, S3) mice explored one familiar and one novel object in position 2. Recognition index (%) correspond to the number of visits for object at position 2 over the total number of visits and 50% is the score for mice with no memory. S2 pre-symptomatic: Wt ($55.6 \pm 10.5\%$, $n = 5$); R6/2 ($41.5 \pm 5.2\%$, $n = 10$); R6/2 P42T ($43.7 \pm 7.7\%$, $n = 8$). All $P > 0.05$ versus 50% level. S2 post-symptomatic: Wt ($55.4 \pm 8.3\%$, $n = 5$); R6/2 ($48.8 \pm 13.8\%$, $n = 5$); R6/2 P42T ($51.2 \pm 11.1\%$, $n = 5$). All $P > 0.05$ versus 50% level. S3 pre-symptomatic: Wt ($61.5 \pm 3.8\%$, $n = 5$, * $P < 0.05$ versus 50% level); R6/2 ($48.9 \pm 6.9\%$, $n = 9$, $P > 0.05$); R6/2 P42T ($69.2 \pm 7.2\%$, $n = 7$, * $P < 0.05$ versus 50% level). S3 post-symptomatic: Wt (64.0 ± 3.4 , $n = 5$, * $P < 0.05$ versus 50% level); R6/2 ($55.8 \pm 15.0\%$, $n = 6$, $P > 0.05$); R6/2 P42T ($81.4 \pm 10.6\%$, $n = 5$, * $P < 0.05$).

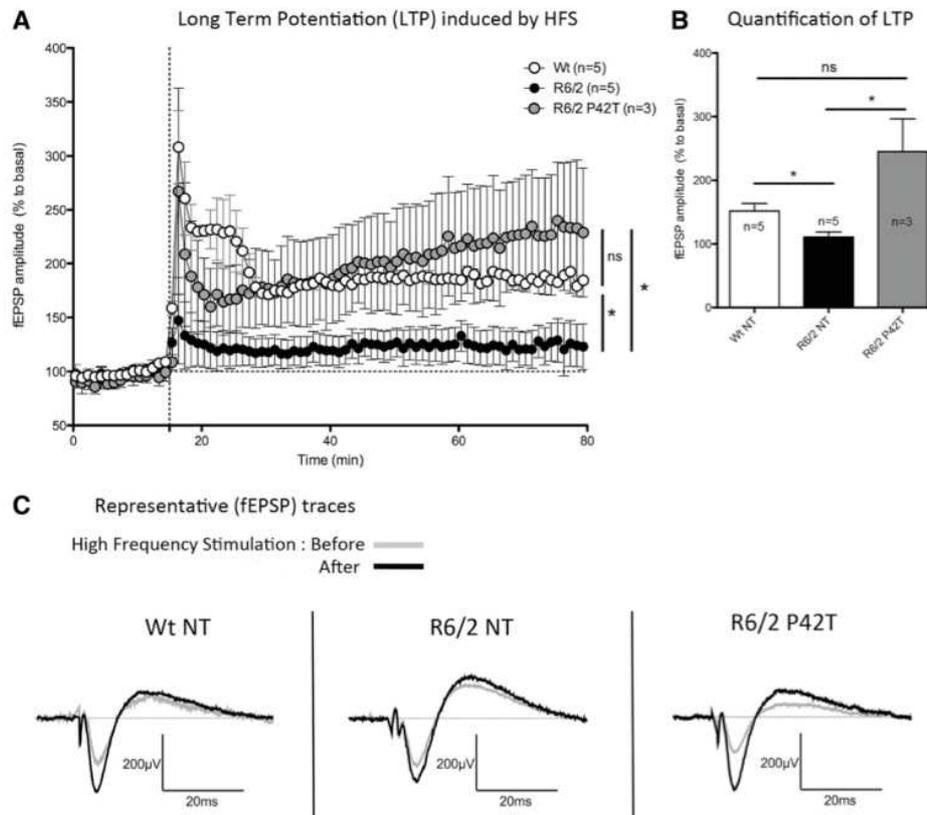


Figure 4. P42 impact on synaptic plasticity. (A) Excitatory synaptic transmission was recorded in the CA1 area of the hippocampus by stimulating the Schaffer collaterals/commissural fibers pathway. fEPSPs were evoked under basal condition by stimulating at 0.066 Hz. LTP was obtained by applying brief high-frequency stimulation (HFS: 100 Hz, 1 s). HFS triggered LTP in Wt mice (white, $n = 5$). LTP was significantly reduced in R6/2 mice (black, $n = 5$). LTP could be reinstated in R6/2 mice after treatment with P42T (grey, $n = 3$). Data correspond to averaged fEPSP amplitudes normalized to basal transmission. (B) Graph shows group mean values for potentiation in slices from WT and R6/2 mice treated or not with P42, as indicated. Statistical analysis was performed 60 min after HFS delivery. Using Mann-Whitney test: Wt NT ($151.6 \pm 11.87\%$, $n = 5$) versus R6/2 NT ($110.9 \pm 8.019\%$, $n = 5$); $*P < 0.05$, Wt NT ($151.6 \pm 11.87\%$, $n = 5$) versus R6/2 P42T ($245.1 \pm 51.42\%$, $n = 3$); $P > 0.1$ (ns), R6/2 P42T ($245.1 \pm 51.42\%$, $n = 3$) versus R6/2 NT ($110.9 \pm 8.019\%$, $n = 5$); $*P < 0.05$. (C) Representative (fEPSP) traces recorded during baseline (in grey) and 60 min after HFS (in black) in different genetic backgrounds as indicated.

ratio S2/S1 remain unchanged, indicating that P42TAT is not acting at the presynaptic side of the terminal, but rather at the postsynapse.

Effect of P42TAT on intracellular Ca^{2+} concentration

BDNF was found to enhance calcium activity in developing hippocampal neurons, therefore influencing synapse formation and neuronal activity (38). We wanted to test whether P42TAT may also have such an impact on synaptic connectivity and neuronal activity. To this end, we tested the effect of addition of P42TAT peptide on intracellular Ca^{2+} concentration ($[Ca^{2+}]_i$) of cultured rat hippocampal neurons at 15DIV (Fig. 7). The responsiveness of the neurons to glutamate was first tested by applying di-hydroxy-phenyl-glycine (DHPG), a potent agonist of group I metabotropic glutamate receptor, before and after the addition of the peptide. The effects of P42TAT or TAT peptides were analysed on these neurons under static conditions. $[Ca^{2+}]_i$ changes were measured by monitoring fura-2 fluorescence. Profiles of individual cells were analysed and characteristic profiles are provided on Figure 7A. In order to better quantify the effects of these peptides on $[Ca^{2+}]_i$, we defined arbitrarily a threshold of F340/F380 fluorescence ratio. Indeed, in the

presence of P42TAT, reversible changes in F340/F380 occurred either as monotonous increases or spikes (Fig. 7A). Whereas neurons incubated with TAT alone do not exceed the threshold, as KREBS, we identified that in the presence of P42TAT, spikes appear above the threshold. Data accumulated on several cells (around 20) provided a clear picture of this enhancement of F340/F380 fluorescence ratio over basal threshold with P42TAT, but not TAT (Fig. 7B). A quantification of the time spent by the F340/F380 fluorescence ratio above the basal threshold confirmed that P42 could increase $[Ca^{2+}]_i$ in cultured hippocampal neurons (Fig. 7C).

These data highlight an effect of P42 peptide on neuronal activity.

Discussion

P42 peptide is a domain of the HTT protein and was shown to be protective of phenotypes induced in a context of HD (25,26). Some of the protective properties of P42T treatment were previously identified in R6/2 mouse model of HD when providing the peptide in a pre-symptomatic phase of the disease (26).

In this report we also tested the effect of P42T treatment in the post-symptomatic phase of R6/2 mice, starting at week 7.

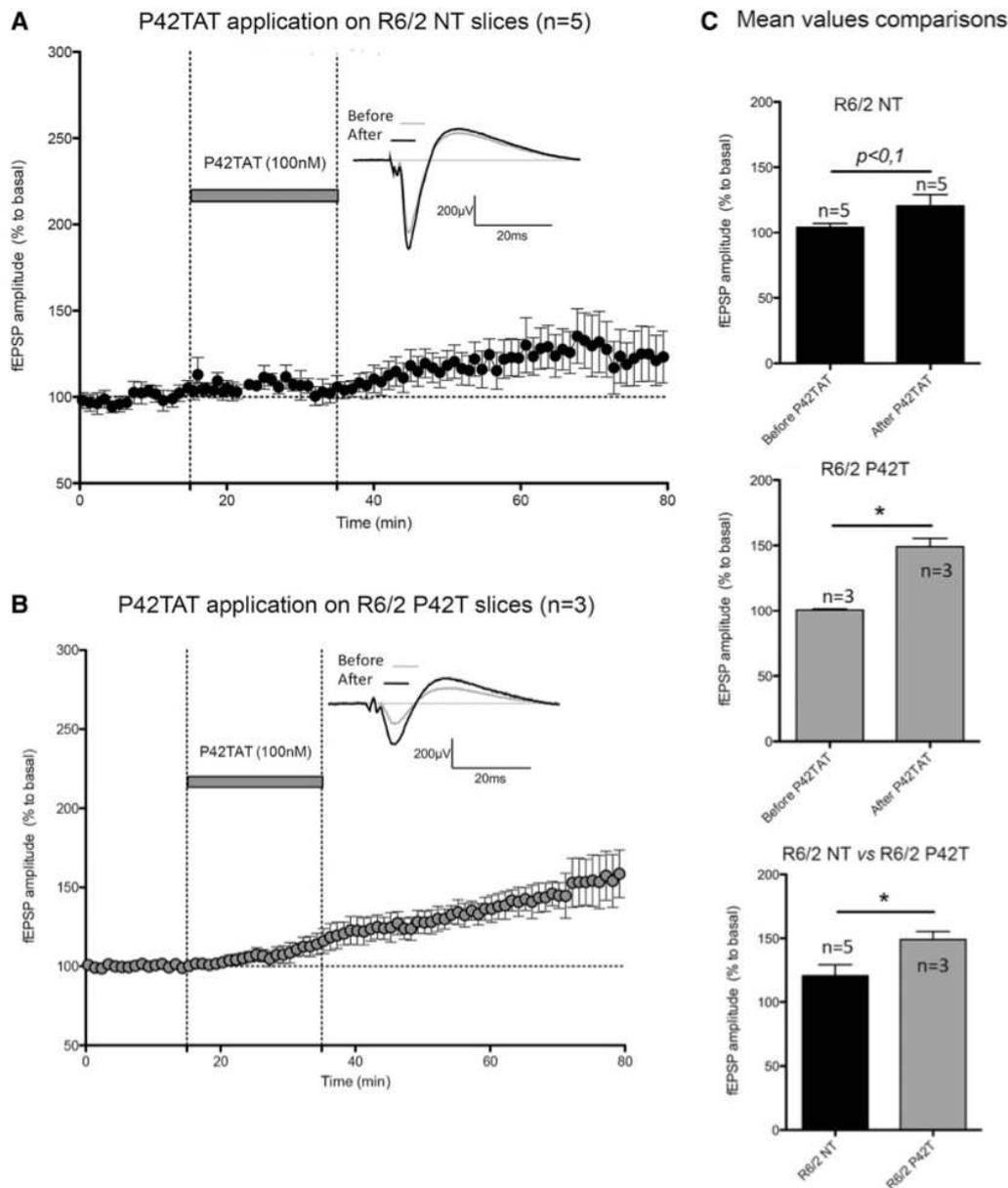


Figure 5. P42 action on synaptic transmission in the hippocampus of R6/2 mice. Excitatory synaptic transmission was recorded in the CA1 area of R6/2 and R6/2 P42T hippocampus by stimulating the Schaffer collaterals/commissural fibers pathway. IEPSPs were evoked under basal condition by stimulating at 0.066 Hz. P42TAT (100 nM) was applied for 20 min directly in the medium superfusing hippocampal slices. (A) P42TAT was applied on R6/2 NT mice ($n = 5$). (B) P42TAT was applied on R6/2 P42T mice ($n = 3$). (C) Graphs show group mean values for potentiation in slices from R6/2 mice. Statistical analysis was performed 60 min after P42TAT stimulation. For R6/2 NT brain slices, using Mann-Whitney test: before ($104.2 \pm 3.09\%$, $n = 5$) versus after ($120.5 \pm 8.65\%$, $n = 5$); $P < 0.1$. For R6/2 P42T brain slices, using Mann-Whitney test: before ($100.8 \pm 1.35\%$, $n = 3$) versus after ($149.1 \pm 10.97\%$, $n = 3$); $*P < 0.05$. P42TAT peptide application applied to R6/2 P42T or R6/2 NT mice. Using Mann-Whitney test: R6/2 NT ($120.5 \pm 8.65\%$, $n = 5$) versus R6/2 P42T ($149.1 \pm 10.97\%$, $n = 3$); $*P < 0.05$.

As suspected, we confirmed that the effect of P42T on aggregates is an early event, preventing their *de novo* formation (2,26). Therefore an important issue was to identify how P42T was able to perform late effects, even though the aggregates are already formed and persistent.

We found that even when provided at later stages, P42T prevents brain atrophy and significantly improves the motor performances of R6/2 mice over time.

Because P42 peptide belongs to the HTT protein, it might play important roles in different processes where the HTT

protein is involved. HTT was for instance shown to interfere on BDNF pathway, a key contributor in HD (16,39,40). It has been indeed reported that changes in endogenous BDNF levels contribute to striatal atrophy and to the severity of cognitive and motor symptoms in HD mice (11,41).

Hence we asked whether P42T could act on BDNF signalling pathway. Most of the BDNF protein found in the striatum is produced and transported from the cerebral cortex (42,43). The survival and the activity of the neurons of the striatum also depend on this BDNF source from the cortex (14,39). Thus, it has

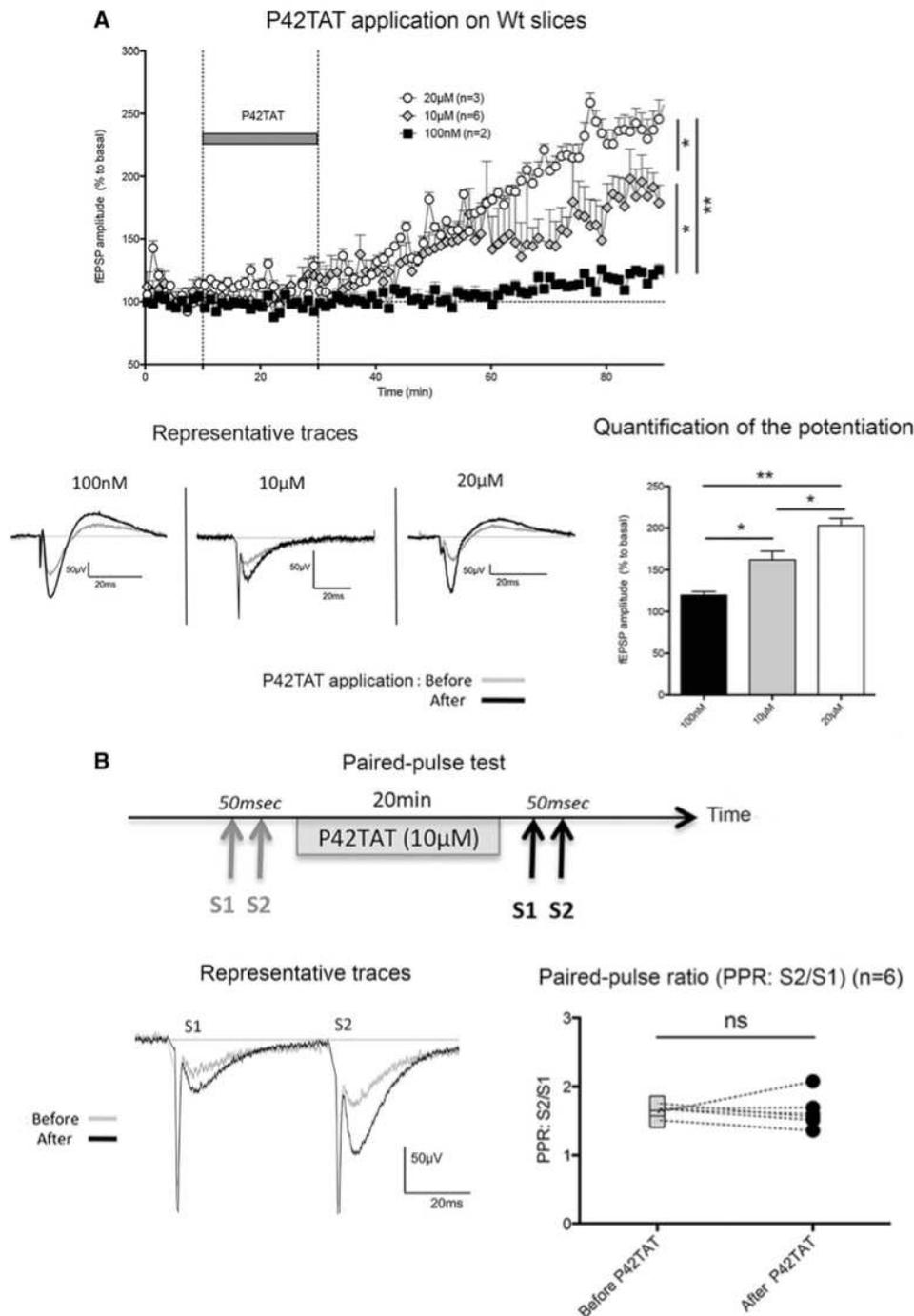


Figure 6. Dose–response effect of P42TAT peptide on synaptic transmission in the hippocampus of Wt mice. (A) Excitatory synaptic transmission was recorded in the CA1 area of Wt mice hippocampus by stimulating the Schaffer collaterals/commissural fibers pathway. fEPSPs were evoked under basal condition by stimulating at 0.066 Hz. P42TAT was applied at different concentrations: 100 nM in black ($n = 2$), 10 μM in grey ($n = 6$), 20 μM in white ($n = 3$) for 20 min directly in the medium superfusing hippocampal slices. Representative (fEPSP) traces recorded during baseline (grey) and 60 min after P42TAT application (black) with different concentration as indicated. Quantification of the potentiation according to P42TAT peptidic concentration. P42TAT was tested at 100 nM ($n = 3$), 10 μM ($n = 6$) and 20 μM ($n = 3$) on hippocampal slices from Wt mice. Graph corresponds to averaged fEPSP amplitudes normalized to basal transmission. Excitatory synaptic transmission in Wt mice was analysed 60 min after P42TAT stimulation at different concentrations. Using Mann–Whitney test: 100 nM ($120.8 \pm 4.487\%$, $n = 3$) versus 10 μM ($163.9 \pm 12.7\%$, $n = 6$); * $P < 0.05$, 100 nM ($120.8 \pm 4.487\%$, $n = 3$) versus 20 μM (229.0 ± 13.70 , $n = 3$); ** $P < 0.01$, 10 μM ($163.9 \pm 12.7\%$, $n = 6$) versus 20 μM (229.0 ± 13.70 , $n = 3$); * $P < 0.05$. These data show a concentration-dependent effect of P42TAT peptide on excitatory synaptic transmission in Wt mice when acutely applied. (B) Paired-pulse facilitation analysis in the presence of P42TAT: paired pulses composed of two identical stimulations (S1: first stimulation S2: second stimulation, separated by a 50 ms interval) have been performed on hippocampal slices of six mice. The stimulations are provided either before or after P42TAT incubation (10 μM). Representative traces of the mean for the paired-pulse series are shown before application of P42TAT (in grey) and after application of P42TAT (in black). PPR (S2/S1) before (in grey) or after P42TAT application (in black). This graph shows that the facilitation induced by paired pulse is similar before and after the application of P42TAT. Using Wilcoxon matched pairs test: before P42TAT (1.652 ± 0.03 , $n = 6$) versus after P42TAT (1.63 ± 0.01 , $n = 6$); $P > 0.1$ (ns).

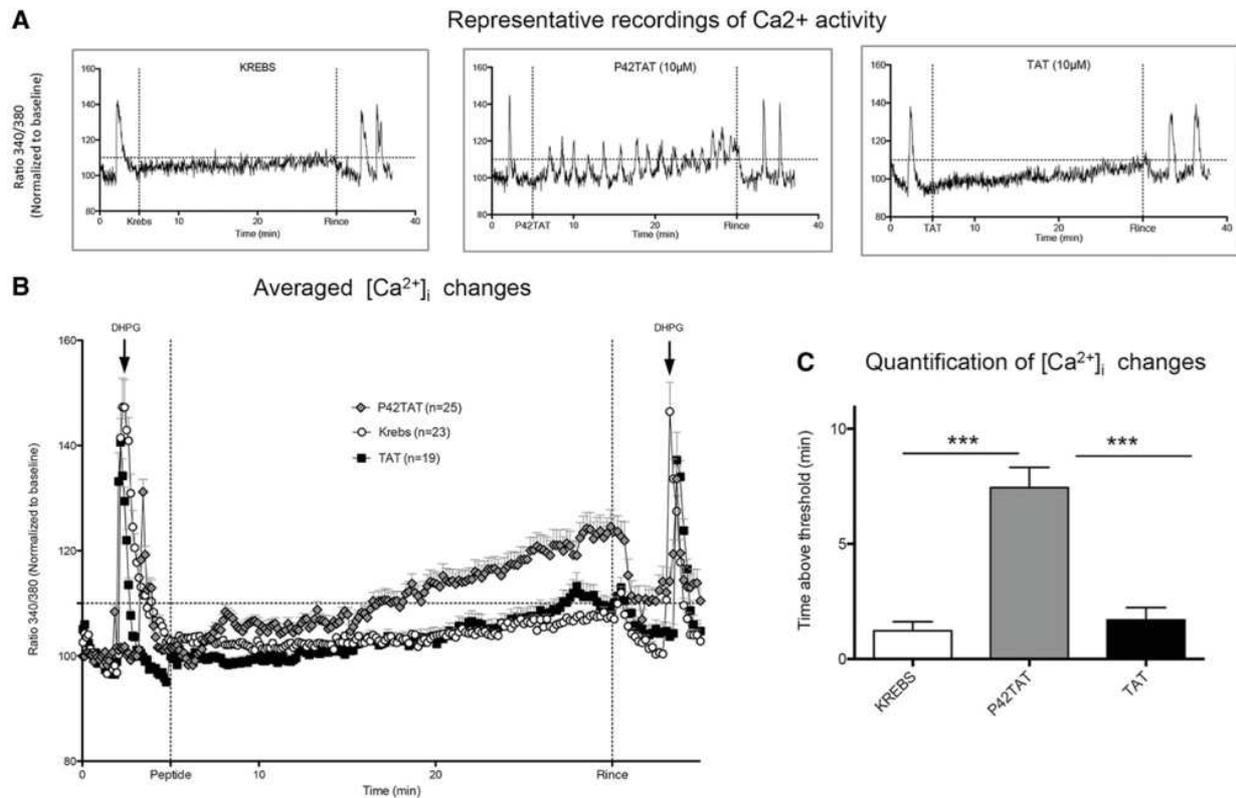


Figure 7. P42 action on Ca²⁺ activity. Tests are performed on 15 days rat hippocampal neuronal cells in culture. Intracellular calcium concentration ([Ca²⁺]_i) changes were measured in fura-2-loaded neurons. Fura-2 fluorescence ratio of emissions after excitation at 340 or 380 nm (F340/F380) was monitored. Ratio was normalized to baseline (first 2 min). DHPG (50 µM) was applied at 2.5 min as indicated (arrow). At 5 min, perfusion flow was stopped and 1 ml of extracellular medium containing or not either P42TAT (10 µM) or TAT (10 µM) was bath applied. After 25 min, perfusion flow was restored to wash. Finally, cells were challenged again with DHPG (50 µM) (arrow). (A) Representative recordings of [Ca²⁺]_i obtained in one cell for each condition (control, P42TAT and TAT). We can notice that P42TAT application essentially leads to 'spiking-like' changes of [Ca²⁺]_i. (B) Averaged [Ca²⁺]_i changes in cells for each condition, i.e. control (n = 23), P42TAT (n = 25) and TAT (n = 19). (C) Recapitulative graph depicting P42TAT excitatory effect on [Ca²⁺]_i. Time spent by F340/F380 above the threshold (brought to 110% of basal F340/F380) was counted for each cell and averaged for each condition. P42TAT increased significantly the time spent above the threshold (7.44 ± 0.88) when compared with control (1.22 ± 0.40) and TAT (1.70 ± 0.55) ***P < 0.0001. No significant difference was measured when comparing [Ca²⁺]_i changes observed under control ('Krebs') or in the presence of TAT (P = 0.315).

been proposed that reduction in BDNF level in the cerebral cortex or in its delivery may contribute to striatal vulnerability in HD (15,29). A reduction of *bdnf* level of expression in the brain has been observed in transgenic mice and patients with HD, and Wt HTT stimulates *bdnf* gene transcription and protein production (29). Actually the striatal vulnerability in HD also results from a deficit in *trkB* mRNA levels in both the cortex and the striatum (16).

We verified that the levels of *bdnf* and *trkB* mRNA expressions are indeed affected in both the cortex and the striatum of R6/2 mice. We also observed a dynamic distribution of BDNF and TrkB after P42T stimulation.

Our data suggest that the primary effect of P42T (following a short-term post-symptomatic treatment) may occur on the level of expression of *trkB* mRNA in the cortex and of TrkB protein in the striatum, which might optimize the BDNF signal in the striatum. A long-term pre-symptomatic treatment is additionally enhancing the *bdnf* mRNA level in the cortex and the striatum, probably as a consequence of the TrkB enhancements. This shows that P42T seems to control the balance between *bdnf* and *trkB* cortico-striatal expressions, therefore modulating its action on neuronal activity in the striatum.

We further tested whether P42T is able to interfere with phenotypes associated to BDNF signalling defects. As previously

mentioned, there is a clear link between BDNF defects and brain atrophy or motor dysfunctions in HD (11,41), defects that are clearly improved by P42T, with both pre- (26), and post-symptomatic treatments, as shown in this report. BDNF signalling also plays a crucial role for psychiatric and cognitive deficits of HD (32). We therefore studied the putative role of P42T on anxiety and learning and memory impairments seen in HD. P42T treatment presents no effect on Wt mice (Supplementary Material, Fig. S4), but is acting on R6/2 mouse model of HD. Both pre-symptomatic and post-symptomatic treatments of R6/2 mice with P42T reduced the anxiety observed in R6/2 mice. Moreover, in the recognition memory test, untreated R6/2 mice showed a clear recognition deficit in novel object recognition while R6/2 mice treated with P42T preferentially explored the novel object, whatever the treatment (pre- or post-symptomatic), as observed for Wt mice. These data showed that P42T is able to modulate anxiety level and learning impairments detected in R6/2 mice. Moreover, the peptide was effective on these phenotypes whenever started the treatment. These observations confirmed that P42T is able to act at any stage of the disease, by stimulating the BDNF-TrkB signalling pathway.

Pathological changes induced in HD are often accompanied with reduced plasticity of the synapses, measured by LTP deficit

observed in hippocampal slices of HD mice (33,35), as confirmed here. BDNF is an important modulator of LTP (44), and is required for LTP in the striatum (45). In HD, LTP is impaired at cortico-striatal synapses (43), but is rescued by BDNF (33), therefore delaying neuronal dysfunction and improving pathology. We identified that, as for BDNF, P42T is able to increase LTP in the CA1 hippocampal neurons, which can be correlated to an activation of the BDNF signalling. P42T is also activating $[Ca^{2+}]_i$ changes mediated in cultured hippocampal neurons, highlighting a role of P42T in synaptic plasticity and neuronal activity, also in Wt cells.

Globally, we found that P42T first targets the TrkB levels of expression both in Wt (Supplementary Material, Fig. S3), and R6/2 mice (Fig. 2). Local and specific regulation of TrkB was proposed to serve as a 'coincidence detector' for spatio-temporal control of BDNF signal (17,46). We show in this report that P42T modulates this coincidence detection insured by BDNF/TrkB balance, which plays important role in cortico-striatal projections for neuronal plasticity and activity, as well as learning and memory procedure.

One still opened question is how P42T is able to trigger the activation of TrkB in the striatum. Cortical neurons were shown to play a critical role in the progression of the disease. In particular cortical defects induce changes in postsynaptic trafficking and signalling of TrkB vesicular dynamics in the striatum (47). Neuronal activity is related to *trkB* transcription, transport and translation (17). P42T is potentially acting upstream by enhancing neuronal activity (Fig. 7), and activating *trkB* mRNA in the cortex (Fig. 2B). P42 peptide was also shown to rescue the vesicular transport defects in HD models (25) and, is enhancing TrkB protein in the striatum, as shown here. Hence P42 could potentially enhance *trkB* mRNA vesicular trafficking along the axons and to the dendrites for a local translation in the striatum. Further studies will be required to identify the exact mechanisms involved regarding the action of P42 on BDNF-TrkB signalling.

As previously shown, we confirmed that the pro-BDNF protein form was detectable in the cortex, whereas mature BDNF was the main represented form in the striatum. Only this mature forms bind to TrkB receptor (48). Most findings point to a postsynaptic action of BDNF through local activation of TrkB. Our observations support that P42T locally enhances TrkB in the striatum, and induces a postsynaptic response. Indeed even if not conclusive, the unchanged PPR that we observe after acute infusion with P42TAT peptide indicates that the action may rather be postsynaptic, and likely on TrkB receptor.

In HD, multiple lines of evidence suggest that restoring cortical expression, axonal transport, release of BDNF and local activation of TrkB in the striatum promotes neuronal survival and improves behavioural phenotypes in HD animal models (49). The therapeutic potential of BDNF-TrkB signalling activation in the striatum has been indeed already described (50–52). P42T impacts the levels of expression of both *bdnf* and its receptor *trkB*, but also ameliorates motor and cognitive functional impairments detected in HD. Direct treatments with BDNF have not been possible, in part because BDNF was unable to directly cross the blood–brain barrier (53), and also because other factors may be crucial, such as the spatio-temporal balance in the level of expression of BDNF and its receptor TrkB (16,47). As shown in this report, the use of P42T may overcome this problem.

Our results show that in addition to the action of P42 peptide on the aggregation process at the early stages of the disease (25,26), P42T is also acting on BDNF-TrkB signalling, which improves plasticity and activity of the neurons at the different

steps of the disease, during the pre- and the post-symptomatic phases.

Our data show that P42T might ameliorate R6/2 behaviours through BDNF signalling in pre- and post-symptomatic phases of the disease. Therefore, P42T might help not only to prevent but also to treat HD, by acting at different levels of the disease. Also P42 peptide received an orphan drug designation (EMA/COMP/275974/2015), making P42 peptide a particularly valuable compound to be further examined for its application in HD.

Materials and Methods

Peptide synthesis and formulation

To ensure P42 diffusion, we designed a fusion peptide where P42 (a 23aa peptide) was conjugated to the 11aa TAT Cell Penetrating Peptide (CPP = YGRKKRRQRRR). The peptide P42TAT (AASSGVSTPGSAGHDIITEQPRS-GG-YGRKKRRQRRR) was synthesized and purified by GenScript company. The fusion peptide P42TAT (GenScript, purity >95%) was then diluted in water and this solution was mixed with a lipid mixture (Aonys[®] technology, Medesis Pharma, Baillargues) composed of self-assembled specific polar lipids, surfactant and co-surfactants lecithin and ethanol (final water content 12%). After a few seconds of vortexing a (reverse) water-in-oil microemulsion was formed. These microemulsions meet the criteria of a Newtonian fluid (limpid and isotropic liquid) (54–56). Aonys[®] microemulsions are designed for administration of active pharmaceutical ingredients, referred here as P42T treatment, via application to the buccal and rectal mucosa.

R6/2 transgenic mice and P42T treatment

Procedures for the care and treatment of animals were carried out in Cecema University animal care, in accordance with directives of the French Ministry of Agriculture (agreement number: D34-172-13).

R6/2 mouse model, based on the expression of the polyQ expanded human exon1 is a well-characterized model showing early and strong symptoms and leading to a premature death at 3 months of age. Initially, heterozygous R6/2 males were obtained from Jackson Laboratory (stock 006494), and crossed with C57BL/6-CBA females. Mice were genotyped by PCR using tail-tip DNA (Supplementary Material, Fig. S1), with the following primers: forward—5'-CGGCTGAGGACAGCGGCTGT-3'; reverse—5'-GCAGCAGCAGCAGCAACAGCCGCCACCGCC-3'.

Females issued from crossings were treated from week 2 to week 12 (for pre-symptomatic treatment), whereas males issued from crossings were treated from week 7 (for post-symptomatic treatment) to week 12. At week 13, mice were sacrificed and brain structures dissected and frozen. The cohorts were divided into several groups comprising Wt and R6/2 mice, treated with empty Aonys[®] microemulsion (NT) or with P42TAT-Aonys[®] microemulsions, as indicated. Administrations were performed 5 days a week, at the same time of the day. Treatments, either with empty or P42TAT-containing microemulsions (P42T treatment) (1 ml/kg, and peptide dosing 1200 µg/kg) were administrated via 2 injections through buccal and rectal mucosa deposits.

RT-qPCR

Mice dissected brain areas were frozen and homogenized in Trizol REAGENT (Ambion), followed by RNA extraction as

indicated by the manufacturer. After centrifugation, chloroform treatment and precipitation, the pellet was resuspended and samples treated by DNase 1. Equal amounts of RNA samples (1 µg) were reverse transcribed and cDNA was mixed with LightCycler 480 SYBRGreen and amplification performed in a LightCycler Real-Time PCR system, with the following primers for: BDNF: forward—5'-CAGAGCAGCTGCCTTGATGTT-3'; reverse—5'-GCCTTGTCCTGGACGTTTA-3'; TrkB: forward—5'-GTTGGCGAGACATTCCAAG-3'; reverse—5'-GGGGGTTTTCAATGACAGG-3'; actin: forward—5'-GCCAGAGCAGTAATCTCCTTCT-3'; reverse—5'-AGTGTGACGTTGACATCCGTA-3'. Each sample was run in triplicate and relative quantification was normalized to β -actin as reference gene. Data were expressed as fold change versus Wt mice (100%).

Western blots

Different areas of mouse brains were dissected and frozen. Samples were homogenized on ice in lysis buffer (100 mM Tris-HCl pH 7.2), 400 mM NaCl, 4 mM EDTA, 0.2% Triton, 0.05% NaN₃, 0.5% gelatine, 1 mM PMSF, Anti-Protease 1× (completeTM, Mini, EDTA-free, Sigma-Aldrich). After a 10 min centrifugation at 15,000g at 4°C, supernatants were collected and protein concentrations assessed. Protein contents were quantified with BCA Protein Assay Kit (Pierce). A total of 50 µg of total proteins were denatured 5 min at 95°C in SDS loading buffer. Samples were loaded in 4–15% polyacrylamide resolving gel (Mini-PROTEAN[®] TGX Stain-FreeTM Precast Gels, Bio-Rad). Stain-FreeTM system is using 2,2,2-trichloroethanol Acrylamide gels in order to quantify total protein levels loaded for each lane. After migration, gels were activated by UV exposition (45 s) and pictured with Chemidoc system (Bio-Rad). Gels were then electro-blotted onto 20 µm nitrocellulose membrane (AmershamTM ProtranTM 0.2 NC-supported western blotting membranes, GE Healthcare). Blots were blocked in PBST (1× PBS, 0.1% Tween 20) containing 5% non-fat dry milk for 30 min and incubated with primary antibodies overnight at 4°C. BDNF was detected by using AB1534 antibody (1: 500; Merck) diluted in PBST-milk 5%. TrkB protein was detected using sc-12 antibody (1: 300; Santa Cruz) diluted in PBST-milk 5%. After three washes of 5 min with PBST, membranes were incubated 1 h with HRP-conjugated anti-rabbit antibody 111-035-144 (1: 5000; Jackson ImmunoResearch) to visualize BDNF or TrkB antibodies, then washed three times 5 min. To visualize the signal, blots were incubated in ClarityTM Western ECL substrate (Bio-Rad) during 5 min, and pictured with Chemidoc System (Bio-Rad). To quantify, the biorad software calculates the normalization factor for each lane compared with the reference (the Wt NT lane), defining a normalization factor. Then the software quantifies the intensity for each band in the different lanes, and the normalized value evaluated for each lane (Supplementary Material, Fig. S2).

Analysis of brain sections

Coronal brain sections of 50 µm thickness were cut with an electronic microtome (Microm HM 650 V). The slides from -0.60 to -0.80 mm bregma were used for immunostainings with monoclonal antibody anti-HTT (MAB5374, 1: 1000; Millipore), and DAPI.

For each animal, systematic pictures were taken with the slide scanner Hamamatsu nanozoomer. The areas of lateral ventricles were measured with NDP software (Nanozoomer Digital Pathology Virtual SlideViewer).

Quantifications of aggregates number and size were scored with ImageJ software from 256 µm × 256 µm images. Representative pictures for these immunostainings obtained with the confocal Microscope (Leica SPE) are shown.

Behavioural tests of mice

Motor performance was assessed using an accelerating rotarod (Stoelting, Ugo Basile, Biological Research apparatus, Varese, Italy), every week, starting at week 4. On the first day, the mice were trained with a trial at an accelerating velocity from 4.5 to 40 rpm. Subsequently, two trials were performed during two consecutive days. In each trial, mice were placed onto the rotarod at a constant speed of 4.5 rpm for 5 s, which then accelerated at a constant rate up until 40 rpm, for a maximum of 5 min. The daily trial was composed of two sessions of 5 min separated by 5–20 min. The latency to fall from the rotarod was recorded every day for each mouse, and the average of the two last trials was used for statistical analysis.

Light-dark exploration box test

Anxiety was assessed in a light/dark exploration box. The apparatus consisted of two PVC compartments, one with white floor and walls (30 cm × 25 cm × 25 cm high), the second one with black walls and roof. A guillotine door separated the two compartments. The clear compartment was brightly illuminated. Each mouse (11 weeks old) was placed in the clear compartment and exploratory activity was videotaped for 10 min. The total time spent and the number of entries into the dark compartment were recorded and analysed using the Videotrack[®] software (Viewpoint, Lissieu, France) (57).

Novel object recognition test

Mice at 9 and 11 weeks of age were used for the novel object recognition test. The testing apparatus is an open field (50 cm × 50 cm × 50 cm high). The test consists of three sessions. Session 1 (habituation): mice were allowed to freely explore the open-field during 10 min. Session 2 (training): two identical objects were placed in the open-field and mice were allowed to explore them for 10 min. Session 3 (test): 1 h after training, one of the objects was substituted for a novel one (new) while the other remained unchanged (familiar), and mice explored the objects for 10 min. During each session, animal's movements were recorded using the Videotrack[®] and Nosetrack[®] softwares (Viewpoint). During sessions 2 and 3 the number of nose contacts with the objects were measured and results were expressed as distance travelled (in cm), % of time spent in areas, and preferential recognition index, calculated as the ratio of number of contacts with the object in position 2 over the total number of contacts with the two objects, expressed as percentage (58). Note that R6/2 mice present memory deficits only at week 11.

Hippocampal neuron-enriched cultures

Primary neuronal cultures were established from 18-day-old embryonic rat hippocampi, as described previously (59,60) with minor modifications. Sprague-Dawley rats were from Janvier (France). After pre-incubation with VerseneTM, hippocampal cells were mechanically dissociated and plated at a density of $2 \cdot 10^6$ cells/dish in eight-well dishes containing glass coverslips. Culture dishes and coverslips had been previously coated with

poly-L-lysine (15 µg/ml) and then with DMEM/HAM F12 containing 10% foetal calf serum. Cells were grown in a defined medium containing DMEM/HAM F12, supplemented with glucose, 33 mM; glutamine, 2 mM; penicillin, 100 U/ml; streptomycin, 100 µg/ml; sodium bicarbonate, 13 mM; transferrin, 50 µg/ml; insulin, 0.5 µg/ml; b-estradiol, 1 pM; triiodothyronine, 3 nM; progesterone, 20 nM; sodium selenite, 46 nM; and putrescine, 100 µM. All experiments were performed on cell cultures grown for at least 10 days *in vitro* (DIV).

Electrophysiology

Experiments were carried out on brain slices (300 µm thickness) obtained from 8- to 16-week-old R6/2 and age-matched Wt mice. After decapitation, brains were quickly dissected and placed in ice-cold 'Krebs' medium (124 mM NaCl, 3.5 mM KCl, 25 mM NaHCO₃, 1.25 mM NaH₂PO₄, 1 mM CaCl₂, 2 mM MgSO₄, 10 mM D-glucose), and 10 mM HEPES (bubbled with O₂/CO₂, 95/5) pH 7.4. Slices were then cut with a Vibratome (VT1000S; Leica, France) and maintained at RT for at least 1 h in the same buffer supplemented with 1 mM CaCl₂. This supplemented buffer—also named extracellular medium—was used for further recordings.

Electrophysiological recordings of synaptic transmission were performed on the CA1 area of hippocampal region with either multi-electrode arrays (MEAs) (61) or conventional glass electrode recordings (62). For MEA recordings, slices were transferred to a MEA (MEA60; Multi Channel Systems, Reutlingen, Germany) continually superfused with the extracellular medium described above (flow rate 2 ml/min). When required, drugs were directly applied in this superfusion. MEAs comprised 60 extracellular electrodes. The inter-electrode distance was 200 µm. Each individual electrode from the array could be used either as a recording or as a stimulatory electrode. A nylon mesh was positioned above the slice to obtain a satisfactory electrical contact between the surface of the slice and the electrode array. Afferent stimulation was achieved with an external stimulator (STG-1004; Multi Channel Systems) by applying biphasic current pulses to one electrode of the array located in the Schaffer Collateral pathway of the hippocampus. Stimulation intensity (60–300 µA) and duration (70–200 µs) were adapted to avoid multiphasic responses due to an excessive stimulation. Field excitatory postsynaptic potentials (fEPSPs) could then be recorded in the CA1 area by electrodes of the array at the same time. Signals were further recorded and analysed (MC Rack; Multi Channel Systems). For glass electrode-based recordings, hippocampal slices were transferred to a submerged-style recording chamber positioned under an upright microscope (DMF, Leica) and superfused with the extracellular medium (flow rate, 2 ml/min). Field EPSPs were recorded in the dendritic field of CA1 hippocampal neurons with glass microelectrodes (4–5 MΩ resistance) filled with extracellular medium as described above. Field EPSPs were evoked by stimulating the Schaffer collateral-commissural pathway using a bipolar electrode with currents pulses (intensity: 200 µA; duration: 200 µs). Electrophysiological signals were amplified (Axopatch 200B, Axon Instruments) and digitized (Digidata 1200A, Axon Instruments). Field EPSPs were further recorded and analysed with Dr John Dempster's software WinWCP (University of Strathclyde). For recording methods, baseline synaptic signals were evoked using a 0.066 Hz frequency. The stimulus intensity for baseline response was adapted to give around 50% of the maximal response. Slices displaying epileptic-like activity were discarded. Paired-pulse facilitation was measured after applying consecutive pulses with 50 ms intervals (63). LTP was induced applying a single train of

stimuli at 100 Hz for 1 s. The magnitude of the effects on synaptic transmission was determined by measuring fEPSP amplitudes. Data are presented as means ± S.E.M. on graphs plotting pooled data. Each individual (*n*) corresponds to an experiment performed on a slice from an individual animal. Experiments were carried out at room temperature.

Measurements of cytosolic-free Ca²⁺ concentration

Intracellular calcium concentration ([Ca²⁺]_i) was measured with the fluorescent indicator fura-2 (64). For this purpose, hippocampal cells grown on square (10 × 10 mm) glass coverslips were loaded with fura-2 by a 30 min incubation at 37°C with 2 µM fura-2-AM and 0.02% Pluronic in 'Krebs' extracellular solution (defined above). [Ca²⁺]_i was monitored by videomicroscopy. After rinsing, the glass coverslip was transferred to the recording chamber mounted on an inverted microscope (Leica, DMIRB). Fura-2 emission was obtained by exciting alternatively at 340 and 380 nm with a rotating filter wheel (Sutter Instruments) and by monitoring fluorescent emissions (F340 and F380) at 510 nm. The ratio of emissions at 510 nm (F340/F380) was recorded every 2 s. Fluorescent signals were collected with a CCD camera (Hamamatsu Photonics), digitalized, and analysed with image analysis software (Acquacosmos; Hamamatsu). Throughout recordings, coverslips were continually superfused (flow rate: 1 ml/min) with the extracellular solution, except when peptides, including P42TAT, were tested. For this, flow was stopped and peptides or vehicle solutions directly added to the recording bath for 25 min. This paradigm was used because of the low amount of peptide available. When required, drugs were applied with a gravity-fed system. On the graphs, data are presented as fura-2 fluorescence ratios F340/F380 obtained in individual cells. Ratios have been normalized to their respective baseline value measured prior to any treatment. Data are expressed as normalized ratio of emissions or F340/F380. The *n* values represent the entire population of cells recorded from at least three different cultures.

Statistics

Data are presented as mean ± S.E.M. Statistical analyses were performed using t-test or nonparametric Mann-Whitney test, when two conditions were compared, and with Wilcoxon matched pairs test when required. One-way or two-way ANOVA (as indicated) or non-parametric Kruskal-Wallis ANOVA were also used when more than two conditions were compared (*H* value). A *P*-value of less than 0.05 was considered statistically significant, but *P* < 0.10, was noted as suggestive of notable trend. Statistical levels were indicated in the text and figures as: **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001. All statistical calculations were performed using the Prism software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

Supplementary Material

Supplementary Material is available at HMG online.

Acknowledgements

We thank Jean-Charles Liévens, Patrick Maurel and Elsa Compte for their helpful comments on the manuscript, and Janique Guiramand for discussions. We also thank the Genomix qPHD platform, the Cecema animal care at the Montpellier University, and the imaging facility MRI.

Conflict of Interest statement. Medesis Pharma claims intellectual property regarding Aonys[®] technology of microemulsions used in this work. The other authors declare no competing interest.

Funding

This work has been supported by Agence Nationale de la Recherche (ANR-12-EMMA-0013; ANR-14-CE13-0035).

References

- Evans, S.J., Douglas, I., Rawlins, M.D., Wexler, N.S., Tabrizi, S.J. and Smeeth, L. (2013) Prevalence of adult Huntington's disease in the UK based on diagnoses recorded in general practice records. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, **84**, 1156–1160.
- Marelli, C. and Maschat, F. (2016) The P42 peptide and peptide-based therapies for Huntington's disease. *Orphanet. J. Rare Dis.*, **11**, 24.
- Rawlins, M.D., Wexler, N.S., Wexler, A.R., Tabrizi, S.J., Douglas, I., Evans, S.J. and Smeeth, L. (2016) The prevalence of Huntington's disease. *Neuroepidemiology*, **46**, 144–153.
- Kim, Y.J., Yi, Y., Sapp, E., Wang, Y., Cuiffo, B., Kegel, K.B., Qin, Z.H., Aronin, N. and DiFiglia, M. (2001) Caspase 3-cleaved N-terminal fragments of wild-type and mutant huntingtin are present in normal and Huntington's disease brains, associate with membranes, and undergo calpain-dependent proteolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **98**, 12784–12789.
- Wellington, C.L., Ellerby, L.M., Gutekunst, C.A., Rogers, D., Warby, S., Graham, R.K., Loubser, O., van Raamsdonk, J., Singaraja, R. and Yang, Y.Z. (2002) Caspase cleavage of mutant huntingtin precedes neurodegeneration in Huntington's disease. *J. Neurosci.*, **22**, 7862–7872.
- Lunkes, A., Lindenberg, K.S., Ben-Haïem, L., Weber, C., Devys, D., Landwehrmeyer, G.B., Mandel, J.-L. and Trotter, Y. (2002) Proteases acting on mutant huntingtin generate cleaved products that differentially build up cytoplasmic and nuclear inclusions. *Mol. Cell*, **10**, 259–269.
- Sathasivam, K., Neueder, A., Gipson, T.A., Landles, C., Benjamin, A.C., Bondulich, M.K., Smith, D.L., Faull, R.L.M., Roos, R.A.C., Howland, D. et al. (2013) Aberrant splicing of HTT generates the pathogenic exon 1 protein in Huntington disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **110**, 2366–2370.
- Ratray, I., Smith, E., Gale, R., Matsumoto, K., Bates, G.P. and Modo, M. (2013) Correlations of behavioral deficits with brain pathology assessed through longitudinal MRI and histopathology in the R6/2 mouse model of HD. *PLoS One*, **8**, e60012.
- Carter, R.J., Lione, L.A., Humby, T., Mangiarini, L., Mahal, A., Bates, G.P., Dunnett, S.B. and Morton, A.J. (1999) Characterization of progressive motor deficits in mice transgenic for the human Huntington's disease mutation. *J. Neurosci.*, **19**, 3248–3257.
- Mangiarini, L., Sathasivam, K., Seller, M., Cozens, B., Harper, A., Hetherington, C., Lawton, M., Trotter, Y., Lehrach, H., Davies, S.W. et al. (1996) Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell*, **87**, 493–506.
- Samadi, P., Boutet, A., Rymar, V.V., Rawal, K., Maheux, J., Kvann, J.C., Tomaszewski, M., Beaubien, F., Cloutier, J.F., Levesque, D. et al. (2013) Relationship between BDNF expression in major striatal afferents, striatum morphology and motor behavior in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. *Genes Brain Behav.*, **12**, 108–124.
- Zuccato, C., Marullo, M., Conforti, P., MacDonald, M.E., Tartari, M. and Cattaneo, E. (2007) Systematic assessment of BDNF and its receptor levels in human cortices affected by Huntington's disease. *Brain Pathol.*, **18**, 225–238.
- Luthi-Carter, R., Hanson, S.A., Strand, A.D., Bergstrom, D.A., Chun, W., Peters, N.L., Woods, A.M., Chan, E.Y., Kooperberg, C., Krainc, D. et al. (2002) Dysregulation of gene expression in the R6/2 model of polyglutamine disease: parallel changes in muscle and brain. *Hum. Mol. Genet.*, **11**, 1911–1926.
- Zuccato, C. and Cattaneo, E. (2007) Role of brain-derived neurotrophic factor in Huntington's disease. *Progr. Neurobiol.*, **81**, 294–330.
- 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.
- Gines, S., Bosch, M., Marco, S., Gavalda, N., Diaz-Hernandez, M., Lucas, J.J., Canals, J.M. and Alberch, J. (2006) Reduced expression of the TrkB receptor in Huntington's disease mouse models and in human brain. *Eur. J. Neurosci.*, **23**, 649–658.
- Nagappan, G. and Lu, B. (2005) Activity-dependent modulation of the BDNF receptor TrkB: mechanisms and implications. *Trends Neurosci.*, **28**, 464–471.
- 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.
- Leavitt, B.R., Guttman, J.A., Hodgson, J.G., Kimel, G.H., Singaraja, R., Vogl, A.W. and Hayden, M.R. (2001) Wild-type huntingtin reduces the cellular toxicity of mutant huntingtin in vivo. *Am. J. Hum. Genet.*, **68**, 313–324.
- Squitieri, F., Gellera, C., Cannella, M., Mariotti, C., Cislighi, G., Rubinsztein, D.C., Almqvist, E.W., Turner, D., Bachoud-Levi, A.C., Simpson, S.A. et al. (2003) Homozygosity for CAG mutation in Huntington disease is associated with a more severe clinical course. *Brain*, **126**, 946–955.
- Van Raamsdonk, J.M., Pearson, J., Murphy, Z., Hayden, M.R. and Leavitt, B.R. (2006) Wild-type huntingtin ameliorates striatal neuronal atrophy but does not prevent other abnormalities in the YAC128 mouse model of Huntington disease. *BMC Neurosci.*, **7**, 80.
- Cattaneo, E., Zuccato, C. and Tartari, M. (2005) Normal huntingtin function: an alternative approach to Huntington's disease. *Nat. Rev. Neurosci.*, **6**, 919–930.
- Mugat, B., Parmentier, M.L., Bonneaud, N., Chan, H.Y. and Maschat, F. (2008) Protective role of engrailed in a Drosophila model of Huntington's disease. *Hum. Mol. Genet.*, **17**, 3601–3616.
- Zuccato, C., Valenza, M. and Cattaneo, E. (2010) Molecular mechanisms and potential therapeutic targets in Huntington's disease. *Physiol. Rev.*, **90**, 905–981.
- Arribat, Y., Bonneaud, N., Talmat-Amar, Y., Layalle, S., Parmentier, M.L. and Maschat, F. (2013) A huntingtin peptide inhibits polyQ-huntingtin associated defects. *PLoS One*, **8**, e68775.
- Arribat, Y., Talmat-Amar, Y., Paucard, A., Lesport, P., Bonneaud, N., Bauer, C., Bec, N., Parmentier, M.L., Benigno, L., Larroque, C. et al. (2014) Systemic delivery of P42 peptide: a new weapon to fight Huntington inverted question marks disease. *Acta Neuropathol. Commun.*, **2**, 86.
- Li, J.Y., Popovic, N. and Brundin, P. (2005) The use of the R6 transgenic mouse models of Huntington's disease in

- attempts to develop novel therapeutic strategies. *NeuroRx*, **2**, 447–464.
28. Liot, G., Zala, D., Pla, P., Mottet, G., Piel, M. and Saudou, F. (2013) Mutant Huntingtin alters retrograde transport of TrkB receptors in striatal dendrites. *J. Neurosci.*, **33**, 6298–6309.
 29. Zuccato, C., Ciammola, A., Rigamonti, D., Leavitt, B.R., Goffredo, D., Conti, L., MacDonald, M.E., Friedlander, R.M., Silani, V., Hayden, M.R. et al. (2001) Loss of huntingtin-mediated BDNF gene transcription in Huntington's disease. *Science*, **293**, 493–498.
 30. Besusso, D., Geibel, M., Kramer, D., Schneider, T., Pendolino, V., Picconi, B., Calabresi, P., Bannerman, D.M. and Minichiello, L. (2013) BDNF-TrkB signaling in striatopallidal neurons controls inhibition of locomotor behavior. *Nat. Commun.*, **4**, 2031.
 31. Nithianantharajah, J. and Hannan, A.J. (2013) Dysregulation of synaptic proteins, dendritic spine abnormalities and pathological plasticity of synapses as experience-dependent mediators of cognitive and psychiatric symptoms in Huntington's disease. *Neuroscience*, **251**, 66–74.
 32. Giralt, A., Rodrigo, T., Martin, E.D., Gonzalez, J.R., Mila, M., Cena, V., Dierssen, M., Canals, J.M. and Alberch, J. (2009) Brain-derived neurotrophic factor modulates the severity of cognitive alterations induced by mutant huntingtin: involvement of phospholipase C γ activity and glutamate receptor expression. *Neuroscience*, **158**, 1234–1250.
 33. Lynch, G., Kramar, E.A., Rex, C.S., Jia, Y., Chappas, D., Gall, C.M. and Simmons, D.A. (2007) Brain-derived neurotrophic factor restores synaptic plasticity in a knock-in mouse model of Huntington's disease. *J. Neurosci.*, **27**, 4424–4434.
 34. Simmons, D.A., Rex, C.S., Palmer, L., Pandeyarajan, V., Fedulov, V., Gall, C.M. and Lynch, G. (2009) Up-regulating BDNF with an ampakine rescues synaptic plasticity and memory in Huntington's disease knockin mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **106**, 4906–4911.
 35. Murphy, K.P., Carter, R.J., Lione, L.A., Mangiarini, L., Mahal, A., Bates, G.P., Dunnett, S.B. and Morton, A.J. (2000) Abnormal synaptic plasticity and impaired spatial cognition in mice transgenic for exon 1 of the human Huntington's disease mutation. *J. Neurosci.*, **20**, 5115–5123.
 36. Cavalier, M., Ben Sedrine, A., Thevenet, L., Crouzin, N., Guiramand, J., de Jesus Ferreira, M.C., Cohen-Solal, C., Barbanel, G., and Vignes, M. (2018) Disturbance of metabotropic glutamate receptor-mediated long-term depression (mGlu-LTD) of excitatory synaptic transmission in the rat hippocampus after prenatal immune challenge. *Neurochem. Res.*, doi: 10.1007/s11064-018-2476-0.
 37. Gomez-Pineda, V.G., Torres-Cruz, F.M., Vivar-Cortes, C.I. and Hernandez-Echeagaray, E. (2018) Neurotrophin-3 restores synaptic plasticity in the striatum of a mouse model of Huntington's disease. *CNS Neurosci. Ther.*, **4**, 353–363.
 38. Lang, S.B., Stein, V., Bonhoeffer, T. and Lohmann, C. (2007) Endogenous brain-derived neurotrophic factor triggers fast calcium transients at synapses in developing dendrites. *J. Neurosci.*, **27**, 1097–1105.
 39. Zuccato, C. and Cattaneo, E. (2009) Brain-derived neurotrophic factor in neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Neurol.*, **5**, 311–322.
 40. Conforti, P., Mas Monteys, A., Zuccato, C., Buckley, N.J., Davidson, B. and Cattaneo, E. (2013) In vivo delivery of DN: rEST improves transcriptional changes of REST-regulated genes in HD mice. *Gene Ther.*, **20**, 678–685.
 41. Canals, J.M., Pineda, J.R., Torres, P.J.F., Bosch, M., Martin, I.R., Munoz, M.T., Mengod, G., Ernfors, P. and Alberch, J. (2004) Brain-derived neurotrophic factor regulates the onset and severity of motor dysfunction associated with enkephaliner-gic neuronal degeneration in Huntington's disease. *J. Neurosci.*, **24**, 7727–7739.
 42. Altar, C.A., Cai, N., Bliven, T., Juhasz, M., Conner, J.M., Acheson, A.L., Lindsay, R.M. and Wiegand, S.J. (1997) Anterograde transport of brain-derived neurotrophic factor and its role in the brain. *Nature*, **389**, 856–860.
 43. Giampa, C., Montagna, E., Dato, C., Melone, M.A., Bernardi, G. and Fusco, F.R. (2013) Systemic delivery of recombinant brain derived neurotrophic factor (BDNF) in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. *PLoS One*, **8**, e64037.
 44. Li, Y., Calfa, G., Inoue, T., Amaral, M.D. and Pozzo-Miller, L. (2010) Activity-dependent release of endogenous BDNF from mossy fibers evokes a TRPC3 current and Ca²⁺ elevations in CA3 pyramidal neurons. *J. Neurophysiol.*, **103**, 2846–2856.
 45. Jia, Y., Gall, C.M. and Lynch, G. (2010) Presynaptic BDNF promotes postsynaptic long-term potentiation in the dorsal striatum. *J. Neurosci.*, **30**, 14440–14445.
 46. Fino, E., Paille, V., Cui, Y., Morera-Herreras, T., Deniau, J.M. and Venance, L. (2010) Distinct coincidence detectors govern the corticostriatal spike timing-dependent plasticity. *J. Physiol.*, **588**, 3045–3062.
 47. Virlogeux, A., Moutaux, E., Christaller, W., Genoux, A., Bruyere, J., Fino, E., Charlot, B., Cazorla, M. and Saudou, F. (2018) Reconstituting corticostriatal network on-a-chip reveals the contribution of the presynaptic compartment to Huntington's disease. *Cell Rep.*, **22**, 110–122.
 48. Osborne, A., Wang, A.X., Tassoni, A., Widdowson, P.S. and Martin, K.R. (2018) Design of a novel gene therapy construct to achieve sustained brain-derived neurotrophic factor signalling in neurons. *Hum. Gene Ther.*, <http://doi.org/10.1089/hum.2017.069>.
 49. Baydyuk, M. and Xu, B. (2014) BDNF signaling and survival of striatal neurons. *Front. Cell Neurosci.*, **8**, 254.
 50. Borrell-Pages, M., Canals, J.M., Cordelieres, F.P., Parker, J.A., Pineda, J.R., Grange, G., Bryson, E.A., Guillemier, M., Hirsch, E., Hantraye, P. et al. (2006) Cystamine and cysteamine increase brain levels of BDNF in Huntington disease via HSJ1b and transglutaminase. *J. Clin. Invest.*, **116**, 1410–1424.
 51. Geva, M., Kusko, R., Soares, H., Fowler, K.D., Birnberg, T., Barash, S., Wagner, A.M., Fine, T., Lysaght, A., Weiner, B. et al. (2016) Pridopidine activates neuroprotective pathways impaired in Huntington disease. *Hum. Mol. Genet.*, **25**, 3975–3987.
 52. Mitre, M., Mariga, A. and Chao, M.V. (2017) Neurotrophin signalling: novel insights into mechanisms and pathophysiology. *Clin. Sci.*, **131**, 13–23.
 53. Wurzelmann, M., Romeika, J. and Sun, D. (2017) Therapeutic potential of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and a small molecular mimics of BDNF for traumatic brain injury. *Neural Regen. Res.*, **12**, 7–12.
 54. Mouri, A., Diat, O., El Ghzaoui, A., Bauer, C., Maurel, J.C., Devoisselle, J.M., Dorandeu, C. and Legrand, P. (2014) Phase behavior of reverse microemulsions based on Peceol(R). *J. Colloid Interface Sci.*, **416**, 139–146.
 55. Mouri, A., Diat, O., El Ghzaoui, A., Ly, I., Dorandeu, C., Maurel, J.C., Devoisselle, J.M. and Legrand, P. (2015) Development of pharmaceutical clear gel based on Peceol(R), lecithin, ethanol and water: physicochemical characterization and stability study. *J. Colloid Interface Sci.*, **457**, 152–161.
 56. Mouri, A., Legrand, P., El Ghzaoui, A., Dorandeu, C., Maurel, J.C. and Devoisselle, J.M. (2016) Formulation, physicochemical characterization and stability study of lithium-loaded microemulsion system. *Int. J. Pharm.*, **502**, 117–124.

57. Espallergues, J., Galvan, L., Sabatier, F., Rana-Poussine, V., Maurice, T. and Chatonnet, A. (2010) Behavioral phenotyping of heterozygous acetylcholinesterase knockout (AChE^{+/-}) mice showed no memory enhancement but hyposensitivity to amnesic drugs. *Behav. Brain Res.*, **206**, 263–273.
58. Lahmy, V., Meunier, J., Malmstrom, S., Naert, G., Givalois, L., Kim, S.H., Villard, V., Vamvakides, A. and Maurice, T. (2013) Blockade of Tau hyperphosphorylation and Aβ(1–42) generation by the aminotetrahydrofuran derivative ANAVEX2-73, a mixed muscarinic and sigma(1) receptor agonist, in a nontransgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neuropsychopharmacology*, **38**, 1706–1723.
59. Blanc, E.M., Jallageas, M., Recasens, M. and Guiramand, J. (1999) Potentiation of glutamatergic agonist-induced inositol phosphate formation by basic fibroblast growth factor is related to developmental features in hippocampal cultures: neuronal survival and glial cell proliferation. *Eur. J. Neurosci.*, **11**, 3377–3386.
60. de Jesus Ferreira, M.C., Crouzin, N., Barbanel, G., Cohen-Solal, C., Recasens, M., Vignes, M. and Guiramand, J. (2005) A transient treatment of hippocampal neurons with alpha-tocopherol induces a long-lasting protection against oxidative damage via a genomic action. *Free Radic. Biol. Med.*, **39**, 1009–1020.
61. Crouzin, N., Baranger, K., Cavalier, M., Marchalant, Y., Cohen-Solal, C., Roman, F.S., Khrestchatsky, M., Rivera, S., Feron, F. and Vignes, M. (2013) Area-specific alterations of synaptic plasticity in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease: dissociation between somatosensory cortex and hippocampus. *PLoS One*, **8**, e74667.
62. Lante, F., de Jesus Ferreira, M.C., Guiramand, J., Recasens, M. and Vignes, M. (2006) Low-frequency stimulation induces a new form of LTP, metabotropic glutamate (mGlu5) receptor- and PKA-dependent, in the CA1 area of the rat hippocampus. *Hippocampus*, **16**, 345–360.
63. Cavalier, M., Crouzin, N., Ben Sedrine, A., de Jesus Ferreira, M.C., Guiramand, J., Cohen-Solal, C., Fehrentz, J.A., Martinez, J., Barbanel, G. and Vignes, M. (2015) Involvement of PKA and ERK pathways in ghrelin-induced long-lasting potentiation of excitatory synaptic transmission in the CA1 area of rat hippocampus. *Eur. J. Neurosci.*, **42**, 2568–2576.
64. Crouzin, N., de Jesus Ferreira, M.C., Cohen-Solal, C., Aimar, R.F., Vignes, M. and Guiramand, J. (2007) Alpha-tocopherol-mediated long-lasting protection against oxidative damage involves an attenuation of calcium entry through TRP-like channels in cultured hippocampal neurons. *Free Radic. Biol. Med.*, **42**, 1326–1337.
65. Kanato, Y., Ono, S., Kitajima, K. and Sato, C. (2009) Complex formation of a brain-derived neurotrophic factor and glycosaminoglycans. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73**, 2735–2741.

“Si tu ne fais pas ce que tu aimes, aimes ce que tu fais.”

Simon.

Résumé

La maladie de Huntington (MH) est une maladie neurodégénérative progressive héréditaire. Aucun traitement curatif n'a encore été trouvé. La MH est provoquée par une mutation dans le gène *HTT* induisant l'augmentation anormale du domaine PolyQ contenue dans la Huntingtine (Htt), la protéine codée par le gène *HTT*. Les conséquences et les mécanismes de cette mutation sont maintenant bien décrits et ont permis d'identifier une interaction importante entre la Htt et la voie de signalisation du BDNF. Le BDNF est un facteur neurotrophique qui joue des rôles importants, à travers l'activation de son récepteur TrkB, dans le développement et le maintien des neurones et également dans la plasticité des réseaux synaptiques. La Htt mutante (mHtt) diminue l'expression et le transport du BDNF et de TrkB dans les neurones.

P42, une partie de 23 acides aminés de la Htt, est capable de sauver de nombreux phénotypes pathologiques induits dans la MH.

L'objectif de ma thèse était de mieux comprendre les mécanismes d'action de P42, dans le but d'optimiser son potentiel thérapeutique. Pour cela j'ai développé plusieurs expériences sur plusieurs modèles.

Dans un article, publié dans HMG, je montre les effets d'un traitement avec P42 sur la voie de signalisation BDNF/TrkB dans un modèle de MH : les souris R6/2. Pour cela j'ai analysé plusieurs phénotypes pathologiques, comportements et mécanismes cellulaires développés par les souris R6/2 et connus pour être dépendants de la voie BDNF/TrkB. J'ai également mesuré les taux d'ARNm et de protéine, du BDNF et de TrkB, dans le cortex et le striatum. Ce que j'ai trouvé est que P42 agit sur la voie BDNF/TrkB principalement en augmentant l'expression de TrkB dans le striatum.

Afin d'observer l'effet de P42 sur le transport vésiculaire, j'ai également utilisé la drosophile comme modèle. Grâce à ce modèle j'ai pu observer in vivo le transport vésiculaire dans différentes conditions avec ou sans mHtt ou P42.

Egalement, dans le but de mieux suivre l'évolution des différents phénotypes pathologiques induit par la MH et l'effet du traitement par P42, j'ai expérimenté le HAMLET, un test innovant multi-comportemental.

Enfin, j'ai observé sur les souris R6/2, l'effet d'une bithérapie P42 avec P3, un peptide ciblant les effets toxiques induits par les ARN codant pour un PolyQ.

Tous ces résultats permettent de mieux comprendre les mécanismes d'action de P42.

Abstract

Huntington's disease (HD) is a rare genetic neurodegenerative disorder. Curative treatments are still actively sought. HD is induced by a mutation in the *HTT* gene inducing an abnormal expansion of the polyQ domain contained in the Huntingtin protein (Htt). Mechanisms and consequences of this mutation are now well described and allowed to identify an interaction of the Htt with the brain derived neurotrophic factor (BDNF) signaling pathway. BDNF is a neurotrophic factor, which plays important roles, through TrkB, one of its receptor, in neuronal development and plasticity. Mutant Htt (mHtt) down-regulates BDNF and TrkB transcription and transport along the axons.

P42, a part of the Htt protein, is a 23aa peptide able to rescue HD pathological phenotypes, such as aggregation, axonal transport and neuronal viability.

The aim of my PhD was to better understand the mechanisms of action of P42, in a purpose to optimize its therapeutic potential. To this end I developed different studies using different models.

In a paper now accepted for publication in HMG, I first used a P42-based treatment on R6/2 HD mice, to analyze the effect of P42 on the BDNF/TrkB signaling pathway. To this end I analyzed pathologic phenotypes: behaviors or cell mechanisms developing in R6/2 mice and are related to the BDNF/TrkB pathway. I also measured BDNF and TrkB, mRNA or protein levels in both striatum and cortex. What I found is that P42 is acting on BDNF/TrkB pathway mainly by increasing the protein level of TrkB in the striatum. To observe the effect of P42 on vesicular transport, I rather used a *Drosophila* model, to perform live imaging based studies, in different transgenic conditions: with or without mHtt or P42.

Also, in a way to better follow the progression of different pathological phenotypes and the effect of treatments on R6/2 mice, I benefited from a very recent and innovative tool, the HAMLET, which allows a multi-behavioral test.

Finally, a bithérapie was used on R6/2 mice combining P42 and P3, a peptide raised against PolyQ mRNA that are also toxic.

All those results contribute to a better understanding of P42 mechanisms of action.