



HAL
open science

Etude du rôle de la protéine kinase DCLK3 dans les mécanismes de neurodégénérescence dans la maladie de Huntington

Lucie De de Longprez Longprez

► **To cite this version:**

Lucie De de Longprez Longprez. Etude du rôle de la protéine kinase DCLK3 dans les mécanismes de neurodégénérescence dans la maladie de Huntington. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Paris Saclay (COMUE), 2018. Français. NNT : 2018SACLS546 . tel-01974305

HAL Id: tel-01974305

<https://theses.hal.science/tel-01974305>

Submitted on 8 Jan 2019

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.

Etude du rôle de la protéine kinase DCLK3 dans les mécanismes de neurodégénérescence dans la maladie de Huntington

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay

Préparée à l'Université Paris Sud

Dans le Laboratoire des Maladies Neurodégénératives

École doctorale n°568 Signalisations et réseaux intégratifs en biologie
(Biosigne)

Spécialité de doctorat : Aspects cellulaires et moléculaires de la
biologie

Thèse présentée et soutenue à Fontenay-aux-Roses, le 19 décembre
2018, par

Lucie de Longprez

Composition du Jury :

Sylvie Granon

Professeur, Institut des neurosciences de Saclay (UMR 9197)

Présidente

Sandrine Betuing

Professeur, Sorbonne Université, Institut de Biologie Paris
Seine, Neurosciences Paris Seine (UMR 8246)

Rapporteur

Christian Neri

Directeur de recherche, Institut de Biologie Paris Seine,
Neurosciences Paris Seine (UMR 8256)

Rapporteur

Denis David

Professeur, Faculté de Pharmacie, Université Paris Sud (UMRS
1178)

Examineur

Karine Merienne

Directeur de recherche, Laboratoire de neurosciences
cognitives et adaptatives (UMR 7364), Université Strasbourg

Examineur

Emmanuel Brouillet

Directeur de recherche, CNRS – CEA, MIRCen (UMR 9199)

Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier l'ensemble des membres de mon jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail, et particulièrement mes rapporteurs Sandrine Betuing et Christian Neri qui ont pris de leur temps pour l'amélioration de mon manuscrit.

Je remercie aussi nos collaborateurs qui ont fait grandement avancé le projet : Karine Merienne, Christian Neri, Denis David, Indira Mendez-David.

Je remercie Philippe Hantraye d'avoir accepté que je puisse réaliser ma thèse à MIRCen. Je remercie sincèrement toutes les personnes qui nous aident quotidiennement, au niveau administratif, informatique... Cécile, Marie-Christine, Marie-Laure, Laurent, Kristell, Pascal, Didier.

Un grand merci à Emmanuel pour la confiance que tu m'as accordée dès le stage d'ingénieur alors que je n'avais aucune connaissance en Neurosciences. Je te remercie sincèrement de m'avoir permis d'aller à divers congrès et formations qui ont pu enrichir mon parcours.

Je te remercie Maria, pour tout un tas de choses : d'abord pour ton encadrement en stage, puis pour tes nombreux conseils pendant la thèse mais aussi hors thèse. Je suis contente que nous ayons partagé autant de moments de vie ensemble pendant ces 3 dernières années : mariage, naissance, JMJ... Et nos chemins vont continuer à se croiser puisque nous sommes maintenant voisines !

Merci à Géraldine, pour tes conseils sur le projet et pendant mon stage sur mon avenir. Merci aussi à Emilie pour ta nouvelle vision du projet mais aussi pour ton énergie et ton positivisme qui sont arrivés à point nommé au moment où je m'essoufflais un peu pendant la thèse. Fournisseuse officielle de café (parmi d'autres !), merci aussi de m'avoir nourrie et hydratée pendant la rédaction.

Que seraient un projet et un thésard sans une grande équipe pluridisciplinaire derrière eux ! Merci à l'ancienne équipe 1 et à la nouvelle équipe 2 de m'aider à progresser dans mon projet et notamment Gilles Astro et Carole pour vos feedbacks toujours pertinents pendant les team meetings et les divers oraux. Un grand merci à Marie-Claude de m'avoir formée à la BM mais pas que : merci de m'avoir écoutée et conseillée pendant ces 3 ans et ½. Merci à Karine de m'avoir formée au comportement et aux stats, tu as toujours pris du temps pour l'analyse de mes données. Je te remercie sincèrement d'avoir été mon coach par interim. Merci à Mylène, Martine, Sueva, Gwen et Charlène pour votre aide précieuse pendant les injections. Merci à Charlène et Noëlle pour la production de virus mais pas que ! Votre bonne humeur participe grandement à la convivialité de MIRCen. Merci à

Alexis pour ton super AAV-CRE c'est grâce à lui que j'ai eu des résultats positifs (ouf). Merci à Julien, pour le comportement, les livraisons de souris au dernier moment et tous tes conseils sur les souris en général. Merci à Lev et Sophie pour votre expertise et votre aide sur les immunohisto en paraffine. Un grand merci à Jérémy et Julien F. qui m'ont ouvert les portes du 11.7 T, à Nad pour tes analyses morphométriques. Merci à Anne-Sophie pour tes belles images. Un gros gros gros merci à Caro, Fanny et Pauline pour les immunos, d'avoir accepté (ou pas) mon impatience sur le microtome, votre bonne humeur et votre soutien.

Je remercie mes fournisseurs de denrées alimentaires : Gwen, Noëlle, Charlène (pour les M&Ms), Océane, PA, Charlotte (pour les bonbons et tisanes), Emilie, Laurene, Camille (pour le café) et une dédicace à Fannos L. (chocolats, amandes, croissants, madeleines et pour avoir été contrainte de partager son bureau). Merci à l'équipe « cantine » d'avoir accepté de venir manger avec vous : Pauline, Caro, Fanny P., Dimitri, Elsa, Anne-So, Léopold. Vous m'avez bien fait rire pendant la 3^{ème} année !

Un grand merci aux anciens thésards qui nous ont chaleureusement accueillis et pour tous ces moments partagés : Marie, Charlotte, Noémie, Brice, Jérémy, Séverine, Clémence la grande, Clémence la petite, Yaël et Kelly (à quand la prochaine fête de la musique ?) et bon courage aux prochains, Charlotte, Océane, PA, Mélissa, Suzanne, Fanny, Marina (on vous avait prévenus tant pis pour vous maintenant).

Merci les copains pour ces 3 ans et pour avoir accepté de me supporter (est-ce que vous aviez vraiment le choix ? Je suis tellement rigolote...) : tata Laulau, Audrey Hepburn, Mariannette, Kelloche, Camoche, Anastasie/Anastasia Mate de Gerando Mate, Yaël, Paulette, Maria. Il me faudrait un 2^{ème} manuscrit pour répertorier tous les résultats que j'ai répertorié pendant ces 3 ans avec vous et il y a de quoi discuter !... Merci d'avoir partagé autant de bons moments (en vrac : la Bretagne, le Jura, la Réunion, le mariage, le PACS, le MKP, les pompiers, Nostalgie sur la route, Berg-en-Brousse) et surtout les pires (la machine à laver ! mes plaintes). Vous avez été de vrais rayons de soleil (chacun à votre manière). Même si je ne fais pas de laïus pour chacun d'entre vous, sachez que vous avez toute ma gratitude (j'ai quand même installé WhatsApp, n'est-ce pas la plus grand preuve de gratitude ?). Et puis il y a les anciennes : Tati, Célinette et Grumeau.

Enfin je remercie ma famille qui m'a toujours soutenue dans tous mes projets, maman, papa, Méryem, Olivier, je vous aime.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	i
TABLE DES MATIÈRES	iii
ABRÉVIATIONS.....	viii
LISTE DES FIGURES ET DES TABLES	x
INTRODUCTION	1
1 La maladie de Huntington	1
1.1 Signes cliniques.....	1
1.1.1 Troubles moteurs	2
1.1.2 Troubles cognitifs	2
1.1.3 Symptômes psychiatriques.....	3
1.2 Causes de la MH	4
1.2.1 Mutation du gène de l'huntingtine	4
1.2.2 Autres facteurs génétiques	5
1.2.3 Facteurs environnementaux.....	6
1.3 Anatomopathologie.....	6
1.3.1 Le striatum dans la MH.....	9
1.3.1.1 Vulnérabilité du striatum	9
1.3.1.2 Circuit des ganglions de la base perturbé	10
1.3.2 L'hippocampe dans la MH	13
1.4 Physiopathologie	16
1.4.1 L'huntingtine : le gène, la protéine et son expression	16
1.4.2 Perte et gain de fonctions de l'Htt suite à l'expansion poly-Q.....	18
1.4.3 Dérégulation transcriptionnelle	19
1.4.3.1 Interaction de l'Htt avec des régulateurs transcriptionnels.....	20
1.4.3.2 Dérégulation de la transcription à grande échelle due au stress cellulaire	

1.4.3.3	Conséquences fonctionnelles de l'expression différentielle des gènes....	23
1.4.4	La piste épigénétique de la dérégulation transcriptionnelle.....	23
1.4.4.1	L'épigénétique dans les neurones : à l'origine de l'identité neuronale	24
1.4.4.2	Changements épigénétiques dans la MH.....	25
1.4.4.3	Mécanismes sous-jacents et leurs conséquences.....	26
1.4.5	Hypothèse de l'excitotoxicité.....	26
1.4.6	Perturbation du transport des vésicules et des organelles.....	29
1.4.7	Autophagie.....	30
1.4.8	Dysfonctionnement mitochondrial.....	32
1.5	Modélisation de la MH.....	34
1.5.1	Focus sur les modèles murins.....	35
1.5.1.1	Les modèles par transfert viral du gène de l'htt.....	35
1.5.1.2	Les modèles génétiques de la MH.....	36
1.5.2	Modélisation des symptômes moteurs.....	39
1.5.3	Modélisation des symptômes cognitifs.....	41
1.5.4	Modélisation des autres manifestations comportementales et des spécificités anatomopathologiques.....	42
2	DCLK3 et la famille des DCX.....	45
2.1	La famille DCX et les DCLKs.....	45
2.2	DCLK1 et DCLK2.....	46
2.3	DCLK3.....	47
3	Hypothèse de travail et les objectifs de l'étude.....	50
	MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	51
1	Animaux.....	51
2	Génération des souris modifiées au niveau du gène <i>Dclk3</i>	51
2.1	Génération des souris <i>Dclk3</i> conditionnelle (<i>Dclk3^{flox/flox}</i>).....	51
2.2	Génération des souris déficientes en <i>Dclk3</i> (KO <i>Dclk3</i> constitutif).....	53
2.3	Génération des souris déficientes en <i>Dclk3</i> uniquement dans le striatum.....	53

2.4	Génotypage des souris	53
3	Infections virales.....	54
3.1	Conception plasmidique.....	54
3.2	Production d'AAV	54
3.3	Injections stéréotaxiques	55
4	Groupes expérimentaux.....	56
5	Analyses comportementales	56
5.1	Piscine de Morris	57
5.2	Rotarod.....	58
5.3	Labyrinthe en croix surélevé	58
5.4	Cage d'activité	58
5.5	<i>Open Field</i>	58
6	IRM anatomique et spectroscopie par résonance magnétique à proton.....	59
6.1	Acquisition	59
6.2	Quantification des métabolites.....	59
7	Biologie moléculaire.....	60
7.1	Extraction des ARN totaux.....	60
7.2	Synthèse d'ADNc	60
7.3	PCR quantitative (qPCR)	60
8	Histologie.....	61
8.1	Immunohistochimie sur coupe en paraffine	61
8.2	Immunofluorescence sur coupe flottante.....	61
8.3	Immunohistochimie sur coupe flottante.....	61
9	Analyse statistique	62
	RÉSULTATS	63
1	DCLK3 est une protéine nucléaire dans les neurones striataux <i>in vivo</i>	63
2	Caractérisation des modèles murins déficients en Dclk3.....	64
2.1	Délétion constitutive de Dclk3 (KO Dclk3).....	64

2.1.1	Les souris constitutivement déficientes en Dclk3 (KO Dclk3) ne présentent pas de perturbations du cycle circadien ni d'anxiété	65
2.1.2	Les souris constitutivement déficientes en Dclk3 (KO Dclk3) n'ont pas de déficits moteurs majeurs	68
2.1.3	La mémoire spatiale n'est pas atteinte dans les souris constitutivement déficientes en Dclk3	69
2.1.4	L'absence de Dclk3 ne change pas le profil métabolique du striatum et de l'hippocampe des souris KO Dclk3	72
2.1.5	L'analyse anatomopathologique n'a pas montré de différence macroscopique	73
2.2	Délétion striatale de Dclk3 (Dclk3 ^{flox/flox} /CRE)	74
2.2.1	Les souris déficientes en Dclk3 dans le striatum ne présentent pas de cycle circadien perturbé ou d'anxiété exacerbée	75
2.2.2	Les souris déficientes en Dclk3 dans le striatum n'ont pas de déficits moteurs	77
2.2.3	Les souris déficientes en Dclk3 dans le striatum ne présentent pas un changement dans le profil des métabolites du striatum	78
2.3	Délétion aigue de Dclk3 par injection d'AAV-CRE	79
2.3.1	L'expression de Dclk3 est diminuée dans le striatum des souris Dclk3 ^{flox/flox} injectées avec l'AAV-cre	79
2.3.2	La délétion locale et aigue de Dclk3 dans le striatum n'entraîne pas de déficit moteur	80
2.3.3	La délétion locale et aigue de Dclk3 dans l'hippocampe entraîne des déficits de mémoire spatiale.....	81
	DISCUSSION ET PERSPECTIVES	84
1	Le rôle de DCLK3 dans le cerveau.....	84
2	La perte de DCLK3 pour le cerveau	85
3	DCLK3 dans la maladie de Huntington	89
	CONCLUSIONS	94
	BIBLIOGRAPHIE	95

ANNEXES.....	127
1 Rappel de notions d'épigénétique	127
2 Article : The striatal kinase DCLK3 produces neuroprotection against mutant huntingtin 129	
3 Article collaboratif n°1 : The Self-Inactivating KamiCas9 System for the Editing of CNS Disease Genes	130
4 Article collaboratif n°2 : Altered enhancer transcription underlies Huntington's disease striatal transcriptional signature	131
5 Article collaboratif n°3 : In vivo imaging of brain glutamate defects in a knock-in mouse model of Huntington's disease.....	132
Résumé	133

ABRÉVIATIONS

3NP	Acide 3-nitropropionique
AA	Aminoacide
AAV	Virus adéno-associé
ADN	Acide desoxyribonucléique
ADNc	Acide desoxyribonucléique complémentaire
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-méthylisoazol-4-propionate
ARNe	ARN enhancer
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine triphosphate
BAC	Chromosome artificiel bactérien
BSA	Albumine de sérum bovin
CamK	Kinase calcium/calmoduline-dépendante
CaMKII	Protéine kinase Ca ²⁺ /calmoduline-dépendante II
CBP	CREB-binding protein
CIP4	Cdc42-interacting protein 4
CMV	Cytomégalovirus
CREB	cAMP Response Element Binding Protein
CREB	cAMP Response Element-binding protein
D1R	Récepteur dopaminergique D1
D2R	Récepteur dopaminergique D2
DCLK	Doublecortin-like kinase
DCX	Doublecortin
EHDN	European Huntington's Disease Network
EPM	Labyrinthe en croix surélevé (elevated plus maze)
FOXO3	Forkhead box O 3
GABA	acide γ -amino butyrique
GFAP	Protéine acide fibrillaire gliale
GLT1	Transporteur au glutamate de type 1
GPe	Globus pallidus <i>pars externa</i>
GPI	Globus pallidus <i>pars interna</i>
GWAS	Genome-Wide Association Studies
HAP1	Huntingtin-associated protein 1
HAT	Histone acétyltransférase
HDAC	Histone désacétylase
HétéroZ	Hétérozygote
HomoZ	Homozygote
Htt	Huntingtine
Httm	Huntingtine mutée
IRM	Imagerie par résonance magnétique
ITR	Inverted Terminal Repeat
Jdp2	Jun dimerization protein 2
kDa	kilodalton
KI	Knock-in
LTD	Long-term depression
LTP	Long-term potentiation
LV	Lentivirus
LXR	Liver X receptors

MaHDC	Massachusetts HD Center Without Walls
mGluR	Récepteur métabotrope du glutamate
MH	Maladie de Huntington
miARN	microARN
MLH1	mutL homolog 1
MPT	Modifications post-traductionnelles
MSN	Medium-sized spiny neuron
NGS	Normal goat serum
NMDA	N-méthyl-D-aspartate
pb	Paire de bases
PBS	Solution saline tamponnée au phosphate
PEG	Polyéthylène glycol
PFA	Paraformaldéhyde
PPARγ	Peroxisome proliferator-activated receptors
PPI	Pre-pulse inhibition
PPSE	Potentiel postsynaptique excitateur
PRC2	polycomb repressive complex 2
PSD95	Protéine de densité postsynaptique 95 kDa
RE1/NRSE	Repressor element 1/ neuron-restrictive silencer element
REST	RE1-silencing transcription factor
rpm	Rotation par minute
SAGA	Spt-ada-Gcn5 acetyl transferase
SGZ	Zone sous-granulaire
SH3	SRC homology domain
SILT	Serial implicit learning task
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SNpr	Substance noire <i>pars reticulata</i>
SRM	Spectroscopie par résonance magnétique
STDP	Spike-timing-dependent plasticity
TADA3	Transcriptional adapter 3
UHDRS	The Unified Huntington's Disease Rating Scale
YAC	Chromosome artificiel de levure

LISTE DES FIGURES ET DES TABLES

Figure 1. Variations du nombre de répétitions de CAG dans le gène de l'htt et ses conséquences.....	4
Figure 2. Imagerie IRM d'un individu sain, d'un patient atteint de la MH sans symptôme et d'un patient atteint de la MH dans les stades précoces (Tabrizi, et al., 2009).	7
Figure 3. Modèle de progression de la maladie au niveau du cortex selon les différents stades de la maladie (Rosas, et al., 2008).....	8
Figure 4. Agrégats intranucléaires et cytoplasmiques d' huntingtine mutée (Shin, et al., 2005)9	
Figure 5. Représentation des ganglions de la base chez l'Homme (Lim, Fiez, & Holt, 2014).....	9
Figure 6. Représentation du modèle de la voie directe et de la voie indirecte en condition physiologique (Calabresi, Picconi, Tozzi, Ghiglieri, & Di Filippo, 2014).....	10
Figure 7. Circuit des ganglions de la base perturbé au cours de la maladie de Huntington. (Sepers & Raymond, 2014).....	12
Figure 8. L'hippocampe et ses interactions avec les autres régions impliquées dans la mémoire (Bartsch & Wulff, 2015).....	14
Figure 9. Neurogenèse hippocampale adulte en 5 étapes (Ming & Song, 2011).....	15
Figure 10. Représentation de la séquence protéique de l'huntingtine humaine (Saudou & Humbert, 2016).	18
Figure 11. Les dysfonctionnements synaptiques et l'excitotoxicité dans la MH (Sepers & Raymond, 2014).	28
Figure 12. Les protéines motrices, dynéine et kinésine, régulent le transport antérograde et rétrograde des mitochondries dans les neurones (Bossy-Wetzels, Petrilli, & Knott, 2008).....	29
Figure 13. L'autophagie est altérée dans la MH (Martin, Ladha, Ehrnhoefer, & Hayden, 2015).....	31
Figure 14. Construction génétique des différents modèles de la MH (Pouladi, Morton, & Hayden, 2013).	37
Figure 15. Représentation schématique de la protéine DCLK1 (Patel, et al., 2016)	46
Figure 16. Représentation schématique de DCLK3.	47
Figure 17. La diminution de Dclk3 augmente la toxicité de l'htt. Adapté de (Galvan, et al., 2018).....	48
Figure 18. La surexpression de DCLK3-HA diminue la lésion causée par la toxicité de l'htt. Adaptée de (Galvan, et al., 2018).....	49
Figure 19. Représentation schématique de la stratégie de ciblage utilisé.....	52

Figure 20. Représentation schématique de l'excision de la cassette néomycine.	52
Figure 21. Localisation nucléaire de DCLK3.....	64
Figure 22. Activité spontanée des souris KO Dclk3 constitutives dans un environnement proche de leur cage d'hébergement enregistrée avec un PhenoTyper et de leurs compagnons de portée....	66
Figure 23. Etude de l'état d'anxiété des souris KO Dclk3 constitutives et de leurs compagnons de portée WT au labyrinthe en croix surélevé (EPM) et à l' <i>Open Field</i>	67
Figure 24. Etude du comportement moteur des souris KO Dclk3 constitutives et de leurs compagnons de portée WT au Rotarod et à l' <i>Open Field</i>	69
Figure 25. Etude de l'apprentissage et de la mémoire spatiale dans les souris KO Dclk3 et de leurs compagnons de portée WT par le test de la piscine de Morris.	71
Figure 26. Profils métaboliques mesurés par spectroscopie par résonance magnétique des souris KO Dclk3 et de leurs compagnons de portée WT	73
Figure 27. Etude anatomopathologique des souris KO Dclk3 mâles à 6 mois et de leurs compagnons de portée WT.....	74
Figure 28. Activité spontanée des souris déficientes en Dclk3 dans le striatum (Dclk3 ^{flox/flox} / CRE) et de leurs compagnons de portée Dclk3 ^{flox/flox} dans un environnement proche de leur cage d'hébergement enregistrée avec un PhenoTyper.....	76
Figure 29. Etude de l'état d'anxiété des souris déficientes en Dclk3 dans le striatum (Dclk3 ^{flox/flox} / CRE) et de leurs compagnons de portée (Dclk3 ^{flox/flox}) au test de l' <i>Open Field</i>	77
Figure 30. Etude du comportement moteur des souris déficientes en Dclk3 dans le striatum (Dclk3 ^{flox/flox} / CRE et de leurs compagnons de portée (Dclk3 ^{flox/flox}).....	78
Figure 31. Profil des métabolites mesurés par spectroscopie par résonance magnétique des souris déficientes en Dclk3 dans le striatum (Dclk3 ^{flox/flox} / CRE) et de leurs compagnons de portée (Dclk3 ^{flox/flox}) à 8 mois.....	79
Figure 32. Quantification par RT-qPCR de la délétion de Dclk3 dans le striatum des souris Dclk3 ^{flox/flox} et des souris WT après injection de l'AAV9-CRE ou de PBS	80
Figure 33. Etude de la coordination motrice par le test du Rotarod en mode accélération des souris Dclk3 ^{flox/flox} et de leurs compagnons de portée WT injectées avec de l'AAV9-cre.....	80
Figure 34. Etude de la mémoire à long-terme des souris Dclk3 ^{flox/flox} et de leurs compagnons de portée WT injectées avec de l'AAV9-cre par le test de la piscine de Morris (MWM).....	82
Figure 35. Analyse du probe test en tenant compte des 30 premières secondes.....	83
Figure 36. Analyse morphométrique préliminaire sur les souris KO Dclk3 à 6 mois et de leurs compagnons de portée WT.....	86
Figure 37. Analyse CHIPseq H3K27ac montrant la régulation de <i>Dclk3</i> par des super- <i>enhancers</i> dans le striatum des souris WT et R6/1.	93

Tableau 1. Construction génétique des modèles murins de la MH classiquement utilisés	39
Tableau 2. Déficits moteurs observés dans les modèles murins de la MH classiquement utilisés.	40
Tableau 3. Déficits cognitifs observés dans les modèles murins de la MH régulièrement utilisés.	42
Tableau 4. Observations anatomopathologiques et autres manifestations observables dans les modèles murins de la MH.	44
Tableau 5. Amorces utilisées pour le génotypage et produits de PCR attendus.	54
Tableau 6. Coordonnées d'injection stéréotaxique selon la zone ciblée.	55
Tableau 7. Groupes expérimentaux étudiés.	56
Tableau 8. Point de départ des souris lors de la phase d'entraînement.	57

INTRODUCTION

1 La maladie de Huntington

La maladie de Huntington (MH) est une pathologie neurodégénérative rare qui concerne entre 5 et 10 personnes sur 100 000 personnes dans la population caucasienne (Pringsheim, et al., 2012). Cette pathologie se caractérise par une triade de symptômes que sont les troubles moteurs, les troubles cognitifs et les symptômes psychiatriques.

George Huntington est le premier à décrire la chorée dans le journal hebdomadaire « The medical and surgical reporter » en 1892 (Huntington, 2003). Il observe que les enfants dont les parents sont atteints de la chorée ont un plus grand risque de la développer à leur tour. Il pressent d'ores et déjà le caractère héréditaire de la maladie. Après la création d'un consortium international composé de six groupes et appelé « The Huntington's disease collaborative research group », le gène muté responsable de la MH, le gène de l'huntingtine (Htt), est découvert en 1993 (The Huntington's Disease Collaborative Research group, 1993). La découverte du gène a été une grande révolution dans les sciences mais aussi pour le grand public. Le New York Times a ainsi consacré un article sur le sujet en une du numéro du 24 mars 1993 sous le titre de « Researchers locate gene that triggers Huntington's illness » (Les chercheurs ont localisé le gène responsable de la maladie de Huntington).

Malgré la découverte du gène impliqué dans la MH, aucun traitement curatif n'existe à l'heure actuelle, seuls des traitements symptomatiques sont administrés afin d'améliorer la qualité de vie des patients (pour revue, (Coppen & Roos, 2017; Wild & Tabrizi, 2017).

1.1 Signes cliniques

Le décours de la MH peut être divisé en deux phases :

- Une phase pré-symptomatique ou phase prodromique où les individus atteints sont difficilement différenciables des autres individus non atteints. Rétrospectivement, les familles notent une agitation plus grande chez le patient qui peut s'accompagner par des difficultés à gérer plusieurs tâches en même temps (Walker, 2007)
- Une phase symptomatique qui se déclare généralement entre 30 et 50 ans avec la survenue des symptômes moteurs

Les troubles moteurs, cognitifs et psychiatriques sont les signes cliniques les plus décrits dans la MH. La pathologie se développe progressivement entraînant une dépendance du patient et un

besoin de soins de plus en plus accru. L'issue est fatale 17 à 20 ans après les premiers symptômes moteurs (Roos, 2010). D'autres symptômes sont également observables tels qu'une perte de poids, des troubles du sommeil. Les symptômes sont d'autant plus incisifs que l'atteinte génétique est importante.

“The Unified Huntington’s Disease Rating Scale” (UHDRS) qui peut être traduit par « l'échelle de notation unifiée de la maladie de Huntington », est couramment utilisé en clinique pour suivre l'avancement de la maladie chez les patients (Huntington study group, 1996). L'échelle tient compte de tous les symptômes aussi bien les symptômes moteurs que les troubles cognitifs et psychiatriques (pour revue (Ross, et al., 2014)).

1.1.1 Troubles moteurs

Les troubles moteurs sont les signes cliniques à l'origine de la première dénomination de la maladie : la chorée de Huntington. Dans une première phase, ces symptômes moteurs se traduisent par des mouvements involontaires et indésirables qui commencent tout d'abord aux extrémités des membres et qui atteignent ensuite certains muscles faciaux. Ces mouvements désordonnés perturbent la motricité fine. En définitive, ces mouvements involontaires affectent l'ensemble du corps du patient. Ces troubles moteurs deviennent rapidement très handicapants dans la vie de l'individu. Sa démarche s'apparente à celle d'une personne légèrement ivre et les tics faciaux sont maladroitement traduits comme des signes de nervosité. En outre, des aptitudes de la vie quotidienne comme parler ou avaler s'avèrent de plus en plus difficile (Roos, 2010). Dans une deuxième phase, les mouvements volontaires sont également détériorés se traduisant par une bradykinésie et notamment une rigidité des mouvements (pour Revue (Ross, et al., 2014)).

Ces troubles moteurs deviennent de plus en plus handicapants dans la vie quotidienne puisque le risque de chute est plus accru. Des fausses routes peuvent se produire. La locution peut être altérée. L'atteinte des muscles faciaux modifie l'expression et les traits des personnes si bien qu'il est difficile de décoder les sentiments de la personne. Ceci est appelé le « déguisement de Huntington » (Pollard, 2008).

1.1.2 Troubles cognitifs

Un profil type des troubles cognitifs n'existe pas mais chaque patient a son propre déroulement des symptômes en fonction notamment de la longueur de la mutation (1.2 Causes de la MH). Bien que les troubles moteurs soient les symptômes les plus marquants de la MH, les troubles cognitifs apparaissent 12 à 15 ans avant les premiers signes moteurs. Les déficits d'attention ou de concentration sont les premières manifestations du développement de la MH. Les fonctions exécutives telles que l'organisation, la planification ou la mise en place de solutions alternatives sont précocement

atteintes. Les fonctions d'initiation ou d'inhibition sont également perturbées. Les patients ont aussi de plus grandes difficultés à patienter. Également, les patients atteints de la MH ont des difficultés à organiser leurs idées et à y avoir accès. Les souvenirs sont souvent encore présents mais les patients ont des difficultés à les exprimer et surtout à y accéder efficacement. Le processus de la pensée se ralentit drastiquement.

Ces caractéristiques ont été décrites par Jimmy Pollard dans son livre « Hurry up and wait » traduit par la société Huntington du Québec en 2013 sous l'intitulé « Dépêche-toi et attends ». Quand le processus de la pensée ralentit, le patient a des difficultés à réaliser des tâches qui étaient pour lui automatiques avant la déclaration de la maladie. Cette tâche automatique devient une tâche qu'il doit faire en pleine conscience. Le rythme de réalisation de la tâche s'en trouve altéré, ce qui entraîne une fatigue chez le patient, qui va par la suite s'ennuyer et se laisser distraire. Dans une conversation, le patient prendra donc du temps à répondre à la question qui lui est formulée ce qui peut être interprété comme un signe de désintéressement, d'ennui ou d'agacement. À l'inverse, les problèmes d'inhibition causés par la maladie peuvent rendre la personne irritable et impatiente. « Dépêche-toi et attends » résume donc bien les changements qu'engendrent la MH chez une personne atteinte (Pollard, 2008).

Les déficits de mémoire s'amplifient en même temps que la maladie progresse et les capacités visio-spatiales se trouvent altérées. Les patients peuvent avoir aussi bien des déficits de mémoire à court terme que des déficits de mémoire à long terme impliquant la mémoire déclarative et la mémoire procédurale (pour Revue (Montoya, Price, Menear, & Lepage, 2006)).

La reconnaissance des émotions sur un visage est perturbée ce qui est très handicapant pour le patient lorsqu'il souhaite communiquer avec d'autres personnes (Labuschagne, et al., 2013). De plus, les troubles cognitifs peuvent s'associer aux troubles moteurs. Le patient, ayant de grandes difficultés à gérer plusieurs tâches en même temps, peut faire une fausse route en mangeant et en regardant la télévision en même temps par exemple.

1.1.3 Symptômes psychiatriques

La dépression est sans conteste le principal symptôme retrouvé chez la majorité des patients atteints de la MH. À cela, s'ajoutent l'irritabilité et des troubles de l'humeur qui sont présents dès les premiers stades de la maladie, puis l'apathie qui se révèle très handicapant dans la vie quotidienne et la vie sociale de la personne. En effet, l'apathie se traduit par une indifférence globale de ce qui se passe autour d'un individu. La vie familiale et plus particulièrement les relations familiales peuvent s'en trouver affectées.

1.2 Causes de la MH

1.2.1 Mutation du gène de l'huntingtine

La MH est une maladie génétique par transmission autosomique dominante qui est causée par l'élongation du nombre de répétitions de CAG sur l'exon 1 du gène de l'htt, situé sur le bras court du chromosome 4 (The Huntington's Disease Collaborative Research group, 1993) (Figure 1). En condition physiologique, le gène de l'htt porte en 5' du gène entre 6 et 26 répétitions du triplet CAG. Au-delà de 36 répétitions, l'allèle est dit muté. Entre 36 et 39 répétitions, la pénétrance du gène est incomplète c'est-à-dire que la personne porteuse de la mutation ne développe pas obligatoirement la maladie durant sa vie mais un risque de transmission à la descendance existe toujours (Rubinsztein, et al., 1996). Quarrell et collaborateurs (2007) montrent ainsi que les personnes portant ce type de mutation ont 60 % de risque de déclarer la maladie à 65 ans et 70 % à 75 ans. Au-delà de 40 répétitions, la pénétrance du gène est complète. En outre, les allèles portant entre 27 et 35 répétitions de CAG sont dits normaux mais sont dits mutables (ACMG/ASHG statement, 1998). En effet, ce type d'allèles présente une instabilité méiotique particulière : ces allèles sont plus enclins à s'accroître et donc peuvent conduire à un allèle muté chez la descendance. Cette instabilité méiotique est d'autant plus présente dans les gamètes mâles (Duyao, et al., 1993). Ce phénomène est à l'origine d'un phénomène dit d'anticipation c'est-à-dire que les générations successives présentent une expansion du nombre de répétitions du triplet. En conséquence, la maladie apparaît plus précocement et les signes cliniques sont d'autant plus sévères (Andrew, et al., 1993).

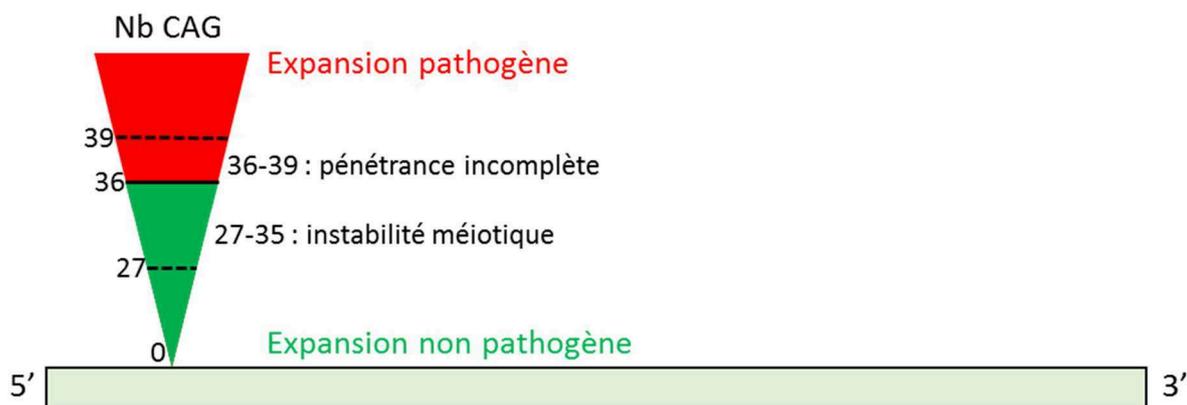


Figure 1. Variations du nombre de répétitions de CAG dans le gène de l'htt et ses conséquences. Représentation schématique du gène codant l'htt et du nombre de CAG polymorphiques dans la population. Nb : nombre.

Peu de temps après la découverte du gène responsable de la MH, plusieurs études ont montré la forte corrélation existante entre la longueur de l'expansion de CAG et l'apparition des symptômes moteurs (Stine, et al., 1993; Duyao, et al., 1993). Globalement, plus le nombre de répétitions de CAG

est élevé, plus l'apparition de la maladie est précoce. Cette corrélation est d'autant plus flagrante chez les patients qui présentent une forme juvénile de la maladie. En effet, ces patients développent les premiers symptômes avant 20 ans et portent plus de 60 répétitions de CAG (Quarrell, et al., 2013). Plusieurs modèles statistiques ont donc été développés pour prédire l'apparition des symptômes en fonction du nombre de répétitions de CAG (Langbehn, Hayden, Paulsen, & Group., 2010). En revanche, le nombre de répétitions du triplet CAG ne renseigne pas avec certitude l'âge d'apparition des symptômes car une variabilité individuelle existe. Pour un même nombre de répétitions, l'âge d'apparition des symptômes peut varier grandement, notamment par d'autres facteurs génétiques.

1.2.2 Autres facteurs génétiques

La MH est une maladie dont la biologie est très complexe et ne se résume pas uniquement au dérèglement de la biologie de l'Htt (Chapitre 1.4.2 « Perte et gain de fonctions de l'Htt suite à l'expansion poly-Q »). L'apparition des symptômes moteurs s'explique en grande partie par le nombre de répétition de CAG dans le gène de l'Htt mais d'autres facteurs génétiques influeraient également l'âge d'apparition de ces symptômes moteurs. Pour développer de nouveaux champs d'investigations sur ces maladies mendéliennes comme la MH, l'exploration de variations dans le reste du génome a été menée. En effet, ces variations peuvent modifier le phénotype de la MH (Holmans, Massey, & Jones, 2017) mais aussi modifier la pathogénèse de la maladie, ce qui explique les variations interindividuelles.

Des études d'associations pangénomiques (Genome-Wide Association Studies, GWAS) ont ainsi vu le jour afin d'étudier ces loci modifiés chez les patients porteurs de la mutation du gène de l'Htt. Le « Massachusetts HD Center Without Walls » (MaHDC) en collaboration avec d'autres groupes de recherche sur la MH, ont regroupé un grand nombre d'échantillons d'ADN provenant de patients atteints de la MH. Cette collaboration a permis de générer deux bases de données de GWAS. Le premier GWAS établit que 50 % des patients européens ont un ancêtre commun (Lee, et al., 2012). Dans cette même étude, l'analyse de l'haplotype du gène de l'Htt montre que les modifications génétiques communes autour du locus de l'Htt n'entraînent pas de modification majeure dans l'apparition de la maladie. La combinaison des deux GWAS révèle l'importance de deux polymorphismes nucléotidiques (SNP, Single Nucleotide Polymorphism) situés sur le chromosome 15 (Genetic Modifiers of Huntington's Disease Consortium, 2015). Un troisième GWAS basé à la fois sur les échantillons du MaHDC et à la fois sur ceux du réseau européen de la MH (EHDN, European Huntington's Disease Network) confirme ces résultats et montre également l'implication significative de SNP sur le chromosome 8 et l'implication probable de SNP sur les chromosomes 3, 5 et 21 (Genetic

Modifiers of Huntington's Disease Consortium, 2015). En effet, un locus du chromosome 15 peut soit accélérer de 1,4 ans soit ralentir de 6,1 ans l'apparition des symptômes moteurs selon le SNP impliqué.

La localisation du SNP ne renseigne pas avec certitude les gènes impliqués dans la modification de la pathogénèse. En revanche, certains gènes sont de bons candidats. Sur le chromosome 3, *MLH1* (mutL homolog 1, the human homolog of the *Escherichia coli* DNA mismatch repair gene) qui fait partie du système de réparation des mésappariements, est un très bon gène candidat (Lee, et al., 2017b). Un autre GWAS a auparavant montré que *Mlh1* est un modificateur génétique de la stabilité somatique de l'expansion de CAG chez les souris knockin 111, modèle murin de la MH. Le taux de protéine Mlh1 favoriserait l'instabilité allélique des cellules somatiques ce qui contribue à l'expansion du gène de l'htt. En conséquence, le processus pathogénique est accéléré (Pinto, et al., 2013). D'autres gènes, comme *Mlh3*, ont également été associés à une instabilité somatique du gène de l'htt chez les modèles rongeurs de la MH. En résumé, le système de réparation des mésappariements serait impliqué dans le processus pathogénique de la MH.

1.2.3 Facteurs environnementaux

La première étude clinique suggérant l'implication des facteurs environnementaux dans le développement de la MH était l'étude de parents vénézuéliens atteints de la MH (Wexler, et al., 2004). Dans cette étude, la variabilité de l'âge d'apparition inexplicée par le nombre de répétitions de CAG était attribuée à 40 % à d'autres facteurs génétiques et à 60 % à des facteurs environnementaux. Depuis, plusieurs études cliniques et précliniques ont été menées afin d'étudier les facteurs environnementaux tels que l'activité sportive et cognitive, le stress et le régime alimentaire sur l'apparition et la progression de la MH (pour revue (Mo, Hannan, & Renoir, 2015)). Les stimulations cognitives n'influenceraient pas l'âge d'apparition de la MH. En revanche, la qualité de vie des patients s'en trouve améliorée (López-Sendón, et al., 2011). L'activité physique améliore certains symptômes de la MH (Khalil, et al., 2013; Busse, et al., 2013; Kloos, Fritz, Kostyk, Young, & Kegelmeyer, 2013). La caféine pourrait contribuer à une manifestation plus précoce de la MH (Simonin, et al., 2013).

1.3 Anatomopathologie

Chez les patients atteints de la MH, le poids du cerveau est diminué de 25 à 30 % dans les stades les plus avancés de la maladie. En effet, la signature anatomopathologique de la maladie se caractérise par une perte massive des neurones striataux et la présence d'agrégats nucléaires et cytoplasmiques dus à l'accumulation anormale de fragments de l'htt porteurs de la mutation.

Atrophie striatale

Cette atrophie striatale est précoce et se manifeste selon un axe dorso-ventral et médio-latéral. En contrepartie, les cornes antérieures des ventricules latéraux se dilatent. Vonsattel et collaborateurs (1985) ont ainsi déterminé 5 stades de 0 à 4 selon le degré de sévérité en se basant à la fois sur des critères macroscopiques et microscopiques (Vonsattel, et al., 1985). Le niveau du grade corrèle fortement avec la sévérité des symptômes. Ainsi, le grade 0 est attribué aux patients qui ont été diagnostiqués porteurs de la mutation du gène de l'Htt mais pour lesquels aucune anomalie anatomopathologique n'est observable. Au grade 1, les changements anatomopathologiques s'observent uniquement à l'échelle microscopique et ont lieu dans les parties paraventriculaires et médiales du noyau caudé, dans la queue du caudé et dans la partie dorsale du putamen. 50 % des neurones ont déjà disparu dès le stade 1. Le stade 2 se caractérise par des changements macroscopiques et l'apparition d'une astroglie. L'astroglie et la perte neuronale s'accroissent par la suite puisque 95 % des neurones du caudé et du putamen ont disparu au grade 4.

Les études IRM montrent bien l'expansion du ventricule aux dépens de l'atrophie du striatum et ceci bien avant les premiers symptômes moteurs comme le montre la Figure 2 (Aylward, et al., 2004).

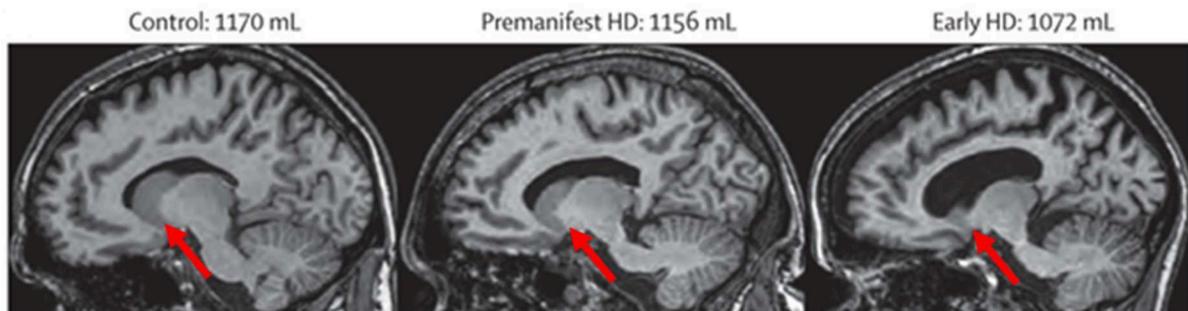


Figure 2. Imagerie IRM d'un individu sain, d'un patient atteint de la MH sans symptôme et d'un patient atteint de la MH dans les stades précoces. Le sujet précoce présente d'ores et déjà un élargissement des ventricules et un rétrécissement du caudé putamen. La flèche rouge indique le caudé putamen (Tabrizi, et al., 2009).

La Figure 2 montre également un amincissement du cortex qui apparaît très tôt dans la maladie et cet amincissement apparaît des régions postérieures aux régions antérieures du cortex en fonction de la progression de la maladie (Rosas, et al., 2002). En effet, les patients atteints de la MH présentent un rétrécissement significatif du cortex sensori-moteur, du cortex pariétal supérieur, du cortex occipital, des régions du cortex temporal supérieur notamment (Rosas, et al., 2008) (Figure 3). Les neurones pyramidaux de projection en provenance des couches corticales III, V et VI dégénèrent dans la MH en subissant au préalable une succession de changements morphologiques comme la réduction de la taille et du nombre d'épines dendritiques (Sapp, et al., 1997; Sieradzan & Mann, 2001).

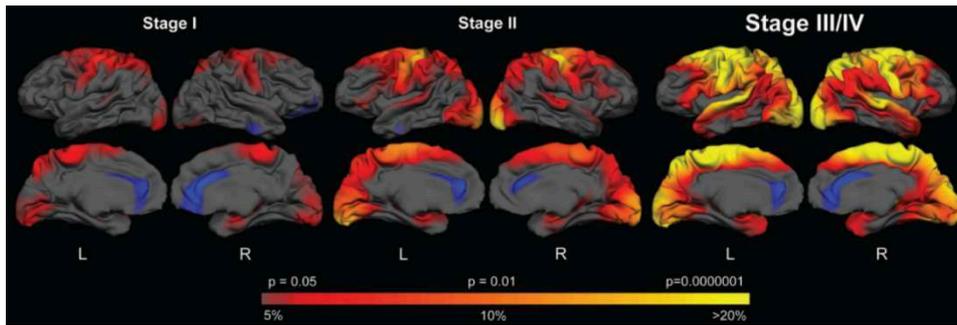


Figure 3. Modèle de progression de la maladie au niveau du cortex selon les différents stades de la maladie. La couleur jaune représente les régions significativement les plus amincies comparées aux individus contrôles (Rosas, et al., 2008).

Bien que l'atrophie striatale et l'atrophie corticale soient précoces et massives, d'autres structures du cerveau subissent également une atrophie et notamment le thalamus (Kassubek, Juengling, Ecker, & Landwehrmeyer, 2005), l'hippocampe (Spargo, Everall, & Lantos, 1993), le cervelet (Rüb, et al., 2013), l'hypothalamus et l'amygdale (Rosas, et al., 2003).

Agrégats de Httm

Le deuxième marqueur anatomopathologique de la MH est la présence d'agrégats de Httm à la fois au niveau cytoplasmique et au niveau nucléaire (Ross & Poirier, 2005; DiFiglia, et al., 1997; Trottier, et al., 1995a; Gutekunst, et al., 1999; Trottier, et al., 1995b) (Figure 4). Ces agrégats sont présents dans tous les types cellulaires (Shin, et al., 2005; Jansen, et al., 2017). En revanche, les neurones présentent beaucoup plus d'agrégats que les cellules gliales. Chez les patients atteints de la MH, l'activité des protéases est augmentée ce qui génère la production et l'accumulation de ces fragments N-terminal qui contiennent la séquence poly-Q. Dans le noyau, ils sont particulièrement toxiques (pour revue (Saudou & Humbert, 2016)).

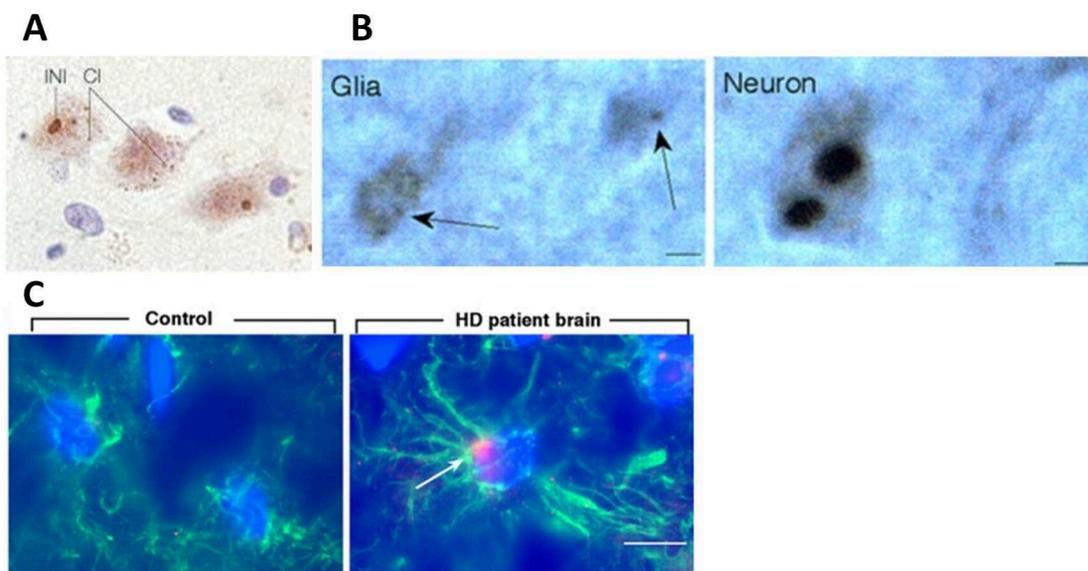


Figure 4. Agrégats intranucléaires et cytoplasmiques d'huntingtine mutée. (A) Inclusions intranucléaires (INI) et inclusions cytoplasmiques (CI) dans le cortex moteur d'un patient atteint de la MH reconnus par un anticorps 1C2 qui reconnaît l'expansion poly-Q (Ross & Poirier, 2005). (B) A gauche, des cellules gliales dans la substance blanche et à droite des neurones dans le cortex marqués par l'anticorps EM48 sur des coupes de cerveau d'un patient atteint de la MH. (C) Co-marquage de la substance blanche d'un cerveau d'un individu contrôle et d'un patient atteint de la MH avec un anticorps anti-Htt (EM48) et d'un anticorps anti-GFAP. La flèche indique l'agrégat de Httm dans le noyau (en bleu) d'un astrocyte qui présente un marquage GFAP (Shin, et al., 2005).

1.3.1 Le striatum dans la MH

Le striatum est une région sous-corticale faisant partie des ganglions de la base, noyaux impliqués notamment dans les mouvements volontaires et la mémoire procédurale. Les ganglions de la base sont un ensemble de noyaux constitués du striatum, du pallidum et du noyau sous-thalamique (Figure 5). Bien que la substance noire ne fasse pas partie des ganglions de la base, ses nombreuses connections avec ces noyaux la rendent fonctionnellement associées. Chez les primates, le striatum est composé du caudé et du putamen (Figure 5).

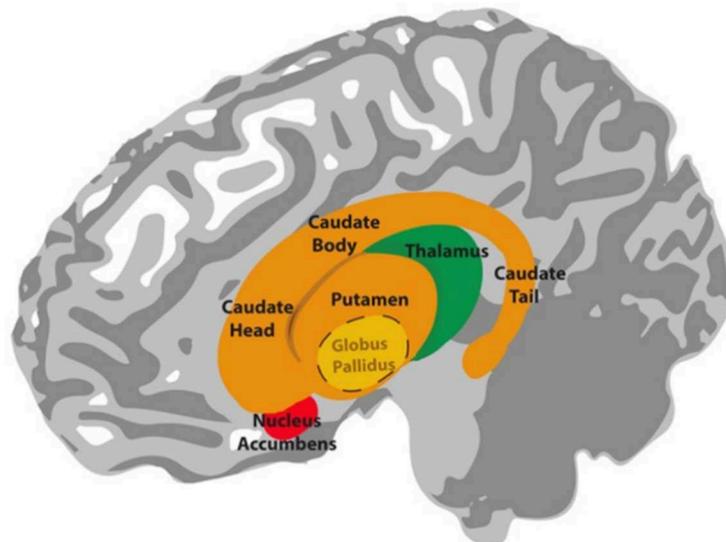


Figure 5. Représentation des ganglions de la base chez l'Homme. Le Globus pallidus est représenté en pointillés car il est situé de manière médiane par rapport au putamen et ne peut donc pas être vu dans cet angle (Lim, Fiez, & Holt, 2014).

1.3.1.1 Vulnérabilité du striatum

L'atrophie du striatum est très précoce dans la pathogénèse de la MH. Néanmoins, les neurones du striatum ont une vulnérabilité différentielle face à la toxicité de la huntingtine mutée (Httm) (Ferrante, et al., 1997). 90 à 95 % du striatum est composé de neurones épineux de taille moyenne (MSN, medium-sized spiny neurons). Les MSN sont des neurones GABAergiques (GABA, acide γ -amino butyrique) c'est-à-dire que leur neurotransmetteur principal est le GABA, un neurotransmetteur inhibiteur. Ces MSN GABAergiques sont les neurones les plus vulnérables du striatum. Parmi les MSN, deux sous-populations existent. Les MSN qui expriment l'enképhaline et les

pallidus *pars interna* (GPi) (voie directe en rouge sur la Figure 6). Les MSNs étant GABAergiques, inhibent donc les neurones de la SNpr qui sont eux aussi GABAergiques et qui ne peuvent donc plus exercer leur inhibition sur les neurones thalamiques glutamatergiques. Ces derniers projettent à leur tour sur le cortex. Cette voie directe conduit donc à l'activation du mouvement.

Inversement, l'activation des MSN qui projettent indirectement sur la SNpr par le globus pallidus *pars externa* (GPe) et le noyau sous-thalamique (STN), inhibe les neurones GABAergiques du GPe. Les neurones glutamatergiques du noyau sous-thalamique s'en trouvent désinhibés et activent donc les neurones GABAergiques de la SNpr qui projettent au thalamus pour l'inhiber (voie indirecte en bleue sur la Figure 6).

Comme expliqué dans le chapitre « 1.3.1.1 Vulnérabilité du striatum », deux sous-populations de MSN existent et ont une vulnérabilité différentielle à la toxicité de l'Httm : les MSN exprimant les récepteurs dopaminergiques D1 qui font partie de la voie directe et les MSN exprimant les récepteurs dopaminergiques D2 qui participent à la voie indirecte. Ces deux récepteurs dopaminergiques sont associés à des voies de signalisation intracellulaires différentes ce qui explique une différence de réponses biochimiques à l'activation des récepteurs dopaminergiques. Dans la MH, la voie indirecte dégénère en premier ce qui corrèle avec premièrement la dégénérescence des MSN exprimant les D2R puis des MSN exprimant les D1R (Figure 7). De plus, l'affaiblissement de la voie indirecte associée au rôle activateur de la voie directe explique les mouvements involontaires chez les patients au stade précoce de la maladie. Dans les stades plus tardifs, les patients ont du mal à initier les mouvements à cause du dysfonctionnement de la voie directe dans un second temps.

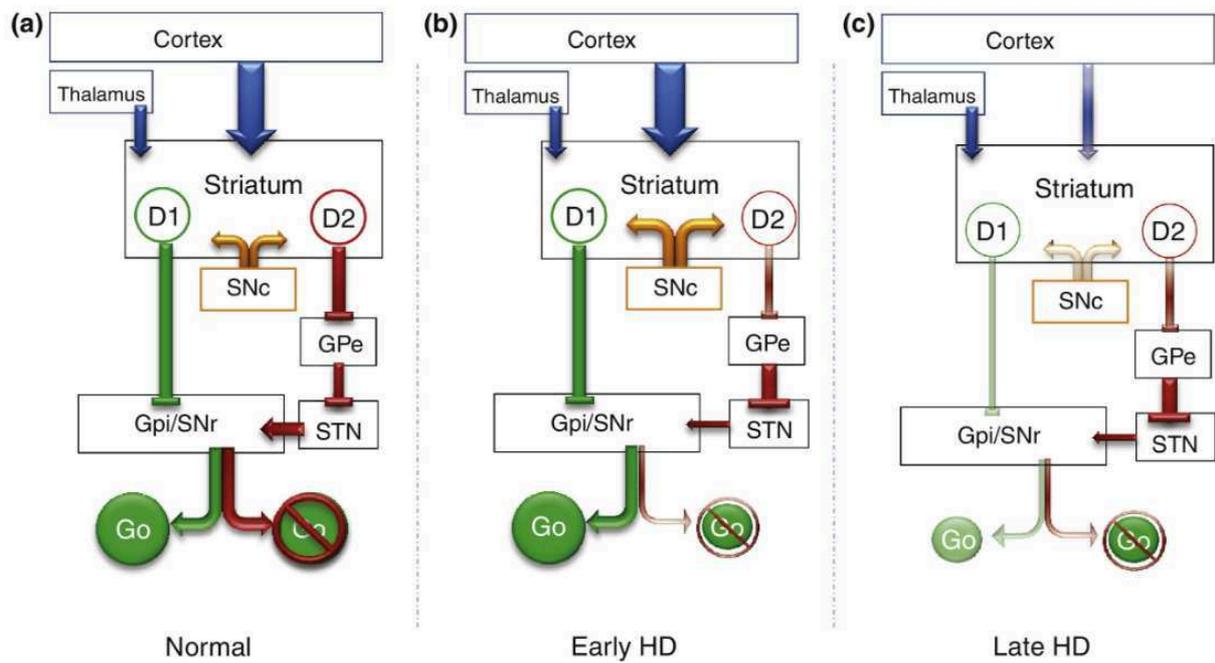


Figure 7. Circuit des ganglions de la base perturbé au cours de la maladie de Huntington. (a) Circuit des ganglions de la base en condition physiologique. (b) Dysfonctionnement des ganglions de la base dans les stades précoces de la MH. (c) Perturbation globale du circuit des ganglions de la base dans les stades tardifs de la MH. La voie directe est représentée par des connecteurs verts et la voie indirecte par des connecteurs rouges. Les voies excitatrices sont représentées par des flèches et les voies inhibitrices par des traits perpendiculaires. SNC : substance noire *pars compacta* ; SNr : substance noire *pars reticulata* ; GPe/i : globus pallidus externe/interne ; STN : noyau sous-thalamique (Sepers & Raymond, 2014).

1.3.2 L'hippocampe dans la MH

L'hippocampe est le lieu de l'encodage, de la consolidation et de la récupération de l'information. Cette région est également impliquée dans la régulation des émotions, de la peur, de l'anxiété et du stress. L'hippocampe est une structure hautement organisée et est composé de trois régions distinctes : le gyrus denté (composé des couches moléculaire, granulaire et polymorphique), l'hippocampe proprement dit (le *cornu ammonis* composé du CA1, CA2, CA3 et CA4) et le subiculum (Figure 8 A-B).

Cette architecture organisée de l'hippocampe a laissé émerger le concept d'une organisation et d'une spécialisation régionale des fonctions hippocampiques. Pour assurer ses fonctions dans la mémoire, l'hippocampe est la structure centrale d'un vaste réseau constitué des aires d'association néocorticale (aires temporale, frontale et pariétale), le lobe temporal médial, les aires parahippocampales et les noyaux sous-corticaux (Figure 8 C). L'hippocampe reçoit ainsi des afférences des aires médiales et temporales via le cortex entorhinal notamment (Figure 8 B, C) (Bartsch & Wulff, 2015). En effet, les neurones de projection de la couche II du cortex entorhinal projettent sur les cellules granulaires du gyrus denté par la voie perforante. Puis s'organisent des connexions unidirectionnelles excitatrices à l'intérieur même de l'hippocampe appelées la voie trisynaptique (Figure 8 B). Les axones des neurones granulaires, appelées les fibres moussues projettent à leur tour sur les neurones pyramidaux du CA3. Ces derniers projettent ensuite des axones appelés les collatérales de Schaffer sur l'aire du CA1. Les neurones pyramidaux du CA1 qui sont des efférents majeurs, projettent sur le subiculum qui projette en retour sur le cortex entorhinal. Par ailleurs, les neurones de la couche III du cortex entorhinal projettent directement sur les neurones du CA1 via la voie perforante du CA1. Cette voie synaptique est le circuit principal impliqué dans le traitement de l'information dans l'hippocampe ce qui en fait une voie clé pour l'apprentissage et la mémorisation.

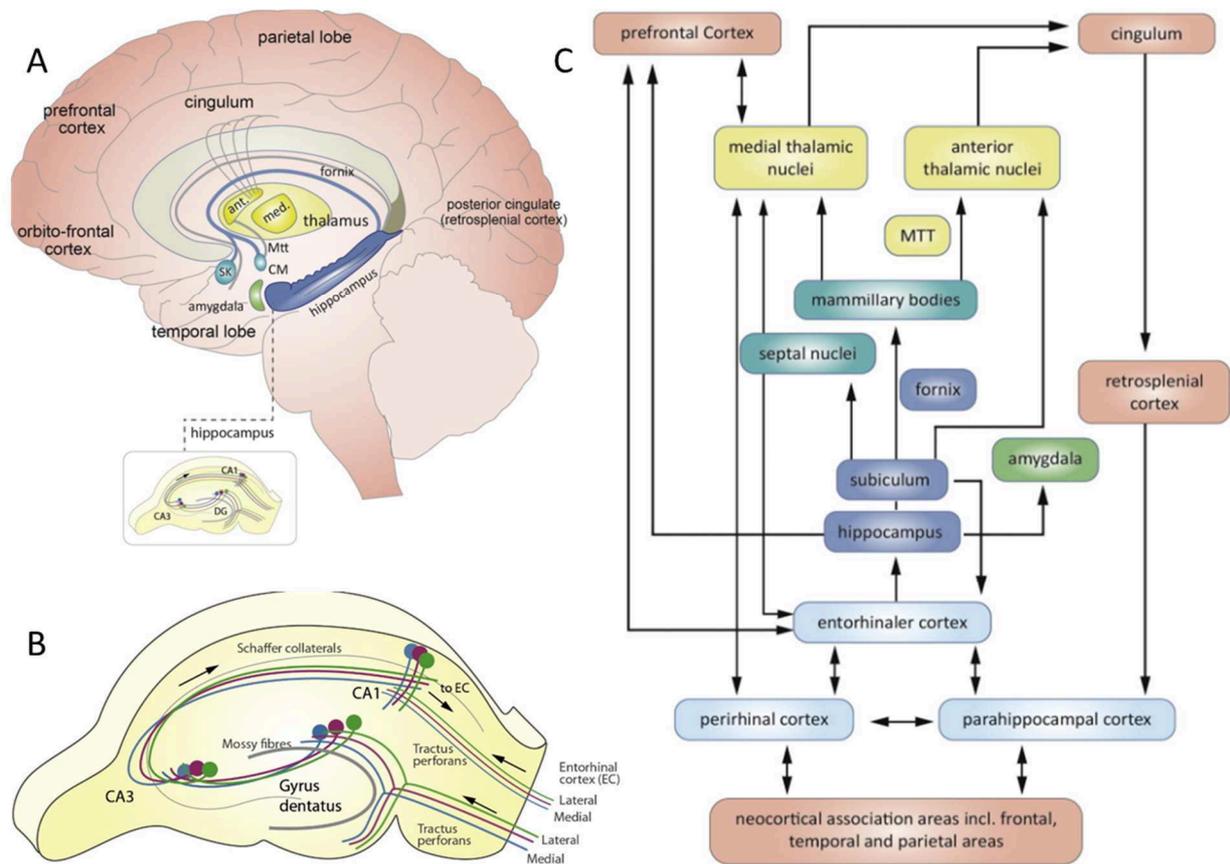


Figure 8. L'hippocampe et ses interactions avec les autres régions impliquées dans la mémoire. (A) L'hippocampe est représenté par rapport aux autres régions du cerveau. (B) Schématisation de la voie trisynaptique. (C) Représentation des connexions entre les différentes structures clés de l'apprentissage et de la mémoire. (Bartsch & Wulff, 2015).

L'hippocampe est également un exemple classique de neuroplasticité puisque plusieurs paradigmes de plasticité comme la potentialisation à long terme (LTP, long-term potentiation), la dépression à long terme (LTD, long-term depression), le potentiel postsynaptique excitateur (PPSE) et la plasticité fonction du temps d'occurrence des impulsions (STDP, spike-timing-dependent plasticity) sont des événements cellulaires qui corrént avec les processus d'apprentissage et de mémorisation. Au niveau moléculaire, la neuroplasticité est modulée par l'augmentation d'expression de gènes de plasticité comme BDNF (Brain-derived neurotrophic factor), CaMKII (Protéine kinase Ca²⁺/calmoduline-dépendante II), CREB (cAMP Response Element-binding protein) et l'expression de récepteurs de surface glutamatergiques de type AMPA et NMDA (Bartsch & Wulff, 2015). Particulièrement les récepteurs NMDA sont des médiateurs essentiels de la transmission synaptique et de la plasticité. Ils sont des inducteurs clés de la LTP au niveau des synapses. En conséquence, ils sont capables de convertir des changements spécifiques de l'activité neuronale en changement à long terme de la structure et de la fonction synaptique (Paoletti, Bellone, & Zhou, 2013). De même, les récepteurs AMPA sont les principaux acteurs des neurotransmissions excitatrices rapides. Ainsi, le nombre de récepteurs présents à la synapse, leur rétention et leur recyclage mais aussi la combinaison

de sous-unités spécifiques qui les composent sont des éléments importants de la plasticité synaptique (Henley & Wilkinson, 2016). La production de nouvelles cellules dans l'hippocampe adulte peut également jouer un rôle important dans les mécanismes de plasticité (Ming & Song, 2011). Ainsi, la zone sous-granulaire dans le gyrus denté de l'hippocampe est une région de neurogenèse adulte (Figure 9). Les neurones nouvellement nés présentent une hyperexcitabilité et une plasticité synaptique renforcée pendant des stades de développement spécifique (pour revue, (Ming & Song, 2011)).

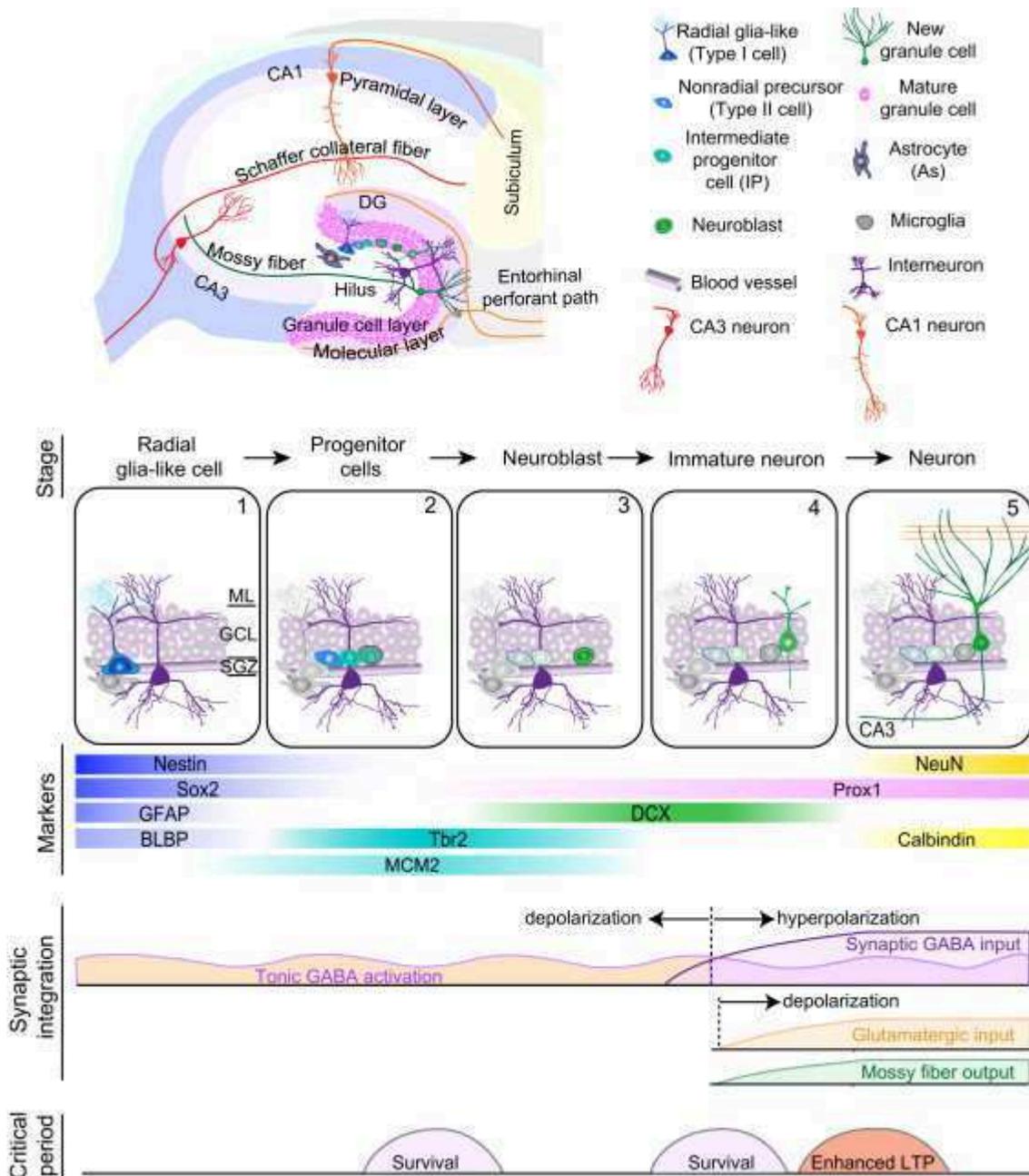


Figure 9. Neurogenèse hippocampale adulte en 5 étapes. (1) Activation de la cellule « gliale-like » radiale quiescente dans la zone sous-granulaire (SGZ); (2) prolifération de précurseurs non radiaux et de progéniteurs intermédiaires; (3) génération de neuroblastes; (4) intégration de neurones immatures; (5)

maturation des cellules granulaires nouvellement nées. Les marqueurs décrits sont des marqueurs dont l'expression est spécifique des différentes étapes. Le processus séquentiel de l'intégration synaptique est également décrit mais aussi les périodes critiques régulant la survie et la plasticité. ML : couche moléculaire ; GCL : couche granulaire ; SGZ : zone sous-granulaire ; GFAP : protéine acide fibrillaire gliale ; BLBP : brain lipid-binding protein ; DCX : doublecortin ; NeuN : marqueur neuronal ; LTP : potentialisation à long terme (**Ming & Song, 2011**).

En revanche, cette grande neuroplasticité s'accompagne d'une grande vulnérabilité hippocampale dans des conditions délétères comme dans la neuroinflammation et dans la neurodégénérescence. Bien que l'axe cortico-striatal soit le plus atteint, l'hippocampe connaît aussi des dysfonctionnements dans la MH. Les études anatomo-pathologiques sont peu nombreuses sur l'hippocampe. L'atrophie hippocampale (de la Monte, Vonsattel, & Richardson, 1988) serait plus tardive que l'atrophie striatale qui apparaît 10 à 15 ans avant les premiers symptômes moteurs (Tabrizi, et al., 2009; Tabrizi, et al., 2012). En revanche, des études morphométriques basées sur des images d'IRM ont montré que la dégénérescence n'est pas seulement restreinte à la région cortico-striatale mais affecte également d'autres régions comme l'hippocampe chez les patients dès les stades précoces de la maladie (Rosas, et al., 2003). Une autre étude montre que cette atrophie de l'hippocampe est limitée à la région CA1 (Spargo, Everall, & Lantos, 1993). Les études anatomopathologiques sur l'hippocampe sont plus nombreuses dans les modèles de souris de la MH (voir Chapitre 1.5.4 « Modélisation des autres manifestations comportementales et des spécificités anatomopathologiques »).

1.4 Physiopathologie

Bien que l'étiologie soit différente, un certain nombre de dysfonctionnements sont également observables à la fois dans la MH et dans d'autres maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson qui sont également des maladies qui se manifestent tardivement dans la vie de l'individu et qui se caractérisent aussi par une perte neuronale (pour revue (Ahmad, et al., 2017)). Parmi ces dysfonctionnements, les dysfonctions mitochondriaux, le stress oxydatif et la mort neuronale sont retrouvés dans la MH. La physiopathologie de la MH est, elle, associée à l'expansion du nombre de CAG dans le gène de l'Htt.

1.4.1 L'huntingtine : le gène, la protéine et son expression

Le gène *Htt* contient 67 exons et produit 2 transcrits d'ARNm qui se différencient par une séquence 3'UTR supplémentaire dans l'un des deux transcrits. Ce dernier serait plus enrichi dans le cerveau. Récemment, deux équipes ont montré l'existence d'épissage alternatif des transcrits de l'*Htt* conduisant à la synthèse d'isoformes de l'Htt (Hughes, et al., 2014; Ruzo, et al., 2015).

En condition pathologique, des anomalies de transcription de l'Htt surviennent (pour revue, (Neueder & Bates, 2018)). Ainsi, un épissage anormal de l'intron 1 de l'Htt se produit conduisant à un

cours ARNm polyadénylé qui est traduit en une protéine appelée exon 1 de l'htt (Sathasivam, et al., 2013; Gipson, Neueder, Wexler, Bates, & Housman, 2013). Le fragment protéique correspondant à l'exon 1 de l'htt s'est révélé être très pathogénique. Un transcrit antisens de l'htt a aussi été mis en évidence. Celui-ci aurait certaines propriétés de régulation de l'expression de l'htt (Chung, Rudnicki, Yu, & Margolis, 2011). De plus, comme dans d'autres maladies à polyglutamine, des ARNm sens et antisens avec décalage du cadre de lecture et qui ne sont pas ATG dépendant peuvent être produits. En conséquence, des protéines d'expansion homopolymériques de type polyAla, polySer, polyLeu et polyCys appelées RAN (repeat-associated non ATG), sont traduites, s'accumulent et s'agrègent majoritairement dans le cerveau produisant une mort neuronale et l'activation microgliale notamment (Bañez-Coronel, et al., 2015).

Le gène *htt* code pour une protéine du même nom de 348 kDa environ selon le nombre de résidus glutamine. La partie N-terminale de cette protéine a été largement étudiée puisque la mutation responsable de la MH se localise dans cette partie. En effet, la queue poly-Q extensible se localise dans cette région N-terminale juste après les 17 premiers acides aminés et une région riche en résidus proline. Ces 17 résidus aminoacides fonctionnent comme une séquence d'exportation nucléaire et peuvent faire l'objet de modifications post-traductionnelles ce qui peut influencer la localisation cellulaire de l'htt et sa clairance (pour revue, (Saudou & Humbert, 2016)). La région riche en résidus proline est une région qui permet des interactions avec d'autres protéines partenaires comme les protéines riches en tryptophane et les protéines avec des domaines SH3 (SRC Homology domain) comme Grb2, RasGAP (Liu, Deth, & Devys, 1997) et CIP4 (Cdc42-interacting protein 4) (Holbert, et al., 2003).

La protéine Htt peut elle aussi donner des variants par protéolyse de la protéine entière. La Figure 10 montre ainsi les domaines PEST (riches en résidus proline, glutamique, aspartique, serine et thréonine) qui sont les sites de clivage par les protéases (pour revue, (Saudou & Humbert, 2016)).

l'htt notamment lors de différents stimulus de mort cellulaire (Rigamonti, et al., 2001; Leavitt, et al., 2006). Les conséquences des variations normales du nombre de répétitions de CAG sur les fonctions de l'htt restent mal comprises. Néanmoins, la délétion de la queue polyQ favorise l'autophagie et augmente la longévité des souris (Zheng, et al., 2010).

Le mode de transmission autosomique dominante de la MH démontre qu'un seul allèle muté est suffisant pour déclencher la maladie. En résumé, l'expansion poly-Q présent sur la protéine huntingtine mutée (Httm) est responsable d'un gain de fonctions toxiques pour les cellules. En effet, cette protéine Httm interagit et/ou séquestre anormalement certains facteurs qui sont importants pour certaines grandes boucles de régulation cellulaire. Cependant, de plus en plus d'études montrent que la perte de fonctions de l'htt joue un rôle majeur dans le développement de la pathologie. En effet, l'hétérozygotie de l'htt entraîne une réduction de la concentration d'htt normale dans la cellule. Dragatsis et collaborateurs (2000) ont montré que la réduction de la quantité d'htt normale dans le cerveau se traduit par un phénotype de neurodégénérescence neuronale.

En résumé, la pathogénèse de la MH est à la fois le résultat de gain de nouvelles fonctions toxiques de l'Httm et le résultat de la perte de certaines fonctions de l'htt normale. L'expansion polyQ peut soit renforcer les interactions protéiques ou même en créer de nouvelles soit diminuer ou même perdre certaines interactions protéiques. Le réseau de partenaires protéiques de l'Httm est donc différent de celui de l'htt (Kaltenbach, et al., 2007; Tourette, et al., 2014; Shirasaki, et al., 2012). L'intéactome de l'htt est composé d'un certain nombre de protéines impliquées dans la transcription, la maintenance de l'intégrité de l'ADN, la régulation du cycle cellulaire, le transport des protéines, le métabolisme énergétique, la signalisation cellulaire et l'homéostasie protéique (Shirasaki, et al., 2012) (pour revue, (Labbadia & Morimoto, 2013)). En conséquence, différents processus cellulaires sont perturbés par ce changement d'intéactome : une dérégulation transcriptionnelle, un dysfonctionnement synaptique, des déficits mitochondriaux, une perturbation du transport cellulaire et une altération de l'autophagie qui se matérialise par l'apparition d'agrégats notamment. Ces processus cellulaires sont des mécanismes pathogéniques cellulaires clés dans la MH qui sont développés ci-dessous (pour revue, (Zuccato, Valenza, & Cattaneo, 2010)).

1.4.3 Dérégulation transcriptionnelle

De grands changements transcriptionnels ont été observés dans le cerveau des patients atteints de la MH (Hodges, et al., 2006). Ces changements transcriptionnels ne sont pas attribuables seulement à une perte neuronale mais bien à une réorganisation transcriptionnelle chez les patients atteints de la MH (pour revue, (Cha, 2007)). Ces modifications transcriptionnelles ont aussi été observées dans des modèles rongeurs de la MH : dans les modèles transgéniques R6/2 et N171-82Q

(Luthi-Carter, et al., 2000; Luthi-Carter, et al., 2002; Zucker, et al., 2005; Roze, et al., 2008) mais aussi dans les modèles knockin où l'atteinte transcriptionnelle est proportionnelle au nombre de CAG (Langfelder, et al., 2016). Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer comment l'Httm est responsable des dysfonctionnements transcriptionnels (pour revue, (Seredenina & Luthi-Carter, 2012; Mounné, Betuing, & Caboche, 2013)). Parmi ces mécanismes, la séquestration des facteurs de transcription et des cofacteurs dans les agrégats d'Httm ou l'interaction directe de l'Httm avec des régulateurs de la transcription sont des mécanismes responsables de la dérégulation de l'expression des gènes observés dans la MH.

1.4.3.1 Interaction de l'Htt avec des régulateurs transcriptionnels

L'Htt intervient à différents niveaux de régulation de la transcription. Premièrement, l'Htt possède une queue poly-Q en N-terminal qui est un motif type des facteurs de transcription et qui permet l'interaction entre les facteurs de transcription et les régulateurs transcriptionnels (Benn, et al., 2008). Parmi les nombreux partenaires moléculaires de l'Htt, l'Htt interagit avec la protéine CBP (CREB-binding protein), un co-activateur du facteur de transcription CREB (cAMP Response Element Binding Protein) qui est un des régulateurs principaux de l'expression des gènes par son activité acétyltransférase (Steffan, et al., 2000). Or, l'expansion poly-Q de l'Httm dénature l'affinité d'interaction avec ses partenaires moléculaires. Ainsi, l'Httm par son domaine poly-Q et son domaine poly-P interagit avec CBP, séquestrant ainsi CBP dans le cytoplasme au niveau des agrégats d'Htt (Nucifora, et al., 2001; Steffan, et al., 2001). CBP ne peut donc plus exercer son rôle de régulation de la transcription. La séquestration de facteurs de transcription tels que CBP dans les agrégats limite l'accès de ces derniers au promoteur des gènes cibles compromettant ainsi leur activité régulatrice sur la transcription. Les changements d'expression d'autres facteurs de transcription comme Sp1 et TBP (TATA box binding protein) et/ou de co-activateur comme PGC-1 α contribueraient également à la dérégulation des gènes dans la MH (pour revue, (Cha, 2007; Seredenina & Luthi-Carter, 2012)).

CA150, coactivateur de la transcription, interagit aussi préférentiellement avec l'Httm (Holbert, et al., 2001). L'expression de CA150 est largement augmentée dans le cerveau des patients mais CA150 est retrouvée dans les agrégats. Ainsi, l'Httm entraîne une dysfonction de CA150 dans les neurones striataux mais la surexpression de CA150 retarderait la mort cellulaire induite par la toxicité de l'Httm (Arango, et al., 2006).

L'Htt interagit aussi à la fois avec des activateurs de la transcription mais aussi avec des répresseurs de la transcription. Parmi eux, la protéine REST (RE1-silencing transcription factor) est un partenaire important de l'Htt car REST est un répresseur de BDNF (Zuccato, et al., 2003). En condition physiologique, l'Htt se lie à REST et la séquestre dans le cytoplasme. En conséquence, REST ne peut

pas interagir avec la séquence RE1/NRSE (repressor element 1/ neuron-restrictive silencer element) située sur plusieurs gènes neuronaux dont le gène *BDNF*. A l'inverse, l'expansion poly-Q diminue l'affinité de l'htt pour REST qui peut donc se relocaliser dans le noyau (Zuccato, et al., 2003; Zuccato, et al., 2007). REST peut alors jouer son rôle inhibiteur de la transcription et notamment il peut inhiber la transcription de *BDNF*.

Bien que l'htt soit principalement localisée dans le cytoplasme, l'htt est capable d'interagir avec certains récepteurs nucléaires parmi eux LXR α et LXR β (Futter, et al., 2009). Les récepteurs LXRs (Liver X receptors) sont des régulateurs du métabolisme du cholestérol et sont donc très importants pour le fonctionnement du cerveau. En effet, les souris déficientes en récepteurs LXRs montrent des dérégulations dans le métabolisme du cholestérol et affichent des caractéristiques similaires aux maladies neurodégénératives (Wang, et al., 2002). Or, Futter et collaborateurs (2009) ont montré que l'htt n'interagissait que très faiblement avec les récepteurs LXRs.

L'htt participe également à la régulation de la transcription par le remodelage de la chromatine. En effet, l'htt interagit avec 2 composants du complexe PRC2 (polycomb repressive complex 2) : EZH2 (enhancer of zeste 2) et SUZ12 (supressor of zeste 12) ce qui favorise l'activité de méthylation d'histone de type H3K27me3 (Seong, et al., 2010). Le remodelage de la chromatine est l'un des mécanismes qui provoquent des changements réversibles et héréditaires dans l'expression des gènes sans en changer la séquence d'ADN. Cet ensemble de mécanismes contribue à l'épigénétique. Cet aspect est développé dans le chapitre suivant 1.4.4 « La piste épigénétique de la dérégulation transcriptionnelle ».

1.4.3.2 Dérégulation de la transcription à grande échelle due au stress cellulaire

Un certain nombre d'études ont été menées sur le cerveau des patients atteints de la MH et sur des modèles de la maladie pour déterminer le profil d'expression génique caractéristique de la MH et son évolution au cours du développement de la pathogénèse (Hodges, et al., 2006; Kuhn, et al., 2007; Langfelder, et al., 2016; Luthi-Carter, et al., 2000). La combinaison des analyses transcriptomiques dans les modèles murins et chez les patients atteints de la MH a révélé le caractère progressif et précoce du processus de dérégulation de la transcription (Kuhn, et al., 2007). Ainsi, les changements transcriptionnels se révèlent être en corrélation avec les déficits comportementaux observables dans le modèle R6/1 (Hodges, et al., 2008).

Hodges et collaborateurs (2006) ont montré que certaines régions cérébrales présentaient un profil d'expression différentielle comparé aux individus contrôles, en corrélation avec l'implication de ces régions dans la maladie. En particulier, le transcriptome du striatum a été étudié autant chez les

patients que dans les modèles de la MH (Desplats, et al., 2006; Luthi-Carter, et al., 2000). Parmi les changements transcriptionnels majeurs, certaines dérégulations concernent certains réseaux de gènes impliqués dans des voies de signalisation importantes pour la fonction des neurones du striatum (Luthi-Carter, et al., 2000). Précisément, les gènes dont l'expression est diminuée dans le striatum présentent une signature neuronale car ces gènes sont impliqués dans l'identité et la fonction neuronale des neurones du striatum (Kuhn, et al., 2007; Achour, et al., 2015; Hervás-Corpión, et al., 2018; Hodges, et al., 2008). Ces données ont été confirmées par une étude récente de transcriptomique et de protéomique menée dans différentes souris knockin comportant un nombre de répétitions variable. Les signatures transcriptionnelles dépendantes du nombre de CAG sont majoritairement retrouvées dans le striatum et un peu moins dans le cortex (13 modules contre 5) (Langfelder, et al., 2016). Les modules striataux les plus impactés par le nombre de CAG sont des groupes de gènes impliqués dans l'identité des neurones épineux de taille moyenne, dans la dérégulation de la signalisation de l'AMPC, dans la mort cellulaire et des gènes de protocadhérines. Fait à souligner, certaines signatures transcriptionnelles très dépendantes du nombre de CAG sont retrouvées également chez les patients dans cette étude. L'altération de l'expression de certains gènes dépendant du nombre de CAG et certains modules ont été validés au niveau protéomique. Cette étude fournit une caractérisation transcriptomique et protéomique à large échelle des effets moléculaires de l'expansion pathogène de CAG dans les modèles murins.

Ces changements transcriptionnels ne concernent pas seulement les ARNm mais aussi les microARNs (miARNs) (Langfelder, et al., 2018). Les miARNs appartiennent à une classe d'ARN non codants qui sont des facteurs de régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes. En particulier, les miARNs jouent un rôle important dans le développement neuronal et dans la différenciation neuronale en contrôlant l'identité de sous-populations neuronales et en établissant aussi des structures synaptiques (pour revue, (Schratt, 2009; Woldemichael & Mansuy, 2016)). Leur rôle dans le maintien des fonctions des neurones matures a également été démontré. L'établissement du profil transcriptionnel de cerveaux humains atteints de la MH, de modèles *in vivo* et de modèles *in vitro* démontre des changements importants dans l'expression des ARN non codants (pour revue, (Seredenina & Luthi-Carter, 2012)). Également, les ARNe (ARN *enhancer*) transcrits à partir d'*enhancer* actif, sont dérégulés dans le striatum des souris R6/1. Or, ces ARNe qui sont diminués, sont associés à des gènes impliqués dans l'identité des neurones striataux qui sont eux même diminués. La dérégulation de la transcription de ces ARNe dans le striatum entraîne ainsi une altération de la transcription des gènes impliqués dans l'identité des neurones striataux (Le Gras, et al., 2017).

Bien que l'Httm soit responsable de la dérégulation de la transcription par un effet direct en interagissant avec les facteurs de transcription (comme vu précédemment dans le chapitre 1.4.3.1

Interaction de l'htt avec des régulateurs transcriptionnels), l'htt peut également agir indirectement sur la transcription à la suite de compensation cellulaire résultant du stress cellulaire engendré (pour revue, (Francelle, Galvan, & Brouillet, 2014)). Parmi ces changements transcriptionnels, certains facteurs peuvent avoir un rôle de survie cellulaire en aidant les neurones à compenser le stress protéotoxique alors que d'autres peuvent augmenter la sensibilité des neurones striataux à l'htt. Ainsi, le facteur de réponse au stress FOXO3 (Forkhead box O 3) est un facteur neuroprotecteur dans les modèles de la MH (Farina, et al., 2017) (pour revue, (Neri, 2012)). Déterminer les changements transcriptionnels qui provient soit d'un effet direct soit d'un effet indirect se révèle être difficile et a récemment pu être effectué montrant ainsi que les changements transcriptionnels intervenant dans la biologie de la synapse et la signalisation calcique sont des changements compensatoires notamment (Al-Ramahi, et al., 2018).

1.4.3.3 Conséquences fonctionnelles de l'expression différentielle des gènes

Ces changements transcriptionnels ne résultent pas seulement de l'expansion de la queue poly-Q de l'htt mais des phénomènes compensatoires peuvent avoir lieu. Alors que les premières hypothèses sur les changements transcriptionnels reposaient sur l'idée que la majorité de ces changements aboutirait à des effets pathologiques, des analyses systématiques ont été menées sur un certain nombre de gènes pour déterminer leur impact fonctionnel. Un certain nombre de modifications de l'expression génique se révèlent être fonctionnellement sans grand impact, d'autres contribuent largement au processus pathologique, alors que la modification d'expression d'un certain nombre de gènes sont compensatoires afin de contrecarrer la toxicité de l'htt.

Une preuve de l'existence de phénomènes compensatoires est l'expression de l'htt (pour revue, (Francelle, Galvan, & Brouillet, 2014)). Bien que l'htt soit exprimée dans le cerveau des patients depuis leur naissance, les symptômes et les processus de dégénérescence apparaissent généralement à l'âge adulte. De même, l'expression de l'htt dans les neurones du striatum se révèle être plus neurotoxique dans les animaux âgés que dans les animaux jeunes (Diguet, et al., 2009). Cette étude montre la capacité des neurones à neutraliser partiellement le stress cellulaire induit par l'htt mais ce mécanisme de plasticité perdrait en efficacité au cours du vieillissement.

1.4.4 La piste épigénétique de la dérégulation transcriptionnelle

En 1942, Waddington introduit le concept d'épigénotype comme l'ensemble des événements biologiques qui ne s'expliquent pas par les principes de génétique. Globalement, l'épigénétique est l'ensemble des mécanismes qui provoquent des changements réversibles et héréditaires dans l'expression des gènes sans en changer la séquence d'ADN. Pour exemple, l'épigénétique explique les

différences d'expression des gènes entre une cellule du cerveau et une cellule de foie. Ces mécanismes de régulations sont la méthylation de l'ADN, les modifications post-traductionnelles des histones, le remodelage de la chromatine, les variants d'histones et les ARNs longs non-codants (pour revue, (Hwang, Aromolaran, & Zukin, 2017; Berson, Nativio, Berger, & Bonini, 2018; Lardenoije, et al., 2015)). Ces mécanismes sont explicités dans l'annexe 1 « Rappel de notions d'épigénétique ».

L'épigénétique est ainsi étroitement liée à la régulation de la structure de la chromatine et donc à l'accès de l'ADN à différents facteurs et notamment les facteurs de transcription (pour revue, (Tsompana & Buck, 2014)). En effet, l'ADN génomique de chaque cellule humaine mesurant environ 2 m, celui-ci doit être compacté pour entrer dans le noyau des cellules. 147 pb d'ADN sont ainsi enroulés autour de nucléosomes qui sont les unités de base de la chromatine. Les nucléosomes sont composés d'octamères d'histones : 2 copies de chaque histone H2A, H2B, H3, H4. Les mécanismes épigénétiques régulent ainsi plusieurs processus impliquant l'ADN et l'ARN comme la transcription, la réparation de l'ADN et la réplication de l'ADN grâce à la modulation de la chromatine.

Parmi les mécanismes de régulation épigénétique cités précédemment, les modifications des histones et la méthylation de l'ADN sont les deux mécanismes principaux influençant la structure de la chromatine. La modification des histones est de nature combinatoire, réversible et ciblée ce qui est à l'origine du code des histones (Jenuwein & Allis, 2001; Bannister & Kouzarides, 2011), influençant directement la transcription. Ainsi, l'acétylation des histones favorise le relâchement de la chromatine et donc l'activation de la transcription. Pour exemple, le motif H3K27ac (acétylation de l'histone 3 sur la lysine 27) est la marque des promoteurs et des *enhancers* des gènes actifs. Les conséquences de la méthylation des histones dépendent du résidu modifié : la méthylation H3K9 est associée à une répression alors que la méthylation H3K4 correspond à l'activation transcriptionnelle par exemple. De même, la triméthylation H3K4 est aussi associée aux promoteurs et aux *enhancers* des gènes actifs. Quant à la méthylation de l'ADN au niveau des résidus cytosines situés dans une séquence cytosine-guanine (CpG), elle est souvent associée à la répression génique particulièrement au niveau des promoteurs (Deaton & Bird, 2011).

Historiquement, l'épigénétique avait été étudiée dans le domaine du développement, en particulier dans la différenciation cellulaire et l'identité cellulaire. En effet, l'épigénome est le garant de l'identité cellulaire.

1.4.4.1 L'épigénétique dans les neurones : à l'origine de l'identité neuronale

L'idée d'un épigénome stable a été mise à mal avec l'accumulation d'études montrant les changements dynamiques et massifs qui se produisent lors de la régulation de l'activité cellulaire.

L'excitabilité neuronale est une propriété majeure des cellules neuronales en réponse à un facteur environnemental tel que l'apprentissage. A ce stimulus, les neurones passent réversiblement d'un état de repos à un état actif. En conséquence, la plasticité synaptique est modifiée ce qui permet aux neurones de s'adapter à ce stimulus par l'apprentissage et la mémorisation par exemple (pour revue, (Sultan & Day, 2011; Sweatt, 2016)). Les mécanismes d'épigénétique feraient partie des mécanismes impliqués dans cette transition (pour revue, (Korzus, 2010)). Comme explicité précédemment, la plasticité synaptique est centrale dans les processus de mémoire et d'apprentissage. Des changements dans les marqueurs épigénétiques corrèlent fortement avec la plasticité synaptique (pour revue, (Borrelli, Nestler, Allis, & Sassone-Corsi, 2008)). En effet, pendant les processus de mémoire et d'apprentissage, la chromatine subit de grands changements comme l'acétylation (Bousiges, et al., 2013; Mews, et al., 2017) et la méthylation de l'ADN (Halder, et al., 2016). Ces modifications épigénétiques ont une conséquence directe sur la transcription avec l'activation des gènes de plasticité cellulaire comme les gènes précoces (pour revue, (Minatohara, Akiyoshi, & Okuno, 2016)). L'acétylation des histones est la modification la plus étudiée et est associée la plasticité synaptique et la formation de la mémoire. La méthylation de l'ADN dans le cerveau est un médiateur essentiel de l'acquisition et la mémorisation des informations (Miller & Sweatt, 2007; Day & Sweatt, 2010).

Ainsi, les mécanismes épigénétiques contrôlent à la fois l'identité neuronale mais aussi l'activation neuronale et la plasticité cellulaire. La régulation épigénétique a lieu au niveau transcriptionnel mais aussi au niveau post-transcriptionnel.

1.4.4.2 Changements épigénétiques dans la MH

Plusieurs changements épigénétiques sont observables dans la MH au niveau de l'acétylation des histones (McFarland, et al., 2012) et de la méthylation de l'ADN notamment (pour revue, (Francelle, Lotz, Outeiro, Brouillet, & Merienne, 2017; Hervás-Corpión, et al., 2018)). Les gènes sous-exprimés dans le striatum des souris R6/1 sont associés à une diminution sélective de la marque H3K27ac qui est une marque des *enhancers* actifs, et de l'ARN polymérase II (Achour, et al., 2015). La présence de la marque H3K27ac associée à la présence de l'ARN polymérase II est une signature épigénétique caractéristique des *super-enhancers* striataux qui correspondent à un regroupement d'*enhancers* régulant l'activité neuronale, la plasticité neuronale et la transmission synaptique. Achour et collaborateurs (2005) montrent ainsi que la diminution sélective de l'activité de ces *super-enhancers* seraient la cause sous-jacente de la signature transcriptomique neuronale. De plus, la marque des promoteurs actifs, H3K4me3, est diminuée aussi au niveau de gènes dérégulés aussi bien dans les souris R6/2 (Vashishtha, et al., 2013) que dans le cortex des patients (Dong, et al., 2015).

De même, les niveaux de méthylation de l'ADN seraient perturbés chez les patients atteints de la MH (Horvath, et al., 2016). Horvath et collaborateurs (2016) ont utilisé le niveau de méthylation de l'ADN pour estimer l'âge épigénétique des cellules et concluraient ainsi à un vieillissement accéléré des neurones des patients. Aussi, l'inhibition d'ADN méthyltransférases protégerait les neurones contre la toxicité de l'Httm suggérant ainsi que la méthylation de l'ADN jouerait un rôle critique dans les dysfonctions neuronales causées par la toxicité de l'Httm (Pan, et al., 2016).

1.4.4.3 Mécanismes sous-jacents et leurs conséquences

Plusieurs mécanismes peuvent expliquer l'altération de la régulation de l'épigénétique dans la MH (pour revue, (Glajch & Sadri-Vakili, 2015; Francelle, Lotz, Outeiro, Brouillet, & Merienne, 2017)).

Comme expliqué dans le chapitre 1.4.3.1 « Interaction de l'Htt avec des régulateurs transcriptionnels », l'expansion de la queue poly-Q modifie l'affinité de l'Httm pour CBP qui est piégée dans les agrégats de Httm. CBP ne pouvant plus assurer son rôle d'acétylation, l'acétylation des histones est par conséquent altérée dans la MH.

De même, l'Htt interagit également avec deux éléments du complexe PRC2 (polycomb repressive complex 2) dans le noyau des cellules pour favoriser la triméthylation H3K27 (Seong, et al., 2010). De manière surprenante, l'expansion poly-Q accroît l'activité de PRC2 dans les modèles cellulaires. Néanmoins, l'Htt serait aussi impliquée dans le processus d'élimination de la marque H3K27me3. L'implication de l'Htt dans la régulation de H3K27me3 serait en fait dépendante de l'état de différenciation cellulaire (Biagioli, et al., 2015).

Les facteurs de transcription participent aussi au remodelage de la chromatine en recrutant les enzymes de modification des histones. Or, plusieurs facteurs de transcription comme REST sont dérégulés à cause des modifications d'interaction de ces facteurs de transcription avec l'Httm. REST est un facteur de remodelage épigénétique (Ballas, Grunseich, Lu, Speh, & Mandel, 2005) (pour revue, (Hwang, Aromolaran, & Zukin, 2017)). Dans la MH, son implication dans la dérégulation transcriptionnelle a déjà été démontrée mais également la dérégulation épigénétique causée par REST (Zuccato, et al., 2003; Zuccato, et al., 2007) a aussi été établie (Buckley, Johnson, Zuccato, Bithell, & Cattaneo, 2010).

1.4.5 Hypothèse de l'excitotoxicité

L'excitotoxicité est le processus par lequel un excès de glutamate associé à la dérégulation des concentrations de calcium intracellulaires entraîne une altération du métabolisme énergétique mitochondriale et la mort cellulaire (Sepers & Raymond, 2014) (Figure 11). L'hypothèse glutamatergique pour la MH a été soulevée dans les années 1980 où les travaux de Flint Beal ont

démonstré chez l'animal que l'injection intra-striatale d'un agoniste sélectif des récepteurs NMDA, le quinolinate, produisait une lésion du striatum, rappelant d'un point de vue histologique et neurochimique les atteintes observées chez les patients (Beal, et al., 1986). L'agoniste quinolinate est naturellement présent dans le cerveau puisque c'est un intermédiaire métabolique de la voie du tryptophane. Le dérèglement glutamatergique est observable à plusieurs niveaux : au niveau de la libération, au niveau de la recapture et au niveau de la signalisation post-synaptique, conduisant à l'excitotoxicité des neurones striataux (pour revue, (Lewerenz & Maher, 2015)).

Les premiers dysfonctionnements synaptiques se traduisent par l'augmentation de la libération de glutamate dans le striatum suivie par la déconnexion progressive entre le cortex et le striatum (Raymond, et al., 2011). Comme expliqué dans le chapitre 1.3.1.2 « Circuit des ganglions de la base perturbé », le glutamate est le neurotransmetteur exciteur majeur produit dans le cortex et libéré dans le striatum. Au niveau des synapses cortico-striatales, l'augmentation du glutamate peut s'expliquer également par un défaut de recapture du glutamate par les astrocytes qui expriment les transporteurs au glutamate de type 1 (GLT1). La diminution d'expression de GLT1 est en effet observée dans les modèles rongeurs de la MH mais aussi dans le cerveau des patients atteints de la MH (Faideau, et al., 2010; Estrada-Sánchez & Rebec, 2012).

Cet excès glutamatergique extracellulaire agit directement sur un certain nombre de récepteurs. La fixation du glutamate sur les récepteurs ionotropiques post-synaptiques de type AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-méthylisoxazol-4-propionate) permettent l'entrée rapide d'ion sodium et la sortie d'ion potassium ce qui entraîne une dépolarisation membranaire. Egalement, l'activation des récepteurs NMDA (N-méthyl-D-aspartate) nécessite à la fois la libération présynaptique de glutamate et la dépolarisation postsynaptique car les récepteurs NMDA sont bloqués par un ion magnésium qui est libéré uniquement par inversion du potentiel électrochimique (Mayer & Westbrook, 1987; Nowak, Bregestovski, Ascher, Herbet, & Prochiantz, 1984). Une fois activés, les récepteurs NMDA laissent entrer massivement les ions calcium. Cette nécessité d'avoir à la fois cette activation présynaptique et cette dépolarisation postsynaptique pour activer les récepteurs NMDA permet à ces derniers de prendre part au mécanisme d'induction de la plasticité synaptique (Bliss & Collingridge, 1993). Cependant, la stimulation excessive des récepteurs NMDA détériore ce mécanisme de plasticité synaptique. Enfin, les récepteurs métabotropiques du glutamate (mGluR) peuvent participer à la régulation du glutamate selon le type cellulaire et la voie de signalisation impliquée (pour revue (Sepers & Raymond, 2014)).

Bien que le glutamate soit le ligand de divers récepteurs, les récepteurs NMDA jouent un rôle central dans la susceptibilité des neurones à l'excitotoxicité à cause de leur perméabilité aux ions

calcium et leur lente désactivation (Di Figlia, 1990). Parmi les différents types de récepteurs NMDA, les récepteurs extra-synaptiques jouent un rôle important dans la pathogénèse car leur expression est augmentée (Milnerwood, et al., 2010). Or les récepteurs NMDA extra-synaptiques sont couplés à des voies de signalisation de mort cellulaire comme l'activation de protéases ou encore l'activation de protéines pro-apoptotiques entraînant la mort neuronale (Hardingham, Fukunaga, & Bading, 2002)(pour revue, (Parsons & Raymond, 2014)).

De plus, la disponibilité des récepteurs NMDA à la membrane plasmique est régulée par la protéine PSD95 (protéine de densité postsynaptique 95 kDa). Or, PSD95 interagit également avec l'Htt. Cependant, l'Httm a une affinité plus faible pour PSD95 qui est donc plus disponible pour interagir avec les récepteurs NMDA extra-synaptiques et les stabiliser dans le compartiment extra-synaptique (Sun, Savanenin, Reddy, & Liu, 2001).

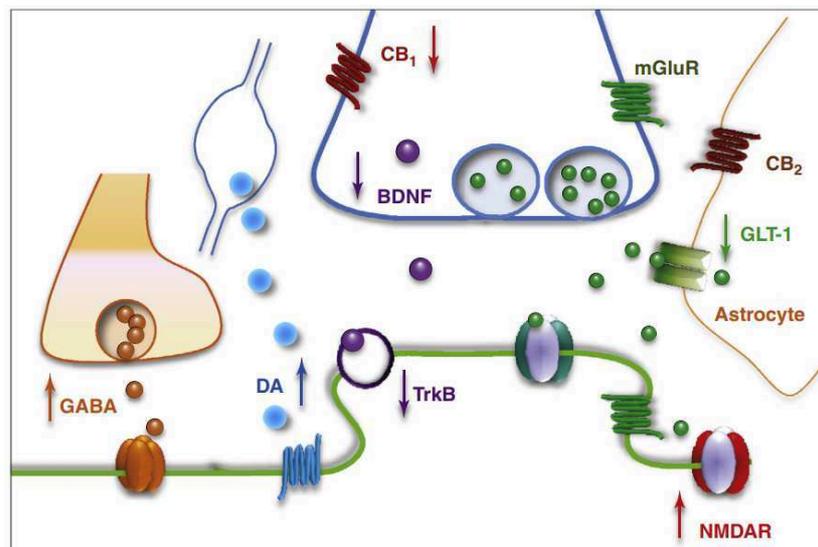


Figure 11. Les dysfonctionnements synaptiques et l'excitotoxicité dans la MH. L'expression pré-synaptique de CB1 (récepteur cannabinoïde 1) est diminuée de même que la libération du facteur trophique BDNF. La libération de dopamine est augmentée. L'absorption gliale de glutamate par GLUT-1 (transporteur de glutamate 1) est diminuée. Les récepteurs post-synaptiques NMDA (N-méthyl-aspartate) sont augmentés hors de la synapse. GABA : acide gamma-aminobutyrique ; TrkB : tyrosine kinase B, mGluR, récepteur métabotrope du glutamate (Sepers & Raymond, 2014).

Ainsi, les neurones épineux de taille moyenne étant très vulnérables à la toxicité induite par les NMDA comparés aux autres cellules neuronales, soulèvent l'hypothèse que l'activation excessive des récepteurs NMDA contribuerait à la dégénérescence sélective des neurones striataux dans la MH. Les récepteurs NMDA sont donc de très bons candidats dans le mécanisme contribuant au dysfonctionnement neuronal précoce dans la MH.

1.4.6 Perturbation du transport des vésicules et des organelles

Parmi les nombreux partenaires de l'htt, la sous-unité p150 de la dynéine et la protéine HAP1 (Huntingtin-associated protein 1) sont des partenaires privilégiés afin que l'htt puisse participer au transport vésiculaire de la cellule (Figure 12). L'htt peut ainsi contrôler le transport antérograde et rétrograde des organelles et des vésicules au niveau des axones et des dendrites des neurones. Par exemple, l'htt est un médiateur du transport vésiculaire axonal antérograde du BDNF (Brain-derived neurotrophic factor) produit dans le cortex vers le striatum pour exercer son activité neurotrophique (Zuccato & Cattaneo, 2007; Gauthier, et al., 2004). Egalement, l'htt participe au transport vésiculaire des récepteurs TrkB, récepteur du BDNF, dans les dendrites des neurones striataux (Liot, et al., 2013).

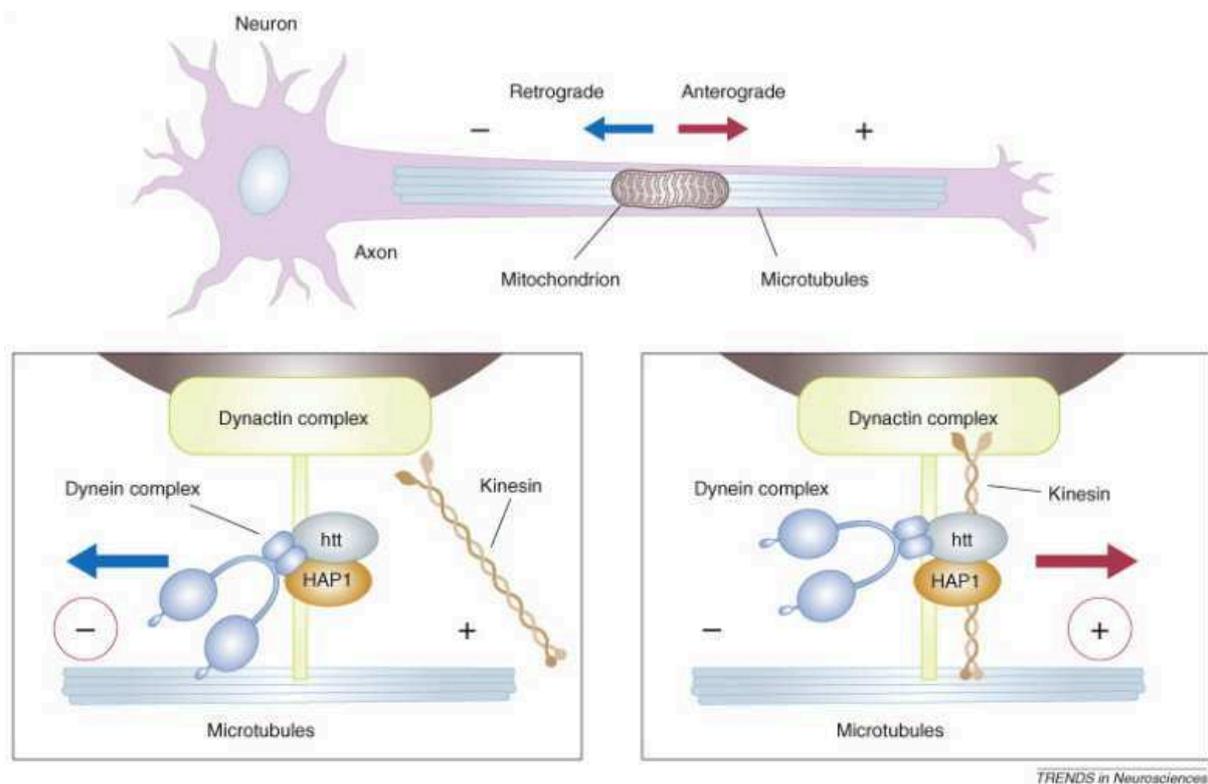


Figure 12. Les protéines motrices, dynéine et kinésine, régulent le transport antérograde et rétrograde des mitochondries dans les neurones. L'htt se lie à HAP1 qui régule la fonction de la dynéine. (Bossy-Wetzel, Petrilli, & Knott, 2008).

Egalement, l'htt participe au transport axonal rapide des vésicules le long des microtubules en maintenant la GAPDH (glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase) au niveau des vésicules afin de fournir localement l'énergie nécessaire à ce type de transport (Zala, et al., 2013). En effet, la GAPDH est une enzyme glycolytique qui participe à la transformation du glucose en ATP, source d'énergie de la cellule. Dans ce processus de transport axonal rapide, l'htt contrôle aussi le sens de transport selon son état de phosphorylation sur le résidu sérine 421 dans sa partie C-terminale (Colin, et al., 2008). La

phosphorylation de ce résidu sérine change le transport rétrograde des vésicules en transport antérograde.

En revanche, lorsque l'htt est mutée, les interactions de l'htt avec les moteurs moléculaires sont perturbées. En effet, l'htt renforce les interactions de l'htt avec HAP1 et la dynéine (Gauthier, et al., 2004). En conséquence, ces protéines interagissent moins avec les microtubules conduisant à un défaut de transport axonal des vésicules et organelles. Ce défaut de transport impacte directement le transport vésiculaire antérograde du BDNF et donc se répercute sur son rôle trophique dans le striatum. En effet, un défaut de BDNF dans le striatum engendre des défauts dendritiques et une importante perte neuronale (Baquet, Gorski, & Jones, 2004). De plus, l'htt est un régulateur important de TrkB, récepteur du BDNF. Or, l'expansion de la queue poly-Q altère la liaison des vésicules contenant TrkB avec les microtubules dans les neurones striataux et réduit le transport de ces vésicules (Liot, et al., 2013).

1.4.7 Autophagie

L'autophagie est divisée en trois principaux types basés sur le type de livraison au lysosome : la microautophagie, l'autophagie médiée par les chaperonnes et la macroautophagie. La macroautophagie est couramment appelée autophagie. L'autophagie est un processus biologique qui permet d'éliminer les organelles endommagées, les protéines agrégées ou toxiques via le lysosome. En conséquence, l'autophagie est un mécanisme important dans la MH puisque l'htt forme des agrégats et l'autophagie est nécessaire à l'élimination de ces agrégats. Ce mécanisme de dégradation comporte trois grandes étapes : la formation de l'autophagosome, la maturation et la fusion avec les lysosomes (pour revue, (Martin, Ladha, Ehrnhoefer, & Hayden, 2015)) (Figure 13 A). Bien que l'autophagie ait été souvent considérée comme un mécanisme de dégradation globale, des formes sélectives d'autophagie ont été mises en évidence selon l'organelle comme la mitophagie pour la mitochondrie (voir Chapitre 1.4.8 « Dysfonctionnement mitochondrial »).

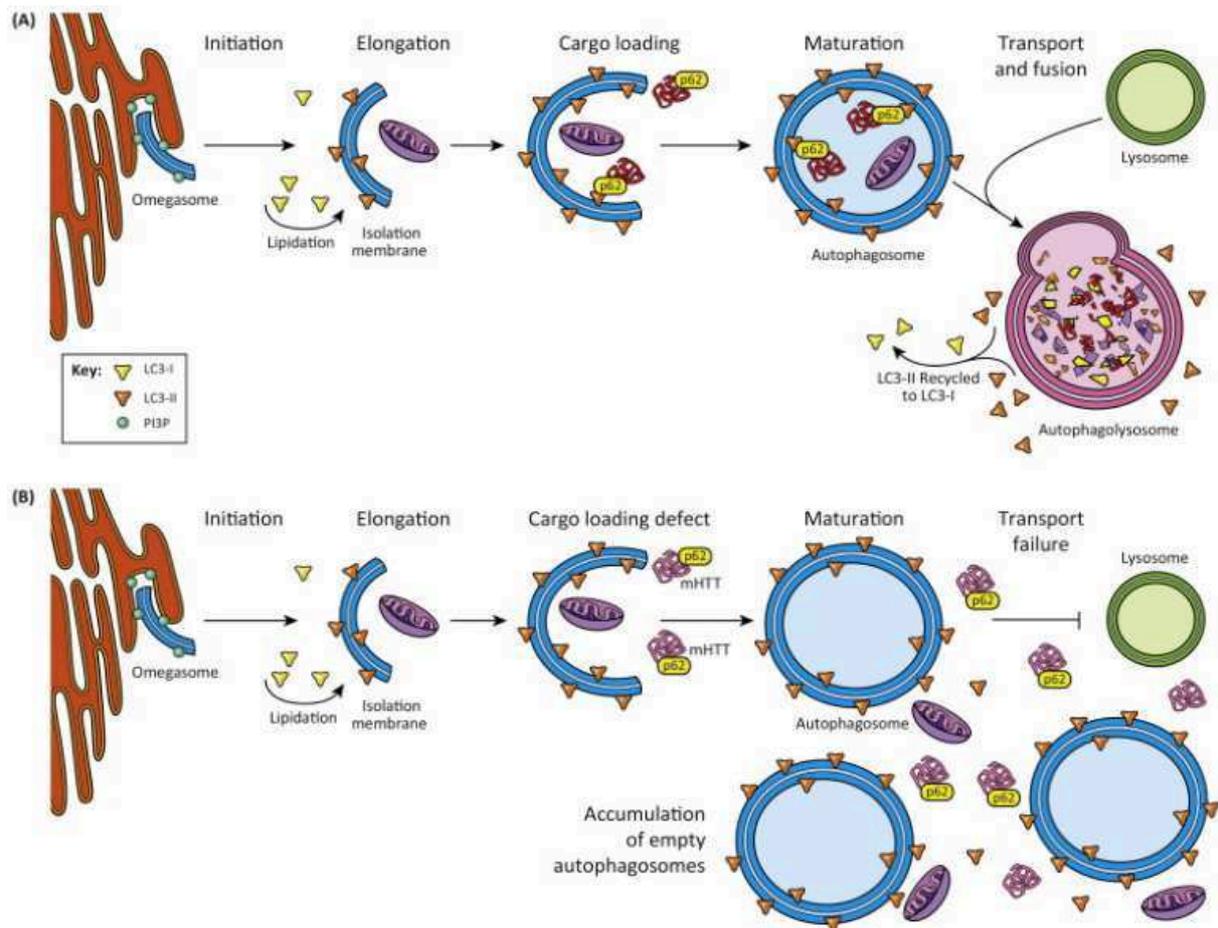


Figure 13. L'autophagie est altérée dans la MH. (A) L'autophagie consiste en la formation d'une vésicule avec une double-membrane qui incorpore les organelles défectueuses et les protéines toxiques et agrégées, et qui fusionne ensuite avec le lysosome pour la dégradation. (B) Dans la MH, l'autophagie est affectée à plusieurs étapes telles que l'emprisonnement des organelles et des protéines à dégrader, le transport des autophagosomes, la fusion entre l'autophagosome et le lysosome. (Martin, Ladha, Ehrnhoefer, & Hayden, 2015).

Les patients atteints de la MH et les modèles présentent une augmentation du nombre d'autophagosomes pour maintenir un flux de dégradation comparable voir supérieur aux individus contrôles (Kegel, et al., 2000; Petersén, et al., 2001). Notamment, l'Httm contribue à l'activation de l'autophagie en séquestrant et en inactivant mTOR, protéine qui empêche la formation de l'autophagosome en condition nutritionnelle favorable. Ainsi, l'Httm favorise l'induction de l'autophagie (Ravikumar, et al., 2004). En revanche, l'autophagie est altérée à plusieurs niveaux par l'Httm car le processus est en partie contrôlé par l'Htt (Martin, et al., 2014; Zheng, et al., 2010; Ochaba, et al., 2014) (Figure 13 B). Les altérations de l'autophagie ont lieu au niveau de la formation de la vacuole, le transport des autophagosomes (Wong & Holzbaur, 2014) et un défaut de fusion entre les autophagosomes et les lysosomes ce qui entraîne une accumulation de matières toxiques dans le cytoplasme et des autophagosomes vides (Martinez-Vicente, et al., 2010) (pour revue, (Martin, Ladha, Ehrnhoefer, & Hayden, 2015)). De plus, l'expression des gènes de l'autophagie est aussi perturbée chez

les patients atteints de la MH contribuant ainsi au dérèglement de l'autophagie dans la MH (Hodges, et al., 2006).

1.4.8 Dysfonctionnement mitochondrial

La mitochondrie joue un rôle central dans la survie cellulaire en contrôlant le métabolisme énergétique, les voies apoptotiques (Green & Reed, 1998) et l'homéostasie du calcium (pour revue, (Chan, 2006)). Son rôle dans la régulation de la mort cellulaire fait de la mitochondrie un élément clé dans les maladies neurodégénératives (pour revue, (Lin & Beal, 2006)). En particulier, un certain nombre de dysfonctionnements mitochondriaux ont été observés dans la MH (pour revue, (Liot, Valette, Pépin, Flament, & Brouillet, 2017; Bossy-Wetzels, Petrilli, & Knott, 2008)).

Dès les années 1980-1990, des études biochimiques ont révélé des dysfonctionnements de la chaîne respiratoire mitochondriale chez les patients atteints de la MH (Brennan, Bird, & Aprille, 1985; Butterworth, Yates, & Reynolds, 1985; Mann, et al., 1990; Gu, et al., 1996) avec une atteinte préférentielle du complexe II (Benchoua, et al., 2006). Ces dysfonctionnements mitochondriaux ont aussi été observés dans les modèles *in vivo* et *in vitro* de la MH (Damiano, et al., 2013; Benchoua, et al., 2006; Majumder, Raychaudhuri, Chattopadhyay, & Bhattacharyya, 2007).

La diminution du potentiel de membrane a été observée dans les modèles *in vitro* (Panov, et al., 2002; Sawa, et al., 1999; Naia, et al., 2015). L'Httm et particulièrement un fragment court N-terminal déclencherait la perte de potentiel de membrane et une transition de perméabilité par son interaction avec la membrane externe mitochondriale (Choo, Johnson, MacDonald, Detloff, & Lesort, 2004; Quintanilla, Jin, von Bernhardi, & Johnson, 2013).

La mitochondrie contrôle également l'homéostasie du calcium. En revanche, l'altération de l'homéostasie du calcium peut avoir différentes causes. La capacité de la mitochondrie à tamponner le calcium est réduite notamment dans les cellules exprimant l'Httm (Panov, et al., 2002). Néanmoins, ce dysfonctionnement n'est pas observé dans tous les modèles de la MH (pour revue, (Brustovetsky, 2016)).

Des défauts dans la dynamique de la mitochondrie ont été observés. La réduction de la mobilité des mitochondries a été montrée dans un modèle *in vitro* exprimant le fragment N-terminale (Orr, et al., 2008). Cette réduction est d'autant plus importante avec la forme complète de l'Httm (Chang, Rintoul, Pandipati, & Reynolds, 2006). Or, la motilité des mitochondries dépend de protéines motrices dépendantes de l'ATP comme la kinésine qui assure le transport antérograde et la dynéine/dynactine qui assure le transport rétrograde (Hollenbeck & Saxton, 2005). Comme expliqué ci-dessus dans le chapitre 1.4.6 « Perturbation du transport des vésicules et des organelles », l'Httm a

une interaction plus forte avec HAP1 qui régule la fonction de la dynéine. La dynamique de la mitochondrie est aussi altérée dans les processus de fusion et fission avec l'augmentation de la fission et une diminution de la fusion (Song, et al., 2011; Shirendeb, et al., 2011).

L'un des mécanismes à l'origine de la dysfonction mitochondriale est la dérégulation de la transcription (Chapitre 1.4.3 « Dérégulation transcriptionnelle »). Notamment, plusieurs facteurs de la régulation transcriptionnelle comme p53 interfèrent avec l'Httpm (Bae, et al., 2005). P53 est une protéine suppressive de tumeur qui régule des gènes impliqués dans la fonction mitochondriale. Or, l'Httpm favorise l'activité de p53 qui en retour augmente l'expression de Bax et Puma conduisant à des défauts mitochondriaux (Bae, et al., 2005). De même, l'Httpm intervient dans la voie PGC-1 α qui est un co-activateur nucléaire jouant un rôle majeur dans la biogénèse mitochondriale (pour revue, (McGill & Beal, 2006)). L'Httpm bloque le promoteur de PGC-1 α par l'inhibition du facteur de transcription CREB ce qui entraîne une diminution de l'expression de PGC-1 α . Cette diminution entraîne la diminution de l'expression de protéines mitochondriales PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptors) (Cui, et al., 2006; St-Pierre, et al., 2006; Weydt, et al., 2006) qui sont nécessaires à la respiration mitochondriale et à la défense contre le stress oxydant (pour revue, (Puigserver & Spiegelman, 2003)).

L'autophagie concerne également la mitochondrie selon un processus appelé mitophagie. La mitophagie permet la dégradation sélective des mitochondries altérées afin de maintenir un réseau mitochondrial performant. A nouveau, l'Httpm perturbe ce fonctionnement en bloquant la formation de l'autophagosome qui contient la mitochondrie à éliminer (Martinez-Vicente, et al., 2010). En somme, le duo Htt/HAP1 contrôle également la dynamique de l'autophagosome puisque ces deux protéines sont des régulateurs du transport de l'autophagosome dans les neurones (Wong & Holzbaur, 2014). L'Httpm entraîne l'inhibition de la fusion de l'autophagosome avec le lysosome le long de l'axone empêchant la maturation de l'autophagosome (Wong & Holzbaur, 2014). En conséquence, les agrégats de l'Httpm ne sont pas correctement éliminés et la mitochondrie n'est pas fonctionnellement opérante. Ce mécanisme de macroautophagie ci-dessus se distingue de la microautophagie qui est l'association de la GAPDH oxydée inactivée par le stress oxydant avec les mitochondries défectueuses pour être dégradées par les lysosomes. En revanche, dans les cellules exprimant l'Httpm, l'Httpm interagit anormalement avec la GAPDH inactivée ce qui bloque la mitophagie induite par la GAPDH entraînant une accumulation des mitochondries endommagées et une augmentation de la mort cellulaire (Hwang, Disatnik, & Mochly-Rosen, 2015).

1.5 Modélisation de la MH

Actuellement, aucun animal n'est connu pour développer naturellement la MH. Pour cette raison, de nombreux modèles ont été développés afin de comprendre la physiopathologie de la MH et de trouver de potentielles cibles thérapeutiques.

Avant la découverte du gène impliqué, l'injection de toxines comme l'acide quinoléique (Beal, et al., 1986) ou l'acide kaïnique (Vécsei & Beal, 1991) a été largement et reste encore très utilisée aussi bien chez les rongeurs que chez les primates non humains (Hantraye, Riche, Maziere, & Isacson, 1990). Ces toxines induisent une mort neuronale par excitotoxicité (Chapitre 1.4.5 « Hypothèse de l'excitotoxicité ») principalement en se liant par exemple aux récepteurs NMDA des neurones striataux pour le quinolinate. L'autre stratégie pour induire la mort neuronale est le blocage du métabolisme énergétique mitochondriale en injectant l'acide 3-nitropropionique (3NP) aux rongeurs (Beal, et al., 1993) ou aux primates non humains (Brouillet, et al., 1995). Le 3NP est une toxine mitochondriale qui inhibe la succinate déshydrogénase, enzyme du cycle de Krebs et du complexe II de la chaîne respiratoire mitochondriale. Cette inhibition conduit à une déplétion en ATP (adénosine triphosphate) ce qui entraîne la mort des neurones striataux (pour revue, (Brouillet, 2014; Brouillet, Jacquard, Bizat, & Blum, 2005)).

Après la découverte du gène en 1993, de nombreux modèles génétiques ont alors été développés chez différents organismes comme *Saccharomyces cerevisiae* (pour revue, (Mason & Giorgini, 2011; Panaretou & Jones, 2014)), *Caenorhabditis elegans* (Lee, Ung, Sands, & Kikis, 2017a) (pour revue, (Ma, et al., 2018)), *Drosophila melanogaster* (pour revue, (Marsh, Pallos, & Thompson, 2003)). Ces modèles sont souvent utilisés pour cribler des gènes modificateurs ou pour identifier des molécules à visée thérapeutique.

Des modèles vertébrés ont aussi été générés comme un modèle ovin (Jacobsen, et al., 2010; Morton, et al., 2014), des modèles de cochon (Baxa, et al., 2013; Schuldenzucker, et al., 2017; Yan, et al., 2018). Plus classiquement utilisés, des modèles rongeurs ont aussi été créés. Le premier modèle de rat transgénique pour la MH a été créé en 2003 (von Hörsten, et al., 2003). Ce modèle transgénique appelé rat HD51 porte un fragment d'ADNc de l'Htt humaine tronquée (22 %) avec 51 répétitions de CAG sous le contrôle du promoteur de l'Htt endogène. Puis a été créé le modèle transgénique BACHD qui exprime un vecteur bactérien appelé chromosome artificiel bactérien (BAC). Le vecteur BAC porte le gène complet de l'Htt humaine avec 97 répétitions de CAG sous le contrôle du promoteur humain de l'Htt et des éléments de régulation (Yu-Taeger, et al., 2012). Le choix du modèle dépend de la problématique de l'étude en tenant compte des caractéristiques du modèle (Pouladi, Morton, & Hayden, 2013). Pour leur part, les primates non humains sont indispensables à la validation préclinique

des potentielles molécules thérapeutiques. Des modèles de primates non humains ont donc été générés soit par l'utilisation de vecteurs viraux soit par transgénèse (Palfi, et al., 2007; Yang, et al., 2008).

1.5.1 Focus sur les modèles murins

Pour des raisons économiques et de faisabilité technique principalement, les modèles animaux murins ont largement été plébiscités. Mis à part les modèles par injection de toxines, d'autres modèles sont explicités ci-dessous.

1.5.1.1 Les modèles par transfert viral du gène de l'htt

Les vecteurs viraux sont des outils moléculaires qui ont été développés pour permettre le transfert de gène notamment dans le cerveau (Déglon & Hantraye, 2005). Dans le système nerveux central, les vecteurs viraux utilisés proviennent de virus adéno-associés (AAV), de lentivirus (LV), d'adénovirus et du virus Herpès simplex (pour revue, (Ruiz & Déglon, 2012)). Chaque vecteur viral présente ses avantages et ses inconvénients et doit donc être choisi selon la problématique. Pour l'expression de l'htt, le LV est classiquement utilisé dans le striatum.

Le modèle LV est le modèle utilisé pour avoir une surexpression de l'htt de manière rapide et flexible. Les premiers essais ont été menés chez le rat avec l'injection intra-striatale de LV exprimant l'htt humaine avec des expansions de CAG variables (de Almeida, Ross, Zala, Aebischer, & Déglon, 2002). Le LV codant les 171 premiers aminoacides de l'htt avec 82 polyQ (LV-htt171-82Q) a ensuite été très largement utilisé dans les rongeurs pour étudier les mécanismes de toxicité de l'htt (Damiano, et al., 2013; Galvan, et al., 2012; Drouet, et al., 2009). La dégénérescence striatale apparaît 4 à 6 semaines après injection dans la souris. Ce modèle présente des agrégats d'htt, une astrogliose mais ne présente pas de phénotype comportemental particulier.

Classiquement injecté dans le striatum, Schwab et collaborateurs (2017) ont injecté le LV-htt171-82Q dans une région de l'hippocampe impliquée dans la neurogenèse, le gyrus denté. L'équipe a ainsi montré que l'injection viral de htt entraîne la formation d'agrégats dans le gyrus denté, des déficits de mémoire spatiale et des défauts de plasticité notamment une réduction de la neurogenèse et une diminution des gènes précoces (Schwab, Richetin, Barker, & Déglon, 2017).

Les vecteurs lentiviraux transduisent efficacement les cellules non prolifératives. Leur capacité de clonage permet de cloner des transgènes relativement grands (jusqu'à 9 kb) ce qui est intéressant pour l'htt. De plus, le lentivirus est intégratif ce qui entraîne la persistance de l'expression du gène d'intérêt. Le LV-htt171-82Q est donc adapté pour comprendre certains circuits spécifiques et les voies impliquées dans les processus de pathogénèse (Ben Haim, et al., 2015). En revanche, la faible diffusion

des lentivirus ne permet une infection totale du striatum. Ce modèle n'est donc pas adapté pour des études fonctionnelles dans le striatum, en particulier pour étudier les effets comportementaux.

Le modèle AAV a aussi été développé chez le rat dans un premier temps avec un vecteur AAV codant pour une protéine GFP associée à un fragment d'htt comportant une queue polyQ de 97 répétitions (Senut, Suhr, Kaspar, & Gage, 2000). Un modèle AAV murin a ensuite été développé en injectant dans le striatum un virus codant pour un fragment d'htt avec une queue polyQ de 100 répétitions (DiFiglia, et al., 2007). Ce modèle présente certaines caractéristiques anatomopathologiques de la MH comme les agrégats et certains traits comportementaux typiques comme le *claspings*. Plus récemment, un nouveau modèle murin a été généré par injection striatale d'un AAV codant l'htt N171-82Q et de sérotype DJ (Jang, Lee, & Cho, 2018). Ce modèle affiche un certain nombre de dysfonctions motrices très rapidement après l'injection et des caractéristiques neurodégénératives comme une activation microgliale et astrocytaire.

Les vecteurs AAV ont une capacité de clonage maximale de 6 kb. L'AAV n'est en revanche pas intégratif ce qui en fait un outil de transfert de gène plus sûr notamment en clinique. Les vecteurs AAV ont une plus large capacité de diffusion comparée aux LVs. Selon le sérotype utilisé, l'efficacité de transduction et donc la diffusion du virus peut s'avérer grandement améliorée (Davidson, et al., 2000). Cette grande capacité de diffusion en fait un modèle de choix pour des études fonctionnelles.

1.5.1.2 Les modèles génétiques de la MH

Plusieurs modèles génétiques ont été créés selon différents critères génétiques : l'expression de l'htt complète ou d'une portion uniquement, l'expression du gène soit par un transgène soit par une intégration du gène dans le locus endogène, l'expression de l'htt humaine ou de l'htt endogène. La construction génétique peut aussi différer au niveau de la séquence génétique (séquence génomique ou ADNc, ou encore par le promoteur utilisé (promoteur de l'htt ou un autre promoteur) (Figure 14).

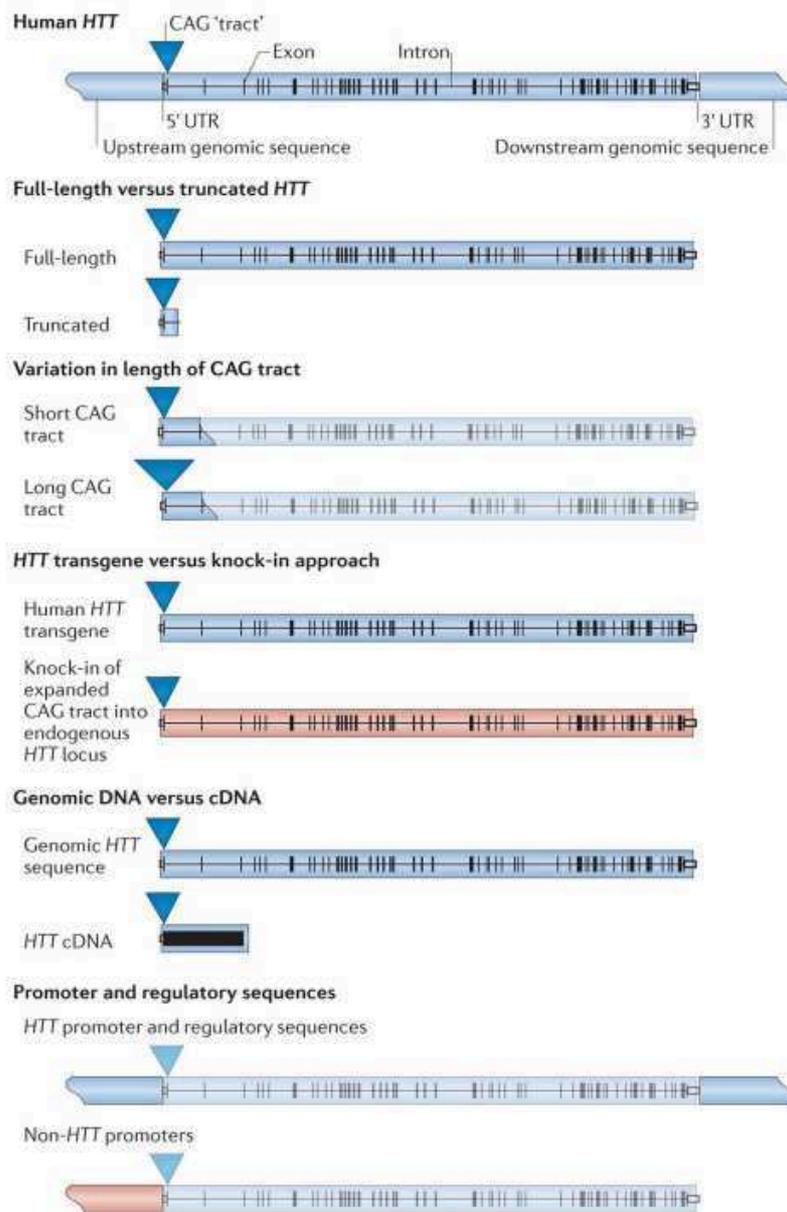


Figure 14. Construction génétique des différents modèles de la MH. Les modèles animaux diffèrent selon certains critères de conception génétique dont l'utilisation de l'HTT entière ou tronquée, l'expression du gène soit par un transgène soit le gène a été inséré dans le locus endogène, l'expression de l'HTT humaine ou de l'Htt endogène, l'utilisation d'une séquence d'ADN génomique ou d'ADNc, le promoteur de l'Htt ou un autre promoteur (Pouladi, Morton, & Hayden, 2013).

Trois grandes catégories de modèles génétiques murins se distinguent selon ces différents critères génétiques (Tableau 1) :

- Les animaux transgéniques qui portent un fragment 5' du gène *HTT* humain
- Les animaux transgéniques qui portent la séquence complète du gène de l'Htt
- Les animaux knock-in (KI) où la mutation est directement insérée dans le gène de l'Htt murin au niveau du locus génomique

Les animaux transgéniques portant un fragment 5' du gène de *HTT* humain ont été parmi les premiers modèles murins de la MH générés avec les lignées R6/1 et R6/2 qui possèdent 116 et 144 répétitions de CAG respectivement (Mangiarini, et al., 1996). Ces lignées développent très rapidement les symptômes moteurs et cognitifs de la MH. En plus des lignées R6, la lignée N171-82Q est une autre lignée qui exprime aussi une forme tronquée de l'HTT humaine (Schilling, et al., 1999). Cette lignée a la particularité d'exprimer 171 aminoacides de l'HTT humaine avec 82 répétitions de CAG sous la régulation du promoteur prion murin ce qui limite l'expression du transgène au cerveau de la souris. Ces souris ont été créées par injection du matériel génétique dans le noyau d'un ovocyte fertile quand le matériel génétique provenant de l'ovocyte et celui provenant du sperme sont séparés, c'est-à-dire pendant la prophase. De ce fait, une copie du transgène a été intégrée de manière aléatoire dans le génome murin.

Bien que ces souris ne modélisent pas parfaitement la génétique et l'anatomopathologie la MH, la lignée R6/2 notamment est très utilisée en recherche préclinique car la lignée est très bien caractérisée et l'efficacité d'un traitement peut être évaluée selon la survie des animaux (Li, Popovic, & Brundin, 2005; Gil & Rego, 2009). A titre d'exemple, la recherche des termes « R6/2 » et « mice » dans Pubmed propose 625 résultats. En revanche, ce modèle est dit très agressif car la dégénérescence striatale et les symptômes de la maladie apparaissent très tôt (Tableau 2 Tableau 3 et 4). De plus, les souris décèdent précocement, aux alentours des 10-13 semaines, la fenêtre d'étude est donc très restreinte (Tableau 4).

Pour les modèles qui expriment la forme complète de l'HTT humaine, le transgène est porté soit par un chromosome artificiel de levure (YAC, yeast artificial chromosome) (Hodgson, et al., 1999) soit par un chromosome artificiel bactérien (BAC, bacterial artificial chromosome) (Gray, et al., 2008). Parmi les souris YAC, la souris YAC 128 a été très étudiée. Dans la lignée BACHD, l'exon 1 du gène humain a été remplacé par un exon contenant 97 répétitions d'un mélange de répétitions de CAG/CAA conférant une stabilité germinale. De plus, un site LoxP a été ajouté dans la région 5' non transcrite et un autre site dans l'intro 1 du gène. En conséquence, une inactivation conditionnelle de l'HTT est possible (Soylu-Kucharz, Baldo, & Petersén, 2016; Molero, et al., 2016; Estrada-Sánchez, et al., 2015; Baldo, Cheong, & Petersén, 2014). Ces modèles développent beaucoup moins rapidement les symptômes caractéristiques comparés aux modèles transgéniques possédant seulement un fragment et la durée de vie des souris est quasiment normale. De plus, ils ne récapitulent pas l'ensemble des caractéristiques anatomo-pathologiques. La plupart de ces modèles ne présentent pas ou très peu de perte neuronale ce qui rend difficile l'évaluation de possibles traitements. En revanche, ces modèles sont adaptés pour tester les thérapies expérimentales ciblant directement le gène *HTT* humain, l'ARNm ou sa protéine.

Les modèles knock-in (KI) sont générés par des techniques de recombinaison homologue sur des cellules souches embryonnaires murines qui permettent d'insérer directement un nombre spécifique de CAG dans le gène *Htt* murin. Ces modèles KI sont plus proches génétiquement des patients. Un certain nombre de modèles KI murins ont été créés (pour revue, (Menalled L. , 2005)) parmi eux la lignée CAG 140 et la lignée zQ175 qui dérive de la lignée CAG 140 par expansion spontanée (Menalled, Sison, Dragatsis, Zeitlin, & Chesselet, 2003; Menalled, et al., 2012). De manière globale, les lignées KI présentent un phénotype neurodégénératif très progressif et les caractéristiques anatomopathologiques sont retrouvées à des stades plus tardifs que les lignées transgéniques. Ces lignées connaissent également le phénomène d'instabilité gamétique qui concoure à la modification du phénotype.

Tableau 1. Construction génétique des modèles murins de la MH classiquement utilisés

Modèle	Produit du transgène	Promoteur	Répétitions de CAG	Références
Souris transgéniques possédant un fragment du gène de l'HTT humaine				
R6/1	Fragment N-terminal de l'HTT humaine de 67 AA	Promoteur humain de l' <i>HTT</i> (1 kb)	116	(Mangiarini, et al., 1996)
R6/2	Fragment N-terminal de l'HTT humaine de 67 AA	Promoteur humain de l' <i>HTT</i> (1 kb)	144	(Mangiarini, et al., 1996)
N171-82Q	Fragment N-terminal de l'HTT humaine (ADNc) de 171 AA	Promoteur prion murin	82	(Schilling, et al., 1999)
Souris transgéniques possédant la séquence complète du gène de l'HTT humaine				
YAC128	HTT humaine complète	Promoteur humain de l' <i>HTT</i> + éléments de régulation	128	(Slow, et al., 2003)
BACHD	HTT humaine complète	Promoteur humain de l' <i>HTT</i> + éléments de régulation	97	(Gray, et al., 2008)
Souris knock-in				
CAG 140 (KI140)	Produit chimérique de l'exon 1 de l'HTT humaine et de l'Htt murin	Promoteur murin endogène de l' <i>Htt</i>	140	(Menalled, Sison, Dragatsis, Zeitlin, & Chesselet, 2003)
zQ175	Produit chimérique de l'exon 1 de l'HTT humaine et de l'Htt murin	Promoteur murin endogène de l' <i>Htt</i>	175 puis stabilisation à 188	(Menalled, et al., 2012)

AA : aminoacide ; Htt : huntingtine

1.5.2 Modélisation des symptômes moteurs

Une large batterie de tests sur les modèles murins a été utilisée pour caractériser les dysfonctionnements moteurs causés par l'expression de l'Httm comme le test du Rotarod, le test de la marche, l'*Open Field* (pour une revue des tests de la fonction motrice chez les rongeurs, (Brooks & Dunnett, 2009)). L'activité locomotrice est généralement observée de manière spontanée dans un nouvel environnement (Rotarod et *Open Field*) ou dans un environnement proche de leur condition d'hébergement en utilisant un système d'enregistrement et de suivi des animaux. Chaque modèle

murin de la MH a son propre décours physiopathologique. En conséquence, les déficits moteurs ne sont pas tous observés au même âge.

Globalement, l'activité locomotrice est altérée dans les modèles rongeurs de la MH mais l'atteinte motrice dépend du test utilisé et des conditions de test (Pallier, Drew, & Morton, 2009). Le test du Rotarod est sans doute le test le plus utilisé pour étudier la coordination motrice et les capacités des rongeurs à se maintenir en équilibre sur une barre en rotation. Plusieurs protocoles existent en fonction de la vitesse utilisée, fixe ou accélérée. Le Tableau 2 indique l'âge d'apparition des déficits moteurs observés au Rotarod et à l'*Open Field* dans les différents modèles rongeurs couramment utilisés. Les souris R6 sont sans doute les modèles murins les plus rapidement atteints (Brooks, et al., 2012b; Menalled, et al., 2009).

Tableau 2. Déficits moteurs observés dans les modèles murins de la MH classiquement utilisés.

Modèle	Rotarod	<i>Open Field</i>	Autres observations	Références
R6/1	Dès 2 Mo	Hypokinésie à 23 sem (<i>Open Field</i> circulaire)	Clasping : 4-5 Mo Déficits de 2 à 7 Mo à la poutre d'équilibre Hypokinésie dès 18 sem dans cage d'activité	(Mangiarini, et al., 1996; Naver, et al., 2003; Brooks, et al., 2012b; Hodges, et al., 2008)
R6/2	Dès 4 sem à vitesse accélérée Dès 5 sem à vitesse fixe (16 rpm)	Hypokinésie à 6-8 sem ↓ rearing 6 sem	Force de préhension : ↓ à partir de 9 sem	(Stack, et al., 2005; Menalled, et al., 2009)
N171-82Q	Dès 3 Mo		Clasping : 5,5 Mo	(Schilling, et al., 1999)
YAC128	Résultats divergents selon le protocole utilisé.	Aucun déficit pendant la phase diurne Hypokinésie légère âges avancés ↑ rearing 52 sem		(Menalled, et al., 2009)
BACHD	4 sem	Hypokinésie à partir de 28 sem ↓ rearing dès 4 sem	Déficits de la marche sur des critères statiques et dynamiques à 9 Mo (Catwalk)	(Menalled, et al., 2009; Abada, Schreiber, & Ellenbroek, 2013)
CAG 140 (KI140)	Dès 4 Mo à vitesse fixe (30 et 40 rpm)	↑ rearing à 1 Mo Hyperkinésie à 1 Mo Hypokinésie à 4 Mo	↓ longueur de foulée à 1 Mo	(Menalled, Sison, Dragatsis, Zeitlin, & Chesselet, 2003; Hickey, et al., 2008)
zQ175	A 30 et 38 sem pour les hétéroZ et homoZ (phase nocturne) Pas de déficit observé en phase diurne	Hypokinésie à 8 sem pour les HomoZ et 20 sem pour les HétéroZ (phase nocturne) ↓ rearing pour les homoZ dès 4 sem (phase diurne)		(Menalled, et al., 2012)

Sem : semaine ; Mo : mois ; rpm : rotation par min ; ↓ : diminution ; ↑ : augmentation ; HomoZ : homozygote ; HétéroZ : hétérozygote

Bien que certains déficits moteurs puissent être modélisés et observés dans les modèles murins de la MH, certains aspects moteurs observés chez les patients atteints de la MH ne peuvent pas être modélisés comme les mouvements choréiques, les troubles oculomoteurs ou les mouvements involontaires faciaux.

1.5.3 Modélisation des symptômes cognitifs

Comme détaillé dans le chapitre « 1.1.2 Troubles cognitifs », une déclinaison globale des capacités cognitives apparaît très tôt chez les patients atteints de la MH. Les déficits de mémoire et d'apprentissage ont été également étudiés dans les modèles murins de la MH en prenant un nombre d'individus compris entre 10 et 15. Globalement, les déficits de mémoire procédurale sont retrouvés dans quasiment tous les modèles montrant ainsi des déficits au niveau de l'axe cortico-striatal (Tableau 3). Ces déficits sont d'autant plus précoces dans les souris R6 (Cayzac, Delcasso, Paz, Jeantet, & Cho, 2011; Ciamei & Morton, 2009). Les tests impliquant la mise en place d'un changement de stratégie ont également révélés des déficits de changement de stratégie (Lione, et al., 1999; Brooks, Jones, & Dunnett, 2012c; Van Raamsdonk, et al., 2005; Abada, Schreiber, & Ellenbroek, 2013). Ces tests sont particulièrement sensibles au dysfonctionnement du striatum.

Tableau 3. Déficiences cognitives observées dans les modèles murins de la MH régulièrement utilisés.

Modèles	Déficiences cognitives observées	Références
R6/1	Déficit de mémoire procédurale à 14-18 sem (<i>Operant nose poke task</i>) Déficit apprentissage spatiale dès 2 Mo à la piscine de Morris), à 12 sem au test de Barnes Déficit mémoire spatiale court-terme dès 12 sem au test Y-maze, dès 14 sem au test de reconnaissance de localisation Déficit de mémoire long-terme (NORT) à 12 sem ↑ réactivité au réflexe de sursaut acoustique Déficit d'apprentissage à la discrimination (test de Lashley jump-stand) à 10 sem	(Cayzac, Delcasso, Paz, Jeantet, & Cho, 2011; Brooks, et al., 2012b; Nithianantharajah, Barkus, Murphy, & Hannan, 2008; Mazarakis, et al., 2005; Giralt, et al., 2011)
R6/2	Déficit de mémoire procédurale à 12 sem (Test de compétition en piscine de Morris) Déficit apprentissage spatiale dès 3.5 sem Déficit changement de stratégie à 5 sem au T-maze et à 6.5 sem au test « Two-choice swim tank » Déficit mémoire long-terme (NORT) à 9-10 sem	(Ciamei & Morton, 2009; Lione, et al., 1999; Giralt, et al., 2011)
N171-82Q	Déficit de mémoire procédurale et spatial à 14 sem (radial arm water maze)	(Ramaswamy, McBride, & Kordower, 2007)
YAC128	Déficit d'apprentissage moteur et déficit procédural (SILT) dès 6 Mo Déficit d'apprentissage à la discrimination (<i>Two-choice swim tank</i>) dès 27 sem Déficit changement de stratégie (<i>reversal swimming T-maze</i>) à 8,5 Mo ↑ réactivité (PPI et test du sursaut acoustique) à 12 Mo	(Brooks, Jones, & Dunnett, 2012c; Brooks, et al., 2012a; Van Raamsdonk, et al., 2005)
BACHD	Déficit changement de stratégie à 9-10 Mo (Test cross-maze)	(Abada, Schreiber, & Ellenbroek, 2013)
CAG 140 (KI140)	Déficit de mémoire à long-terme à 16 sem (NORT)	(Simmons, et al., 2009)
zQ175	Déficit de mémoire procédurale à 10 et 12 Mo pour les homoZ (<i>Two-choice swim tank</i>)	(Menalled, et al., 2012)

SILT : serial implicit learning task ; PPI: pre-pulse inhibition ; NORT : novel object recognition test ; Mo : mois ; sem : semaine ; HomoZ : homozygotes

Les déficiences cognitives observées sont majoritairement le résultat du dysfonctionnement de l'axe cortico-striatal. Cependant, des déficiences des fonctions hippocampiques ont également été observées dans ces modèles murins de la MH, notamment des déficiences de mémoire spatiale (Nithianantharajah, Barkus, Murphy, & Hannan, 2008; Ransome & Hannan, 2012) (données référencées dans le Tableau 3). En revanche, une seule étude montre des déficiences de mémoire spatiale chez les patients atteints de la MH (Begeti, Schwab, Mason, & Barker, 2016).

1.5.4 Modélisation des autres manifestations comportementales et des spécificités anatomopathologiques

Les patients atteints de la MH présentent d'autres symptômes psychiatriques comme la dépression, l'anxiété. Un certain nombre de tests existe pour déterminer l'anxiété comme le labyrinthe en croix surélevé, le test « zero maze » et l'*Open Field*. L'anxiété est diminuée chez certains modèles comme la lignée R6/1 (Naver, et al., 2003) mais elle peut aussi être augmentée comme dans la lignée

BACHD (Abada, Schreiber, & Ellenbroek, 2013). Dans le modèle R6/2, l'anxiété varie selon l'âge des souris (Bolivar, Manley, & Messer, 2003) (Tableau 4).

D'autres manifestations de la MH peuvent être identifiées dans les modèles murins de la MH (Tableau 4). La perte de poids observée chez les patients est majoritairement retrouvée dans les modèles animaux sauf dans la lignée BACHD et la lignée YAC128 chez lesquelles le poids est augmenté (Menalled, et al., 2009).

D'un point de vue anatomopathologique, l'atrophie striatale a été reportée à la fois dans les modèles ne présentant qu'un fragment de l'Httm (Bayram-Weston, Jones, Dunnett, & Brooks, 2012; Aggarwal, et al., 2012) et dans les modèles présentant la forme complète de l'Httm (Slow, et al., 2003; Gray, et al., 2008). Comme pour les déficits comportementaux, l'atrophie striatale est nettement plus précoce dans les modèles murins présentant un fragment de l'Httm. Dans les modèles KI, l'atrophie striatale apparaît proportionnellement au nombre de répétitions CAG. Les agrégats d'Httm et les inclusions nucléaires sont observés dans tous les modèles rongeurs même si l'apparition et la distribution tissulaire varient selon les modèles (Tableau 4).

Plusieurs études ont examiné comment la neurogenèse adulte est affectée dans le cerveau de plusieurs modèles transgéniques de la MH. Les premières études ont débuté avec les lignées R6. La neurogenèse pourrait jouer un rôle important dans la fonction hippocampique. La diminution de la neurogenèse pourrait donc contribuer à certains déficits cognitifs observés dans ces modèles transgéniques.

Tableau 4. Observations anatomopathologiques et autres manifestations observables dans les modèles murins de la MH.

Modèles	Anatomopathologie	Age de décès	Neurogenèse			Autres manifestations	Références
			Prolifération	Différenciation	Maturation		
R6/1	Inclusions dès 9 sem, atrophie striatale dès 2 Mo, astrogliose à 4 et 6 Mo	32-40 sem	A 22 sem ↓ BrdU	A 10 sem ↓ ↓DCX	A 24 sem ↓ BrdU/NeuN	↓ du poids dès 22 sem Anxiété diminuée à 24 sem (Croix surélevée)	(Mangiarini, et al., 1996; Naver, et al., 2003; Bayram-Weston, Jones, Dunnett, & Brooks, 2012; Lazic S. , et al., 2004; Lazic S. , et al., 2006; Grote, et al., 2005)
R6/2	Atrophie globale dès 3 sem, agrégats et astrogliose dès 1 Mo	10-13 sem	A 12 sem ↓ 66 % BrdU ↓ 70 % Ki-67 ↓ 36 % PCNA (n.s.)	A 10 sem ↓ 65 % DCX	A 6 sem ↓ BrdU/NeuN	8.6 % ↓ du poids à partir de 62 J. Anxiété fluctuante selon l'âge (<i>fear conditioning</i>)	(Mangiarini, et al., 1996; Stack, et al., 2005; Fedele, Roybon, Nordström, Li, & Brundin, 2011; Gil, et al., 2005; Bolivar, Manley, & Messer, 2003; Aggarwal, et al., 2012)
N171-82Q	Inclusions, atrophie dès 10 sem	5-6 Mo	A 16 sem A.D BrdU		A 19 sem ↓ BrdU/NeuN	↓ du poids dès 2 Mo	(Schilling, et al., 1999; Aggarwal, et al., 2012; Duan, et al., 2008)
YAC128	Agrégats nucléaires à 12 Mo Atrophie 13 Mo ↓ poids cerveau dès 9 Mo	Normal	A 18 Mo 26 % ↓ BrdU 26 % ↓ Ki-67 A.D. PCNA	63 % ↓DCX 71 % ↓ NeuroD	A 12 Mo ↓ BrdU/NeuN	↑ du poids 32 sem pour les ♂ et 48-76 sem pour les ♀ Anxiété ↑ à 52 sem à l' <i>Open Field</i>	(Slow, et al., 2003; Menalled, et al., 2009; Simpson, et al., 2011)
BACHD	Inclusions et agrégats à partir de 12 Mo Atrophie striatale à 18 Mo	Normal				↑ du poids 12 sem pour les ♂ et 16 sem pour les ♀ Anxiété ↑ à 9 Mo (Test <i>Zero-maze</i>)	(Menalled, et al., 2009; Rocher, et al., 2016; Gray, et al., 2008; Abada, Schreiber, & Ellenbroek, 2013)
CAG 140 (KI140)	Inclusions et agrégats nucléaires dès 2 Mo Agrégats dans le neuropile dès 4 Mo Astrogliose à 1 an Atrophie striatale à 12 Mo	Normal				Anxiété ↑ au choix jour/nuit et au <i>fear conditioning</i> à 4-6 Mo	(Menalled, Sison, Dragatsis, Zeitlin, & Chesselet, 2003; Hickey, et al., 2008; Lerner, Trejo Martinez, Zhu, Chesselet, & Hickey, 2012)
zQ175	Atrophie dès 3 Mo	90 sem pour les homoZ				↓ du poids dès 8 sem pour les homoZ et à partir de 52 sem pour les hétéroZ	(Menalled, et al., 2012; Peng, et al., 2016)

J : jours ; Sem : semaine ; Mo : mois ; n.s. : non significatif ; homoZ : homozygote ; ↓ : diminution ; ↑ : augmentation ; BrdU : Bromodésoxyuridine ; Ki-67 : antigène nucléaire marqueur de prolifération ; PCNA : antigène nucléaire de prolifération cellulaire ; ♂ : mâle ; ♀ : femelle ; A.D. aucune différence

2 DCLK3 et la famille des DCX

2.1 La famille DCX et les DCLKs

La découverte du gène *DCX* (*Doublecortin*) a conduit à la découverte de nombreux gènes de la famille des gènes DCX (des Portes, et al., 1998b) (pour revue, (Dijkmans, van Hooijdonk, Fitzsimons, & Vreugdenhil, 2010)). Des mutations dans ce gène situé sur le chromosome X conduisent à de sévères malformations du cerveau : une lissencéphalie (syndrome du cerveau lisse) chez les hommes et une hétérotopie sous-corticale (syndrome du double cortex) chez les femmes. Ces mutations du gène *DCX* entraînent une migration anormale des neurones conduisant à un développement et à une perturbation de la formation des couches du cortex (des Portes, et al., 1998a). En effet, DCX est une protéine associée aux microtubules qui est impliquée dans la migration neuronale et la croissance axonale pendant le développement (Schaar, Kinoshita, & McConnell, 2004; Gleeson, Lin, Flanagan, & Walsh, 1999; Francis, et al., 1999). Bien que des mutations du gène *DCX* soient la cause de maladies associées à des défauts d'arborescence corticale, les souris déficientes en *Dcx* présentent un phénotype cortical très peu perturbé (Nosten-Bertrand, et al., 2008; Kappeler, et al., 2006; Corbo, et al., 2002). La plupart des autres gènes de la famille DCX ont été étudiés selon leur fonction associée au domaine doublecortine qui a la capacité de s'associer aux microtubules (Taylor, Holzer, Bazan, Walsh, & Gleeson, 2000).

Dans la famille DCX, se distingue la sous-famille doublecortin-like kinase (DCLK) composée de DCLK1, DCLK2 et DCLK3. Les DCLKs ont en commun un domaine kinase sérine/thréonine qui présente une certaine homologie avec les protéines kinases calcium/calmoduline-dépendantes (CamK) (Ohmae, et al., 2006; Burgess & Reiner, 2001). DCX et les protéines DCLK ont non seulement un domaine doublecortine en commun mais également un domaine riche en sérine, thréonine et proline (domaine SP) qui est connu pour être un domaine d'interactions avec d'autres protéines (Tanaka, et al., 2004) (pour revue, (LoTurco, 2004)).

En comparant les domaines kinases des protéines DCLKs, DCLK1 et DCLK2 montrent une plus grande similarité avec 75,3 % de conservation (Dijkmans, van Hooijdonk, Fitzsimons, & Vreugdenhil, 2010). DCLK3 est plus proche en premier lieu de DCLK1 avec 56 % puis de DCLK2 avec 53 % d'identité. Curieusement, le domaine kinase des protéines DCLKs a une homologie intermédiaire entre la protéine CamK 2 et les CamK 1/4. En d'autres termes, les protéines CamK 1/4 divergent plus de la protéine CamK 2 qu'elles ne divergent des protéines DCLKs (Ohmae, et al., 2006).

Selon une étude Unigène, les protéines DCLK1 et DCLK2 sont majoritairement enrichies dans le cerveau (Reiner, et al., 2006), étude confirmée par une base de données disponible gratuitement (The Human protein atlas) qui montre également que DCLK3 est également enrichie dans le cerveau.

2.2 DCLK1 et DCLK2

DCLK1 et DCLK2 sont très similaires et ont une distribution tissulaire très proche (Ohmae, et al., 2006). Ces protéines sont exprimées à la fois dans les neurones immatures et matures (Deuel, et al., 2006; Reiner, et al., 2006; Burgess, Martinez, & Reiner, 1999). Dans le cerveau, *DCLK1* et *DCLK2* sont exprimés majoritairement dans les neurones et dans les astrocytes (<http://www.brainrnaseq.org/>) (Zhang, et al., 2014). DCLK1 et DCLK2, tout comme DCX, sont des protéines associées aux microtubules grâce aux domaines doublecortine (Lin, Gleeson, Corbo, Flanagan, & Walsh, 2000; Edelman, et al., 2005; Nagamine, Shimomura, Sueyoshi, & Kameshita, 2011) (Figure 16).



Figure 15. Représentation schématique de la protéine DCLK1. DCLK1 possède 2 domaines doublecortine en tandem (en bleu), un domaine riche en résidus proline, glutamique, sérine et thréonine appelé PEST (en blanc), un domaine kinase (en vert) (Patel, et al., 2016)

Tout comme les souris KO *Dcx*, les souris déficientes en *Dclk1* ne présentent pas de déficience majeure dans la migration cellulaire. En revanche, les souris présentant une double déficience en *Dcx* et *Dclk1* présentent une stratification néocorticale désorganisée et une profonde désorganisation architecturale de l'hippocampe et également des défauts axonaux (Deuel, et al., 2006; Tanaka, Koizumi, & Gleeson, 2006). De même, les souris déficientes en *Dcx* et *Dclk2* arborent notamment une stratification hippocampique désorganisée (Kerjan, et al., 2009). Ainsi, plusieurs études ont souligné le rôle de *Dclk1* et de *Dclk2*, tout comme *Dcx*, dans la régulation de la migration neuronale et de la croissance axonale pendant le développement (Shin, et al., 2013; Friocourt, et al., 2007; Koizumi, Tanaka, & Gleeson, 2006). Shin et collaborateurs (2013) ont ainsi montré que *Dclk1* et *Dclk2* favorisent le remodelage dendritique en augmentant le regroupement des microtubules mais aussi qu'elles participent à la suppression des synapses matures à travers différentes voies et notamment par la réduction de PSD-95. De plus, *Dclk1* et *Dclk2* seraient d'importants régulateurs de la survie neuronale et favoriseraient la régénération axonale après un traumatisme (Nawabi, et al., 2015). En particulier, DCLK1 intervient dans la formation du fuseau mitotique et dans la régulation de la détermination du devenir de la cellule dans les progéniteurs neuronaux corticaux (Shu, et al., 2006).

Les mécanismes de régulation de ces deux protéines ont été très peu étudiés. DCLK1 présente plusieurs variants d'épissage qui présente une localisation et une expression différentielle au cours de la vie embryonnaire et de la vie adulte (Vreugdenhil, et al., 2001; Engels, Schouten, van Dullemen, Gosens, & Vreugdenhil, 2004). DCLK1 est aussi une cible de la calpaïne, protéase libérant le domaine kinase de DCLK1 de son domaine d'accrochage aux microtubules (Burgess & Reiner, 2001). Les mécanismes de régulation de DCLK2 ont été étudiés dans le poisson zèbre (Nagamine, Nomada, Onouchi, Kameshita, & Sueyoshi, 2014). Le domaine kinase de Dclk2 est largement distribué dans le cytoplasme mais dans des conditions de stress cellulaire, celui-ci est relocalisé dans le noyau en perdant un domaine d'auto-inhibition. Dans le noyau, Dclk2 se lie à Jdp2 (Jun dimerization protein 2), un facteur nucléaire de transcription qui devient substrat en présence de certaines histones.

2.3 DCLK3

DCLK3 se différencie de DCLK1 et de DCLK2 par son domaine DCX qui est tronqué. DCLK3 présente également un profil d'expression quasi exclusivement neuronal comparé aux deux autres membres de la sous-famille des DCLKs (<http://www.brainrnaseq.org/>) (Zhang, et al., 2014).

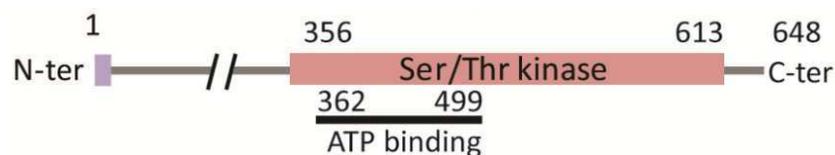


Figure 16. Représentation schématique de DCLK3. DCLK3 possède 2 domaines d'intérêt : un domaine DCX tronqué en N-terminal (en violet) et un domaine sérine/thréonine kinase en C-terminal (en rose).

Cette protéine a été très peu étudiée. Une étude récente a souligné le rôle de DCLK3 comme facteur oncogénique dans le cancer colorectal (Liu, et al., 2017). L'augmentation de l'expression de DCLK3 dans les cellules cancéreuses colorectales a ainsi été associée à une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la transition épithélium-mésenchyme, favorisant l'apparition de métastases tumorales. Ce mécanisme résulte d'un effet à distance d'un polymorphisme nucléotidique dans le promoteur du gène *MLH1* connu pour être associé aux cancers colorectaux. Ce polymorphisme nucléotidique favorise les interactions de la chromatine entre *MLH1* et la région de *DCLK3*.

Une seule étude publiée cette année par notre laboratoire fait état du rôle de DCLK3 dans le cerveau (Galvan, et al., 2018). Le niveau de DCLK3 au sein de cet organe varie d'une région à l'autre avec un niveau d'expression très élevé dans le striatum (Brochier, et al., 2008). En outre, les nouvelles données de transcriptomiques disponibles suggèrent que Dclk3 serait également très exprimée dans le gyrus denté de l'hippocampe (<http://mouse.brain-map.org/gene/show/89317>).

Le niveau de DCLK3 étant très bas chez les patients atteints de la MH et les modèles murins de la MH (Kuhn, et al., 2007; Brochier, et al., 2008; Langfelder, et al., 2016), la diminution endogène de Dclk3 dans les souris surexprimant l'HTT a donc été étudiée (Figure 17). La perte ou souffrance neuronale induite par l'HTT est accélérée dans le striatum des souris exprimant un shARN ciblant Dclk3 (Figure 17 A-B). Un marquage DARPP32 a confirmé que la lésion induite par l'HTT était aggravée par la diminution de Dclk3 (Figure 17 C).

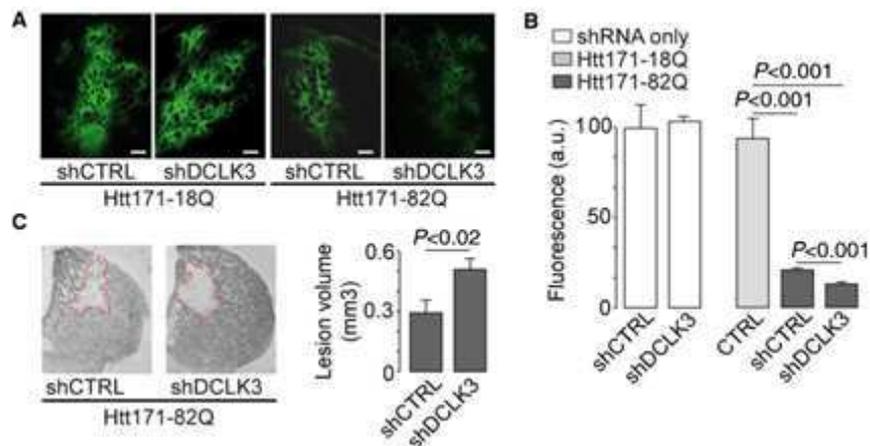


Figure 17. La diminution de Dclk3 augmente la toxicité de l'HTT. Les souris ont été injectées avec des lentivirus codant pour des shARN-GFP ciblant soit Dclk3 (shDCLK3) soit la luciférase en contrôle (shCTRL). (A) Expression de GFP dans le striatum des souris injectées soit avec LV-Htt171-82Q soit LV-Htt171-18Q avec l'un des deux shRNA. (B) La fluorescence a été utilisée comme un index de l'intégrité neuronale 6 semaines après injection. La perte de GFP du à l'injection LV-Htt171-82Q est exacerbée par shDCLK3. (C) Evaluation histologique par un marquage DARPP32. Moyenne \pm SEM (N=7-10/groupe). Tests de Mann-Whitney et de Kruskal-Wallis en B et test de Student en C. Echelle de 0,25 mm en A et 0,5 mm en B. Adapté de (Galvan, et al., 2018).

A l'inverse, la surexpression de Dclk3 dans les neurones striataux diminue la lésion causée par la toxicité de l'HTT (Figure 18). En résumé, la diminution de Dclk3 exacerbe la dégénérescence induite par la toxicité de l'HTT alors que la surexpression de Dclk3 est neuroprotectrice contre la toxicité de l'HTT *in vivo*. Cette activité neuroprotectrice est portée par le domaine kinase qui est nécessaire et suffisant pour assurer cette activité neuroprotectrice (Galvan, et al., 2018).

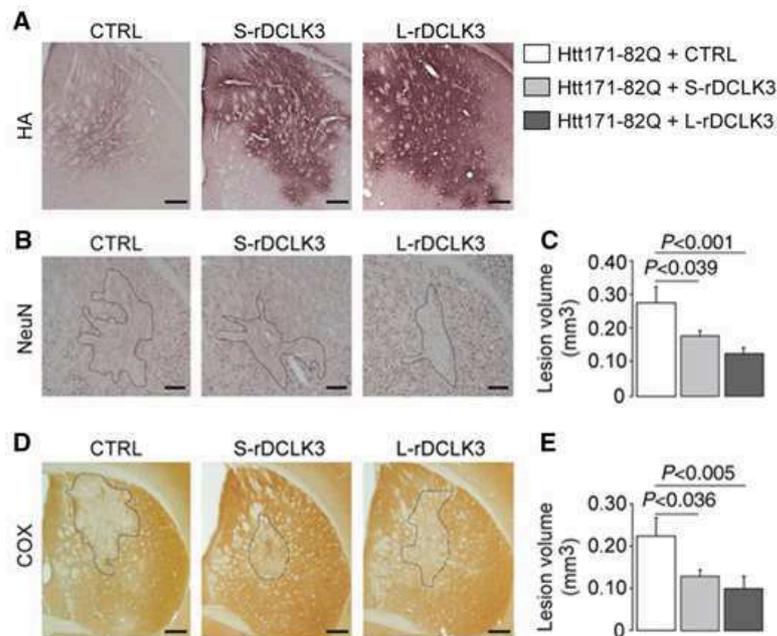


Figure 18. La surexpression de DCLK3-HA diminue la lésion causée par la toxicité de l’Httm. Les souris ont reçu une injection de LV-Htt171-82Q associée à LV-CTRL (LV-LacZ), LV-S-rDCLK3-HA ou LV-L-rDCLK3-HA. 6 semaines après injection, une évaluation histologique a été menée en utilisant différents marqueurs pour évaluer la toxicité de l’Htt171-82Q. Moyenne \pm SEM (N=7-10/groupe). Test d’ANOVA et un test de PLSD Fisher post-hoc. Echelle de 0,2 mm en A, 0,1 mm en B et 0,125 mm en D. Adaptée de (Galvan, et al., 2018).

Cette activité neuroprotectrice a été également observée fonctionnellement dans les souris KI140, modèle murin de la MH (Galvan, et al., 2018). La surexpression de Dcl3 dans ces souris améliore les performances motrices mais aussi contrecarre la perte de poids observée dans ces souris.

DCLK3 serait de plus impliquée dans la régulation de la chromatine et la transcription. En effet, la surexpression du domaine kinase de DCLK3 dans des cellules souches embryonnaires humaines différenciées en neurones striataux entraîne la surexpression de 88 gènes impliqués dans des fonctions nucléosomales et dans le remodelage de la chromatine (Galvan, et al., 2018). Parmi ces gènes surexprimés, des gènes codant pour des histones sont surreprésentés mais également des gènes impliqués dans transcription comme *TAF7* (sous-unité de 55 kDa du facteur d’initiation de la transcription TFIID) et le remodelage de l’état de la chromatine comme *MLL5* et *SUPT3H*. *SUPT3H* est un composant du complexe SAGA (Spt-ada-Gcn5 acetyl transferase). Ce complexe régule la transcription en procédant à la modification post-traductionnelle de certaines histones, notamment par acétylation (Wang, Faiola, Xu, Pan, & Martinez, 2008).

De plus, un criblage par double-hybride a permis d’identifier 7 potentiels partenaires moléculaires du domaine kinase de DCLK3 (Galvan, et al., 2018). Parmi ces potentiels partenaires, TADA3 (transcriptional adapter 3) fait partie également du complexe SAGA.

3 Hypothèse de travail et les objectifs de l'étude

La maladie de Huntington est une maladie neurodégénérative qui se caractérise par une vulnérabilité préférentielle des neurones du striatum à la toxicité de l'Httm. Or, l'Htt est une protéine ubiquitaire. L'Httm seule n'explique pas le caractère régional de la neurodégénérescence.

Nous proposons donc l'hypothèse suivante : les produits de gènes sélectivement exprimés dans le striatum seraient impliqués dans la plus grande vulnérabilité des neurones du striatum à la toxicité de l'Httm.

Pour ce faire, les marqueurs du striatum ont été étudiés (Brochier, et al., 2008) et l'expression de ces marqueurs ont été étudiés dans la MH (Desplats, et al., 2006; Sepers & Raymond, 2014; Hodges, et al., 2008). Plusieurs études ont été menées afin d'étudier leur impact dans la MH (pour revue, (Francelle, Galvan, & Brouillet, 2014)). Parmi ces marqueurs, DCLK3 est une protéine enrichie dans le striatum mais dont l'expression est diminuée dans les modèles animaux de la MH et chez les patients. DCLK3 est une protéine très peu étudiée mais les travaux menés dans notre groupe ont montré que cette protéine jouerait un rôle protecteur dans la MH. En d'autres termes, la perte de la fonction de DCLK3 rendrait les neurones striataux particulièrement vulnérables vis-à-vis de l'Httm.

Au vue des résultats montrant l'implication de DCLK3 dans le remodelage de la chromatine et la transcription, nous avons dans un premier temps déterminé la localisation cellulaire de DCLK3 *in vivo*. Nous avons également développé plusieurs modèles de souris présentant une délétion totale ou sélective de *Dclk3* pour appréhender plus généralement le rôle de la protéine dans le cerveau. En outre, nous avons aussi étudié l'effet d'une délétion locale et aigue de *Dclk3* par injection d'AAV-CRE dans des souris présentant des sites LoxP dans le gène *Dclk3*.

L'objectif global a été de mieux comprendre le rôle de *Dclk3* dans le cerveau, en particulier dans le striatum et dans l'hippocampe et sa régulation afin mieux comprendre la pathogénèse de la MH.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1 Animaux

Les animaux ont été hébergés par groupe de 5 individus maximum dans un environnement gardé à température constante. Les animaux ont été maintenus dans un cycle jour/nuit de 12 heures. La nourriture et l'eau étaient disponibles *ad libitum*. Les études animales ont été menées selon les lois françaises (Directive européenne 2010/63/EU – Loi française du code rural R 214-87 à 131). Les animaleries ont été validées par l'inspection vétérinaire (autorisation N° A 92-032-02) et sont conformes aux normes pour le soin sans cruauté et l'utilisation des animaux de laboratoire du Bureau de la protection des animaux de laboratoire (OLAW –N° #A5826-01). L'ensemble des procédures ont été approuvées par un comité d'éthique local (Comité d'éthique en expérimentation animale CEA) et par le ministère français chargé de l'enseignement supérieur et de la recherche [N° 2015060417243726vl (APAFIS#770)].

2 Génération des souris modifiées au niveau du gène *Dclk3*

2.1 Génération des souris *Dclk3* conditionnelle (*Dclk3^{flox/flox}*)

Les souris Dclk3^{flox/flox} ont été générées par la société Genoway.

En se basant sur la séquence d'ADNc NM_172928, la séquence d'introns et d'exons du gène *Dclk3* a été établie révélant 5 exons, deux codons d'initiation de la traduction situés sur les exons 1 et 2, un codon stop localisé sur l'exon 5 et une séquence consensus de signal de polyadénylation dans la région 3'UTR. En conséquence, deux isoformes de *Dclk3* existent donc :

- La première isoforme correspond au premier codon d'initiation situé sur l'exon 1 et code pour une protéine de 790 AA (ADNc : AK135010, protéine : Q8BWQ5)
- La deuxième isoforme correspond au codon d'initiation situé sur l'exon 2 et code pour une protéine de 619 AA (ADNc : BC056929, protéine : AAH56929)

En conséquence, la délétion conditionnelle de l'exon 2 du gène *Dclk3* a été choisie comme stratégie de ciblage pour entraîner un décalage du cadre de lecture (Figure 19).

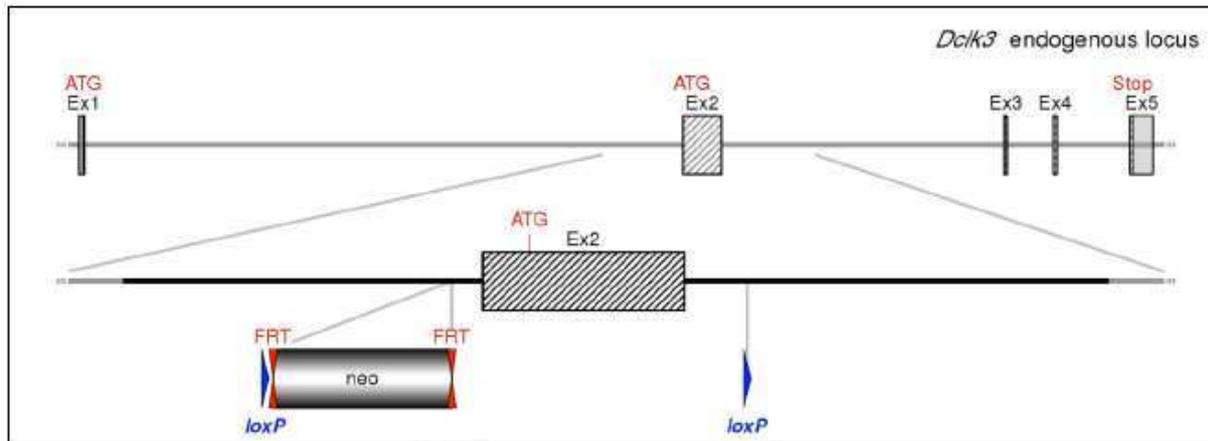


Figure 19. Représentation schématique de la stratégie de ciblage utilisé. Les rectangles hachurés représentent les séquences codantes du gène *Dcl3*, les rectangles gris représentent les portions d'exons non codants.

Ce modèle a été généré par recombinaison homologue dans des cellules souches embryonnaires. Un vecteur de ciblage contenant des régions homologues à la séquence d'ADN génomique de *Dcl3* a donc été construit. Ce vecteur de ciblage comprend des régions homologues au fond génétique C57BL/6N, une longue région homologue à *Dcl3* de 7 kb, une courte région homologue de 1,8 kb et l'insertion de deux sites *LoxP* de chaque côté de l'exon 2 de *Dcl3*.

Les souris obtenues ont été croisées avec des souris C57BL/6 flox deleter pour enlever la cassette néomycine afin d'obtenir des souris *Dcl3* conditionnelle dont la cassette néomycine a été excisée (Figure 20). Les descendants ont été génotypés et l'excision a été validée par Southern blot.

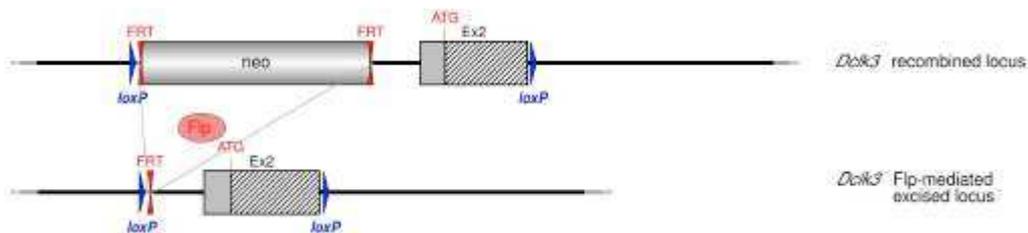


Figure 20. Représentation schématique de l'excision de la cassette néomycine. Les rectangles hachurés représentent les séquences codantes du gène *Dcl3*, les rectangles gris représentent les portions d'exons non codants.

Par rapport aux cellules ES (clones) qui existaient par ailleurs (COMP consortium), et qui ont été générées de manière similaire mais avec la cassette restant dans l'intron et insérée de manière aléatoire, l'approche ici suivie, permet d'éviter une potentielle perturbation dans cette région de l'ADN notée comme étant une « région régulatrice » (communication personnelle, GenOway).

2.2 Génération des souris déficientes en Dclk3 (KO Dclk3 constitutif)

Les souris Dclk3 déficientes constitutivement en Dclk3 ont été générées par la société Genoway.

Des souris Dclk3^{flox/flox} ont été croisées avec des souris C57BL/6 Cre deleter avec la Cre recombinase sous promoteur CMV (Cytomégalo virus) pour obtenir des souris hétérozygotes portant un allèle KO Dclk3. Les descendants ont été génotypés par PCR et l'excision a été vérifiée par Southern blot. Ces descendants ont croisées entre eux pour obtenir lignée KO Dclk3 constitutive. Les souris générées ont également été génotypées par PCR et leur génotype a été confirmé par Southern blot.

2.3 Génération des souris déficientes en Dclk3 uniquement dans le striatum

Les souris Dclk3^{flox/flox} homozygotes et hétérozygotes ont été croisées avec des souris Rgs9-cre hétérozygotes. Puis, les souris Dclk3^{flox/flox} / Rgs9-cre double-hétérozygotes ont été croisées avec des souris Dclk3^{flox/flox} homozygotes pour obtenir des souris KO Dclk3 dans le striatum.

La lignée Rgs9-cre a été produite par des méthodes de ciblage génétique (Dang, et al., 2006). Le gène cre a été inséré à l'extrémité 3' du gène *Rgs9*. Cette souris cre spécifique au striatum a été produite en tenant compte du profil d'expression restreint de la protéine RGS9-2, variant du produit d'épissage du gène *Rgs9* qui est exprimé majoritairement dans le striatum. La spécificité striatale a été confirmée par Dang et collaborateurs (2006) par croisement de ces souris avec des souris Rosa26 reporter qui ont un gène *LacZ* fonctionnel uniquement dans les cellules où une recombinaison séquence spécifique par la cre a eu lieu.

La lignée Rgs9-cre a été obtenue par la collaboration de Rui Costa et de son laboratoire Fundação Champalimaud, Centro Champalimaud.

2.4 Génotypage des souris

Après prélèvement d'un bout de queue sous isoflurane, l'ADN génomique a été extraite puis amplifié par PCR en utilisant un kit de génotypage (Mouse genotyping kit, Kapa Biosystems, Wilmington, MA). Les amorces utilisés sont notées dans le Tableau 5 et ont été conçues par Genoway pour le gène *Dclk3* et par Champalimaud pour la *Cre*. Les produits de PCR ont été déposés sur un gel d'agarose à 3 % puis séparés par électrophorèse. Deux PCR ont été réalisées pour amplifier la CRE. La taille des fragments attendus sont également renseignées dans le Tableau 5.

Tableau 5. Amorces utilisées pour le génotypage et produits de PCR attendus.

Gène	Amorces utilisés	Produit de PCR
Dclk3 conditionnel	CGCTTTCAATTAGAGCTTTAGCACCTCC	201 bp (WT)
	CCCTCCCAGTTTTGTAGAGTAAATAGGAACG	313 bp (KO conditionnel)
Dclk3 KO	CAGCGCACACTGAGAAGCAGTTGATAT	213 bp (WT)
	GCACGCTTTCAATTAGAGCTTTAGCACC	168 bp (KO)
	ATGTGAAGTTTTCCAGAGCCCGAGG	
CRE	GGTTTCCCGCAGAACCTGAA	300 bp (WT)
	AGCCTGTTTTGCACGTTTACC	150 bp (CRE)
	GGTCCTCACTGGCAGCAGCTGCA	
	CCTAGCACCCACCCAAAGAGCTG	
CRE	CACTCATGGAAAATAGCGATC	aucun (WT)
	ATCTCCGGTATTGAAACTCCAGCGC	500 pb (CRE)

WT : wild-type ; KO : knockout

3 Infections virales

3.1 Conception plasmidique

Le plasmide contenant la Cre recombinase a été synthétisé par la technologie Gateway (Invitrogen, Life Technologies). Le promoteur et le transgène flanqués de séquences attB ont été produits par PCR et ont été intégrés dans un pDONR approprié par BP-recombinaison en utilisant une BP-clonase (Invitrogen, Life technologies, Saint-Aubin, France). Le plasmide obtenu de type pENTR contenant un gène de résistance à la kanamycine a été transformé dans des bactéries *Escherichia coli* de type DH10 β par électroporation. Les colonies ont été isolées sur des boîtes de Pétri de type LB-agar-kanamycine (Invitrogen). Après amplification sur un milieu LB contenant de la kanamycine, le plasmide pENTR a été purifié (Kit Monarch miniprep, #T1010L, New England, Biolabs). Après séquençage, la cassette d'expression a été transférée dans un vecteur pDEST contenant des séquences ITR (Inverted Terminal Repeat) et un gène de résistance à l'ampicilline par recombinaison de type LR. Le plasmide pAAV obtenu a été transformé comme précédemment puis les colonies ont été sélectionnés sur des boîtes de Pétri de type LB-agar-ampicilline (Invitrogen). Après amplification sur un milieu LB contenant de l'ampicilline, le plasmide a été purifié et séquencé comme précédemment. Le pAAV final est amplifié dans un milieu LB contenant l'ampicilline et purifié (kit Nucleobond Xtra EF Maxiprep, #740424, Macherey-Nagel, Allemagne) pour la production d'AAV. Le pAAV obtenu porte un transgène Cre-IRES-GFP sous promoteur CBA

3.2 Production d'AAV

Les particules virales ont été produites par la co-transfection transitoire des cellules HEK-293 avec un plasmide auxiliaire d'adénovirus, un plasmide d'encapsidation AAV portant les gènes *rep* et *cap* et le plasmide pAAV contenant la cassette d'expression décrite ci-dessus. Le sérotype 9 a été choisi pour cibler les neurones. Les particules virales ont été purifiées 72 h après transfection. Les cellules

ont été lysées d'un côté (cycle de congélation/décongélation et ajout de tampon de lyse) et les particules présentes dans le surnageant ont été précipité grâce au PEG. Puis le culot issu des cellules et du surnageant ont été réunis afin d'être purifié sur un gradient de iodixanol (Sigma, Etats-Unis) et ultracentrifugation. Les AAV ont ensuite été concentrés sur colonne Amicon (Millipore, Etats-Unis) après plusieurs rinçages en PBS pluronique.

La concentration des particules virales a été déterminée par PCR quantitative comme décrit dans (Aurnhammer, et al., 2012) et a été exprimé en nombre de génome viral par mL (vg.mL⁻¹).

3.3 Injections stéréotaxiques

Pour les injections stéréotaxiques intracérébrales, les animaux ont été anesthésiés en intrapéritonéal (100 mg.kg⁻¹ de kétamine et 10 mg.kg⁻¹ de xylazine) en incluant une anesthésie locale sous-cutanée de lidocaïne (5 mg.kg⁻¹). Pendant la chirurgie, la température corporelle des animaux a été contrôlée grâce à une couverture chauffante (CMA 450 Temperature Controller ; Phymep, Paris, France) et les yeux ont été protégés par du gel ophtalmique (Lacrigel®). Le vecteur AAV codant pour la Cre recombinase a été dilué dans une solution de PBS/acide pluronique pour obtenir une concentration finale de 87,8 vg.µL⁻¹. Un volume de 1,5 ou 2 µL de suspension d'AAV ont été injectés par site dans le gyrus denté et dans le striatum selon les coordonnées stéréotaxiques du Tableau 6 en utilisant une seringue de calibre 34 Gauges reliée à une seringue Hamilton de 10 µL par un cathéter de polyéthylène. Deux sites d'injection ont été utilisés pour les tests de comportement afin de favoriser un plus grand volume de délétion dans le striatum. La vitesse d'injection a été réglée à 0,2 µL.min⁻¹. Après l'injection, les canules sont laissées en place pendant 5 min avant de les enlever. La peau a été suturée puis les animaux ont été placés dans une chambre ventilée et maintenue à 30°C jusqu'à leur réveil. Du paracétamol a été ajouté à l'eau de boisson (Dopliprane®) pendant 48 h (1.6 mg.mL⁻¹).

Tableau 6. Coordonnées d'injection stéréotaxique selon la zone ciblée.

	SITE 1				SITE 2				Volume d'injection/site
	AP	ML	V	BG	AP	ML	V	BG	
Striatum simple site	+1	±2,0	-2,7	0	-				2 µl
Striatum double site	+1	±2,0	-3,4	0	-0,2	±2,5	-3,1	0	1,5 µl
Gyrus denté	-2,4	±1,5	2	0	-				2 µl

Unités : en mm. Pour chaque site, injection en bilatérale. Référence latérale : bregma. Référence ventrale : l'os. AP : antéro-postérieur, ML : médio-latéral, V : ventral, BG : barre de gueule

Après chirurgie, l'incision a été refermée grâce à des agrafes puis les animaux ont été placés dans une boîte de réveil ventilé à 30°C pendant 1 à 2 h jusqu'à leur réveil complet. Le paracétamol (Doliprane®, 1,6 mg.mL⁻¹) a été administré pendant 48 h dans l'eau de boisson comme traitement analgésique post-chirurgie.

4 Groupes expérimentaux

Le Tableau 7 représente les différents groupes expérimentaux utilisés dans notre étude et leurs caractéristiques.

Tableau 7. Groupes expérimentaux étudiés.

Groupes de souris KO Dclk3 de manière constitutive			
	1 ^{ère} cohorte	2 ^{ème} cohorte	3 ^{ème} cohorte
Sexe	Mâle	Mâle	Femelle
N / groupe	11 WT ; 16 KO	15 / groupe	14 WT ; 15 KO
MWM	3 Mo	6 Mo	6 Mo
Rotarod	3 Mo	6 Mo	6 Mo
EPM	3 Mo	6 Mo	6 Mo
Phenotyper	3 Mo	6 Mo	6 Mo
Climbing cage	4 Mo	6,5 Mo	6 Mo
Open Field	4 Mo	6,5 Mo	6 Mo
Catwalk	4 Mo	7 Mo	6,5 Mo
IRM	5 Mo	-	12 Mo
Sacrifice	6 Mo	-	12,5 Mo
Groupe de souris déficientes en Dclk3 dans le striatum			
	1 ^{ère} cohorte	2 ^{ème} cohorte	
Sexe	Mâle	Mâle	
N / groupe	8 Dclk3 ^{flox/flox} ; 9 Dclk3 ^{flox/flox} / cre	11 Dclk3 ^{flox/flox} ; 13 Dclk3 ^{flox/flox} / cre	
Phenotyper	6 Mo	12 Mo	
Open Field	6 Mo	12 Mo	
Climbing cage	6 Mo	12 Mo	
Rotarod	6 Mo	12 Mo	
Catwalk	7 Mo	13 Mo	
IRM	8 Mo	Prévu à 18 Mo	
Sacrifice	8 Mo	Prévu à 18 Mo	
Groupe de souris Dclk3 ^{flox/flox} injectées avec de l'AAV-cre			
	Injection striatale	Injection hippocampique	
Sexe	Mâle	Mâle/femelle	
N / groupe	12 WT ; 14 Dclk3 ^{flox/flox}	11 WT ; 12 Dclk3 ^{flox/flox}	
Injection	6 Mo	4 Mo	
Comportement	8 Mo	6 Mo	
Sacrifice	8 Mo	7,5 Mo	

Les tests ont été effectués dans l'ordre présentés. Les couleurs utilisées servent de repères pour les graphiques présentés par la suite. MWM : piscine de Morris ; EPM : *elevated plus maze* (labyrinthe en croix surélevé) ; IRM : Imagerie par résonance magnétique ; Mo : mois ; WT : wild-type ; KO : knockout

5 Analyses comportementales

Tous les animaux ont été testés pendant la phase diurne de leur cycle jour/nuit. Les animaux ont été tous manipulés uniquement par l'expérimentateur pendant les tests comportementaux. Avant toute session de comportement, les animaux ont été habitués à l'expérimentateur pendant 5 jours, 2 min/souris.

5.1 Piscine de Morris

La piscine de Morris a permis d'explorer la mémoire spatiale des souris. La piscine était un grand bac d'eau circulaire blanc (122 cm de diamètre) remplie d'eau (21-22°C) rendue opaque avec de la peinture à l'eau. Pendant toute l'expérience, la luminosité de la pièce a été gardée à 400 lx. Les déplacements des souris ont été enregistrés grâce à une caméra au plafond et ont été analysés par le logiciel EthoVision XT 11.5 (Noldus, Pays-Bas).

Pour s'assurer de la bonne vue des souris et de leurs aptitudes motrices, les souris ont été entraînées lors de la tâche dite de la plateforme visible à trouver une plateforme (10 cm de diamètre) située à 0,5 cm au-dessus du niveau de l'eau et signalée par un objet coloré. La salle a été vidée de tout signe distinctif. Les souris ont alors été entraînées pendant 4 essais espacés de 30 min. Pour chaque essai, la localisation de la plateforme et le point de départ ont été modifiés (Départ-localisation de la plateforme : NE-O, SE-SO, SO-N, NO-S). Si la souris ne trouvait pas la plateforme, elle était guidée par l'expérimentateur puis elle restait sur la plateforme pendant 30 s. Le temps pris par la souris pour trouver la plateforme pendant chaque essai a été enregistré.

Pendant la phase d'entraînement, la même plateforme d'échappement a été immergée 0,5 cm en-dessous du niveau de l'eau et a été placée dans le quadrant nord-est. Des indices géométriques noirs ont été placés sur les murs blancs de la salle. Chaque souris a été entraînée pendant 5 jours avec 3 essais espacés de 30 min chaque jour. Le point de départ des souris changeaient à chaque essai pour que la souris ne retienne pas le trajet pour trouver la plateforme mais pour qu'elle s'appuie sur les indices (Tableau 8). Si la souris ne trouvait pas la plateforme, elle était guidée par l'expérimentateur puis elle restait sur la plateforme pendant 30 s. Le temps pris par la souris pour trouver la plateforme pendant chaque essai a été enregistré.

Tableau 8. Point de départ des souris lors de la phase d'entraînement.

	Essai 1	Essai 2	Essai 3
Jour 1	Sud-est	Sud-ouest	Ouest
Jour 2	Est	Ouest	Sud
Jour 3	Nord	Sud-ouest	Nord-ouest
Jour 4	Sud	Sud-est	Nord
Jour 5	Ouest	Est	Nord-ouest

La tête de la souris est orientée vers l'expérimentateur.

Le test de mémorisation a eu lieu 72 h après le dernier jour d'entraînement. La plateforme a été retirée de la piscine de Morris. Les souris ont été déposées dans le quadrant sud-est soit à l'opposé du quadrant où se trouve la plateforme théoriquement. Les déplacements des souris ont été enregistrés pendant 1 min. 4 quadrants artificiels (Nord-est, sud-est, sud-ouest et nord-ouest) ont été

déterminés et le temps passé dans chaque quadrant et la fréquence de croisement de la plateforme ont été analysés.

5.2 Rotarod

Le test du Rotarod a permis d'évaluer la coordination motrice et les capacités d'apprentissage moteur des souris. Les souris ont été testées sur 3 jours consécutifs. Chaque session quotidienne comprenait une séquence d'entraînement à 4 rpm pendant 2 min sur un appareil de rotarod (Ugo basile biological research Rota-Rod pour souris, Référence 47600V04). Au minimum 45 min après la séquence d'entraînement, les souris étaient testées sur 3 essais consécutifs de 5 min maximum avec une vitesse croissante de 2 à 40 rpm. Chaque essai était également espacé de 45 min minimum. Pour chaque essai, la latence de chute a été enregistrée.

5.3 Labyrinthe en croix surélevé

Le labyrinthe en croix surélevé a permis d'étudier l'anxiété des souris. Le dispositif comprend 4 bras surélevés de 40 cm au-dessus du sol : 2 bras appelés bras fermés ont des murs de 15 cm de hauteur et 2 bras appelés bras ouverts n'ont pas de mur. Chaque souris a été placée au centre du dispositif en face d'un bras ouvert puis leurs déplacements ont été enregistrés avec une caméra située au plafond pendant 6 min. Le temps passé dans chaque type de bras a été automatiquement enregistré et calculé par le logiciel EthoVision XT 11.5 (Noldus, Pays-Bas). Le temps passé à se pencher au-dessus des bras ouverts a été manuellement enregistré.

5.4 Cage d'activité

La cage d'activité a permis d'explorer l'activité spontanée des souris et leur rythme circadien dans un environnement similaire à leur cage d'hébergement. L'activité des souris a été enregistrée pendant 47 h en utilisant une cage d'activité (PhenoTyper®, Noldus, Pays-Bas) équipée d'une caméra et d'un système infra-rouge dans le couvercle mais aussi d'un biberon et d'un réservoir à nourriture. La nourriture et l'eau étaient disponibles ad libitum. Les déplacements des souris ont été analysés par le logiciel EthoVision XT 10 (Noldus, Pays-Bas). La distance parcourue par heure a ainsi été calculée automatiquement par le logiciel et a ensuite été analysée.

5.5 Open Field

Le test de l'*Open Field* a été utilisé pour étudier l'activité locomotrice spontanée, le comportement d'exploration et l'anxiété dans un espace clos. Les animaux étaient placés au centre d'une arène en plexiglas (50 x 50 x 40 cm) placée dans une salle lumineuse (100 lx) et ils étaient libres de l'explorer pendant 10 min. Avant chaque animal, l'arène a été nettoyée avec de l'alcool 10 %. Les déplacements des souris ont été enregistrés par une caméra au plafond et ont été analysés en utilisant

le logiciel EthoVision XT 11.5 (Noldus, Pays-Bas). Le temps passé au centre, la fréquence de passage au centre, la distance parcourue ont été automatiquement calculés par le logiciel. Les comportements de toilettage, de rearing (comportement pendant lequel l'animal se tient sur ses pattes arrière) et de défécation ont été enregistrés manuellement.

6 IRM anatomique et spectroscopie par résonance magnétique à proton

6.1 Acquisition

L'IRM à haute résolution et les expériences de spectroscopie ont été réalisées sur un scanner horizontal Bruker de 11,7 T (Bruker, Ettlinge, Allemagne) à l'aide d'une antenne cryogénique. Les souris ont été anesthésiées sous isoflurane à 3 % associé à un mélange d'air et de dioxygène (1 : 1) et ont été positionnées dans un cadre stéréotaxique avec des barres buccales et auriculaires pour empêcher tout mouvement durant les acquisitions. La température des souris a été maintenue à 37°C par un flux d'eau régulé et la fréquence respiratoire a été surveillée en permanence en utilisant le logiciel PC SAM (Small Animal Instruments, Inc., Stony Brook, New-York, Etats-Unis) pendant les enregistrements. Le niveau d'isoflurane a été ajusté à 1,5 % approximativement pour maintenir une fréquence respiratoire entre 60 et 80 respirations par minute. Une cryosonde en quadrature (Bruker, Ettlinger, Allemagne) a été utilisée pour la transmission de radiofréquence et la réception.

Des images anatomiques de haute résolution avec une séquence MSME (Multi Slices Multi Echoes (TE/TR = 5/10000 ms, 17 echoes, TE effectif : 45 ms, résolution dans le plan : 100 x 100 μm^2 , 100 coupes avec une épaisseur de 200 μm , temps d'acquisition de 20 min) acquises dans un plan coronal ont été utilisées pour délimiter précisément les différentes structures. Les mêmes images à haute résolution ont été utilisées pour positionner avec précision un voxel de 2 x 2 x 2 mm^3 dans le striatum gauche et un voxel de 2,5 x 1,5 x 2 mm^3 dans l'hippocampe gauche.

Les acquisitions de spectroscopie par résonance magnétique ont été réalisées en utilisant une séquence de type LASER (Localization by Adiabatic Selective Refocusing) (Temps écho / temps de répétition = 20/5000 ms combinés à la suppression d'eau de type VAPOR). Le spectre des métabolites a été acquis en utilisant 128 répétitions pour une acquisition totale de 10 min par voxel.

6.2 Quantification des métabolites

Le logiciel LCModel (Provencher, 1993) a été utilisé pour analyser les spectres et pour déterminer la concentration des différents métabolites. Les métabolites suivants ont été précisément quantifiés (Limite de Cramér-Rao < 5 % dans toutes les expériences): la choline totale

(glycérophosphocholine + phosphocholine + choline), la créatine totale (créatine + phosphocréatine), le glutamate, la glutamine, le myoinositol, le N-acétyl-aspartate + le N-acétyl-aspartyl-glutamate total et la taurine. La concentration des métabolites a été normalisée avec la créatine totale à 8 mM.

7 Biologie moléculaire

7.1 Extraction des ARN totaux

Les souris ont été euthanasiées par dislocation cervicale. Le striatum a été disséqué par punch sous microscope à fluorescence afin d'extraire seulement la zone infectée par le virus. Les punches de tissus ont été transférés dans 500 μL de TRIzol (Life sciences) puis le tissu a été dissocié dans un broyeur de tissus de type Precellys® (Bertin technologies) à 5000 rpm pendant 20 s. 100 μL de chloroforme (Merck) ont ensuite été ajoutés et mis à incuber avant centrifugation à 12000 g pendant 15 min à 6°C. La phase supérieure aqueuse a été récupérée et 20 μg de glycogène ont été ajoutés afin de distinguer le culot d'ARN. 250 μL d'isopropanol (VWR) ont ensuite été ajoutés, incubés pendant 5 min avant centrifugation à 12000 g pendant 15 min à 6°C. Le surnageant a été éliminé et le culot a été lavé avec 500 μL d'éthanol à 75 % par deux fois par centrifugation à 7600 g pendant 5 min à 6°C. Au dernier lavage, le surnageant a été éliminé et les ARN ont été mis à sécher pendant 5 min avant addition de 20 μL d'eau exempt de RNase/DNase (Gibco). La quantité et la qualité des ARN ont été analysées au bioanalyseur (Agilent technologies).

7.2 Synthèse d'ADNc

1 μg d'ARN a été traité à la RQ1 DNase (Promega) pour éliminer l'ADN génomique selon le protocole du fabricant. Les ARN ont ensuite été dilués dans un tampon de dilution composé de 980 μL de TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM), 20 μL de DTT (Invitrogen) et 1 μL de RNasin (Promega) pour obtenir une concentration de 15 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$. 350 ng d'ARN ont ensuite été traités pour synthétiser de l'ADNc en utilisant le kit de Vilo Superscript (Life technologies) selon le protocole du fabricant. Les ADNc ont ensuite été dilués dans un mélange d'eau/BSA (Albumine de sérum bovin) pour obtenir une concentration finale de 0,875 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$.

7.3 PCR quantitative (qPCR)

Dclk3 a été quantifié par qPCR grâce au mix de iTaq Universal SYBR Green Supermix (Biorad) selon le protocole du fabricant en ayant 3,5 ng d'ADNc par réaction. L'amplification a été faite par un thermocycler (BioRad CFX 96) selon le programme suivant : 3 min à 95°C, dénaturation à 95°C pendant 10 s, hybridation et polymérisation à 95°C pendant 30 s, répétition 40 fois. La quantité d'ARN a été mesurée par la méthode de $\Delta\Delta\text{Ct}$. Puis la quantité de Dclk3 a été normalisée par le gène normalisateur de la cyclophiline.

8 Histologie

8.1 Immunohistochimie sur coupe en paraffine

Le cerveau de singes contrôles de type *Macaca fascicularis* fixés avec 4 % de paraformaldéhyde (PFA) ont été utilisés par la suite.

Après déparaffinage, les coupes ont subi un traitement au citrate pH 6 à 95°C pendant 20 min pour démasquer les sites antigéniques. Après rinçage, les peroxydases endogènes ont été désactivées par un traitement au peroxyde d'hydrogène à 3 % pendant 10 min. Après lavage, les sites aspécifiques ont été bloqués par 5 % de BSA dans du PBS. Les coupes ont ensuite été incubées dans du PBS contenant 5 % BSA et l'anticorps anti-DCLK3 (1 :100, lapin, 2189002, Novus biologicals) pendant 1 h. Après rinçage, les coupes ont été incubées pendant 30 min avec l'anticorps secondaire biotinylé (1 :500, BA-1000, Vector laboratories). Après incubation avec le kit ABC Vectastain Elite (Vector laboratories), la fixation de l'anticorps a été détectée par la DAB (Vector laboratories).

8.2 Immunofluorescence sur coupe flottante

Des sections coronales de striatum de 40 µm d'épaisseur ont subi un traitement au citrate pH 6 à 75°C pendant 20 min. Après rinçage, les sites aspécifiques ont été bloqués par une solution de PBS contenant 4,5 % de NGS (Normal goat serum) et 0,2 % Triton™ X-100 pendant 30 min. Les coupes ont été ensuite incubées toute la nuit à 4°C dans l'anticorps anti-NeuN (1 : 1000, souris, Millipore) dilué dans une solution de PBS avec 3 % NGS et 0,2 % Triton™ X-100. Après rinçage, les coupes ont été incubées toute la nuit à 4°C dans l'anticorps anti-DCLK3 (1 : 150, 2189002, Novus biological) dilué dans une solution de PBS avec 3 % NGS et 0,2 % Triton™ X-100. Pour amplifier le signal du au marquage de DCLK3, le kit de Tyramide Signal Amplification (Life Technologies) a été utilisé selon le protocole associé. Après rinçage, les coupes ont été incubées pendant 1 h dans une solution de PBS contenant 3 % NGS et un anticorps secondaire anti-IgG souris conjugué à un Alexa Fluor® 488 (1 :1000, chèvre, Life Technologies). Après rinçage, les coupes ont été incubées dans du DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) dilué au 2000^{ème} dans du PBS pendant 10 min. Après rinçage, les coupes ont été montées entre lame et lamelle.

8.3 Immunohistochimie sur coupe flottante

Les sections coronales de souris de 30 µm d'épaisseur ont subi un traitement au peroxyde d'hydrogène à 0,3 % pour bloquer les peroxydases endogènes. Le blocage des sites aspécifiques et l'incubation de l'anticorps primaire (NeuN, 1 : 5000, souris, Millipore, MAB377 ou GFAP, 1 : 30000, lapin, Dako, Z0334) ont été réalisés comme précédemment. Après rinçage, les coupes ont été incubées pendant 1 h dans une solution de PBS contenant 3 % NGS et un anticorps secondaire anti-IgG biotinylé

adapté à l'espèce de l'anticorps primaire (1 : 500, anti-Ig souris ou anti-IgG lapin, Vector laboratories, Burlingame, USA). Après lavage, le marquage a été amplifié par un complexe ABC avidine-biotine (Vector laboratories, Burlingame, USA) pendant 1 h selon le protocole du fournisseur. Après lavage, le marquage est révélé par un kit de révélation DAB (KPL, Gaithersburg, USA) selon les recommandations du fournisseur.

9 Analyse statistique

Le logiciel Statistica version 13 (Systat Software, Inc.) a été utilisé pour l'analyse statistique de toutes les données. Les données analysées par l'ANOVA et le test t de Student ont été testés pour la normalité et l'homogénéité des variances avec le test de Shapiro-Wilks et le test de Levene respectivement. Puis une analyse Post-Hoc de comparaisons multiples de type Fisher LSD a été réalisée. Quand la normalité a été respectée mais pas l'homogénéité des variances, le test t de Welch a été utilisé. Quand les deux hypothèses n'ont pas été respectées, les données ont soit été transformés mathématiquement par une fonction racine soit une analyse non-paramétrique avec le test de Kruskal-Wallis suivi du test de Mann-Whitney a été employée. Dans certaines conditions appropriées, l'ANOVA en mesures répétées a été utilisée après que la normalité, la sphéricité des données et l'homogénéité des variances aient été vérifiées par le test de Shapiro-Wilks, le test de Mauchly et le test de Levene respectivement. Cependant, certaines données ne respectaient pas l'hypothèse de sphéricité ou de normalité, les tests multivariés ont été utilisés. Le niveau α a été établi à $p < 0,05$ pour tous les tests.

RÉSULTATS

1 DCLK3 est une protéine nucléaire dans les neurones striataux *in vivo*

Pour comprendre le rôle de DCLK3, nous avons déterminé la localisation de DCLK3 *in vivo* dans le cerveau de primates non-humains en utilisant un anticorps ciblant DCLK3. Plusieurs anticorps commerciaux ont été testés dans un premier temps en Western Blot sur extraits de cellules surexprimant Dclk3 ou à l'aide d'extrait de cerveaux de macaques. Un seul anticorps a montré une bonne spécificité (Ab 2189002, Novus biological) soit une reconnaissance de bandes sélectives dont la bande de DCLK3 pleine longueur (humain et primates non-humain) et une extinction du signal par pré incubation avec la protéine DCLK3 recombinante fabriquée et purifiée (Proteogenix). Confirmant la spécificité de l'anticorps Ab 2189002, la détection par immunofluorescence de Dclk3 de rat dans des cultures primaires de neurones cortico-striataux est abolie par pré-incubation de de l'anticorps avec la protéine recombinante.

Nous avons réalisé une immunohistochimie sur des coupes en paraffine passant par le noyau caudé et le putamen de macaques. Les résultats montrent la localisation nucléaire de DCLK3 dans les neurones du striatum (Figure 21 A, 2 flèches du bas). Le marquage DCLK3 est également présent dans le cytoplasme de certains neurones (Figure 21 A, flèche du haut). Deuxièmement, un marquage par immunofluorescence a été réalisé sur des coupes flottantes de caudé-putamen de macaques. L'analyse du marquage par microscopie confocale a montré la présence de DCLK3 dans le noyau des neurones positifs pour le marquage NeuN qui est un marquage neuronale (Figure 21 B-C). L'absence d'anticorps ou la pré-incubation de l'anticorps avec la protéine recombinante annule le signal observé (données non montrées).

DCLK3 est donc une protéine nucléaire dans les neurones du striatum *in vivo*.

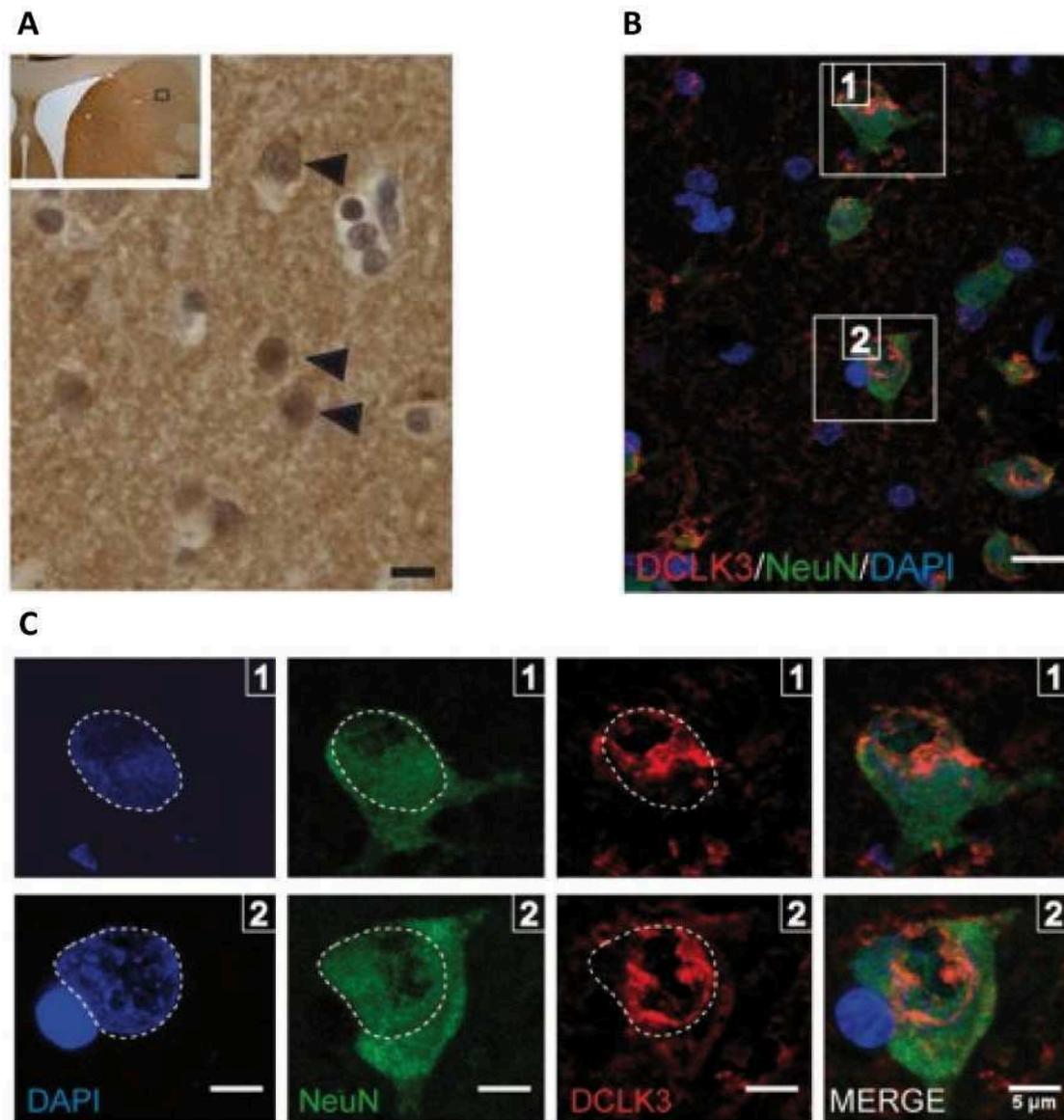


Figure 21. Localisation nucléaire de DCLK3. (A) Marquage immunohistochimique de DCLK3 *in vivo* dans le caudé de primate non-humain en utilisant un anticorps anti-DCLK3 (2189002) : localisation nucléaire (2 flèches du haut) et cytoplasmique (flèche du bas). (B) Image confocale du co-marquage DCLK3 (en rouge), NeuN (en vert) et de l'ADN nucléaire (en bleu) dans les neurones striataux. (C) Agrandissement de deux cellules de l'image (B). Le périmètre du noyau est délimité en pointillé. Echelle de 10 μm en A et de 5 μm en C.

2 Caractérisation des modèles murins déficients en Dclk3

2.1 Délétion constitutive de Dclk3 (KO Dclk3)

L'entreprise Genoway a développé un modèle de souris déficientes en Dclk3 de manière constitutive en croisant les souris $Dclk3^{lox/lox}$ avec des souris CMV-cre. La délétion du gène a été vérifiée par Southern blot par Genoway. Nous avons évalué le phénotype comportemental de ces souris en testant premièrement le phénotype général comme le cycle jour/nuit et l'anxiété. Puis, nous avons étudié les capacités motrices et les capacités de mémorisation spatiale. Enfin, nous avons

caractérisé le profil métabolique de ces souris par spectroscopie par résonance magnétique. Trois cohortes de souris ont permis d'évaluer le phénotype de ces souris à différents âges et selon le sexe.

2.1.1 Les souris constitutivement déficientes en Dclk3 (KO Dclk3) ne présentent pas de perturbations du cycle circadien ni d'anxiété

Nous avons étudié le rythme circadien et l'activité spontanée sur 47 h en utilisant une cage d'activité de type PhenoTyper® (Noldus, Pays-Bas) dans les souris KO mâles à 3 et 6 mois et dans les souris KO femelles à 6 mois. Aucune différence n'est observée dans le rythme circadien des souris constitutivement déficientes en Dclk3 à 3 et 6 mois aussi bien chez les mâles que chez les femelles (Figure 22 A, C, E). Ainsi, toutes les souris maintiennent bien une activité plus importante la nuit comparée à leur activité le jour. L'activité spontanée sur 24 h dans un environnement connu (2^{ème} jour du PhenoTyper) a aussi été enregistrée. Les souris déficientes en Dclk3 ne présentent pas une activité spontanée ralentie ou augmentée comparée aux souris WT (Figure 22 B, D, E).

Le rythme circadien a été comparé selon l'âge des souris mâles (Figure 22 A, C). L'activité des souris est globalement diminuée à 6 mois par rapport à 3 mois (ANOVA en mesures répétées, $p < 0,000001$ pour heures x âge) mais l'activité spontanée des souris n'est pas modifiée avec le génotype selon l'âge (ANOVA en mesures répétées : $p = 0,95$ pour heures x âge x génotype).

Le rythme circadien est également modifié selon le sexe des souris (Figure 22 C, E). En effet, les femelles ont une activité plus importante que les mâles aussi bien le jour que la nuit (ANOVA en mesures répétées, $p < 0,000001$ pour heures x sexe). En revanche, le génotype n'est pas un modificateur du rythme circadien (ANOVA en mesures répétées, $p = 0,7$ heures x génotype x sexe).

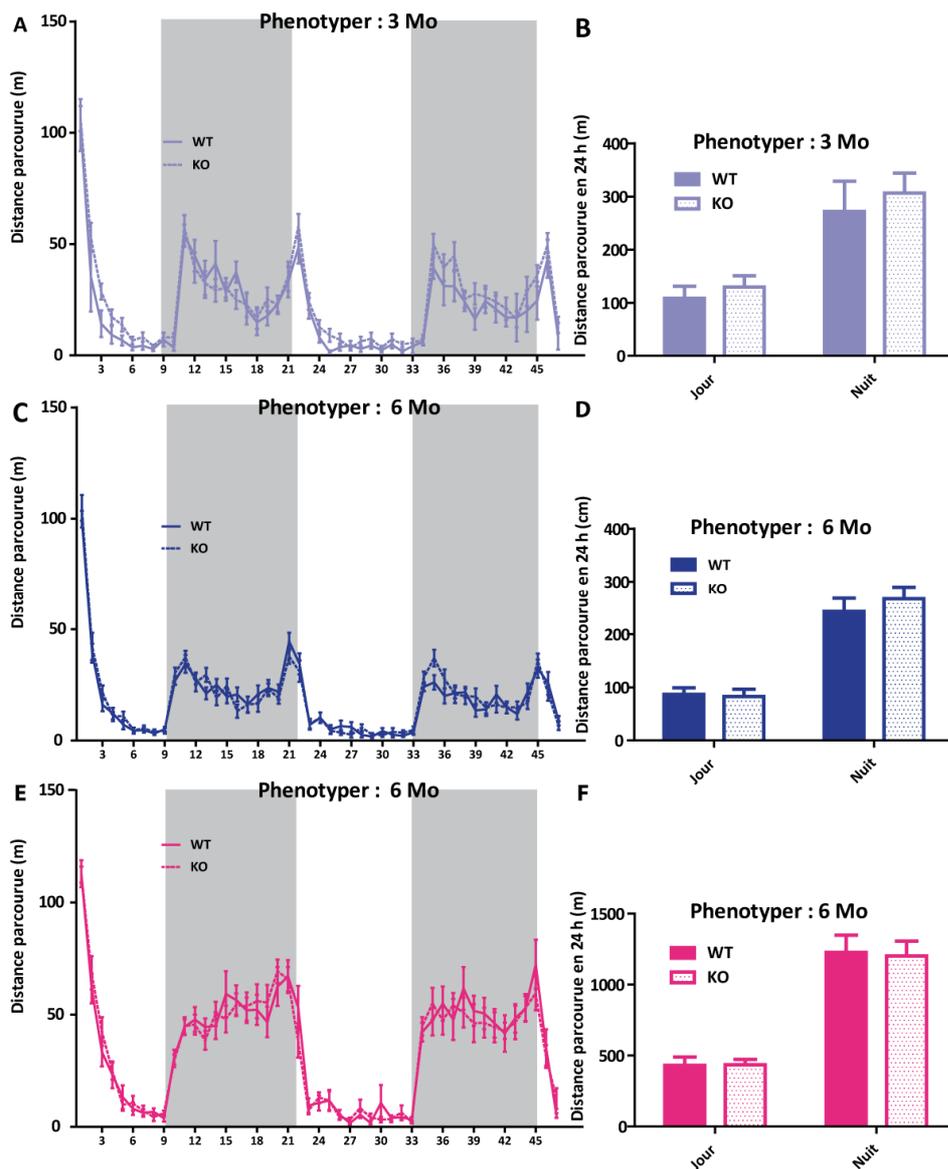


Figure 22. Activité spontanée des souris KO *Dclk3* constitutives dans un environnement proche de leur cage d'hébergement enregistrée avec un PhenoTyper et de leurs compagnons de portée. (A), (C), (E) L'activité circadienne est enregistrée sur 47 h avec les périodes diurnes de 7 h à 19 h (en blanc) et les périodes nocturnes (en gris) (ANOVA en mesures répétées : $p=0,4$ pour génotype, $p<0,000001$ pour heures, $p=0,6$ pour heures x génotype en (A) ; $p=0,8$ pour génotype, $p<0,000001$ pour heures, $p=0,2$ pour heures x génotype en (C) ; $p=0,9$ pour génotype, $p<0,000001$ pour heures, $p=0,9$ pour heures x génotype en (E)). (B), (D), (F) La distance parcourue en 24 h a été représentée en distinguant la période jour/nuit (Test U de Mann-Whitney : $p=0,2$ pour jour et pour nuit en (B), $p=0,7$ pour jour et $p=0,5$ pour nuit en (D), $p=0,7$ pour jour et $p=0,9$ pour nuit en (F)). L'activité spontanée est enregistrée pour les souris KO *Dclk3* mâles à 3 mois en (A) (B), les souris mâles à 6 mois en (C) (D) et les souris femelles à 6 mois en (E) (F). Les données sont représentées par moyenne \pm SEM ($n=7$ WT, $n=11$ KO en (A-B) ; $n=15$ /groupe en (C-D), $n=14$ WT, $n=15$ KO en (E-F)).

L'anxiété a été étudiée par le test du labyrinthe en croix surélevé (ou *Elevated Plus Maze*, EPM) et par le test de l'*Open Field*. Dans l'EPM, les bras ouverts représentent une zone anxiogène où les animaux anxieux ne veulent pas s'aventurer. Les souris KO n'ont pas significativement passés plus de temps ni dans les bras ouverts ni dans les bras fermés à 3 mois (Figure 23 A). Les souris très peu anxieuses s'aventurent à se pencher au-dessus du vide dans le bras ouvert qui est un comportement

appelé « leaning ». Une fois encore, aucune différence n'est observée pour ce comportement entre les souris KO *Dclk3* et les souris WT à 3 mois. En revanche, à 6 mois, les souris KO ont passé significativement moins de temps dans les bras ouverts ($p=0,038$) et se sont penchés beaucoup moins souvent ($p=0,049$) que les souris WT. En conséquence, les souris KO ont tendance à passer plus de temps dans les bras fermés ($p=0,059$). Les souris KO mâles à 6 mois seraient donc plus anxieuses que les souris WT à l'EPM. Ces résultats n'ont pas été retrouvés chez les femelles puisqu'aucune différence de comportement n'a été relevée entre les souris femelles KO et WT.

L'anxiété a aussi été pendant le test de l'*Open Field* en mesurant la fréquence de passages (Figure 23 D-F) et le temps passé (Figure 23 G-I) dans la zone centrale de l'arène considérée comme une zone anxiogène pour les souris. Les souris invalidées pour *Dclk3* ont été autant de fois et sont restées autant de temps dans la zone centrale que les souris WT. En effet, quels que soient les groupes, l'âge des souris et le sexe, les souris ont été environ 30 fois dans la zone centrale pour un temps cumulé de 50 s environ sur les 10 min d'observation soit environ 10 %. Ainsi, l'augmentation de l'anxiété détectée dans le test d'EPM dans les souris mâles à 6 mois n'a pas été confirmée dans le test de l'*Open Field*.

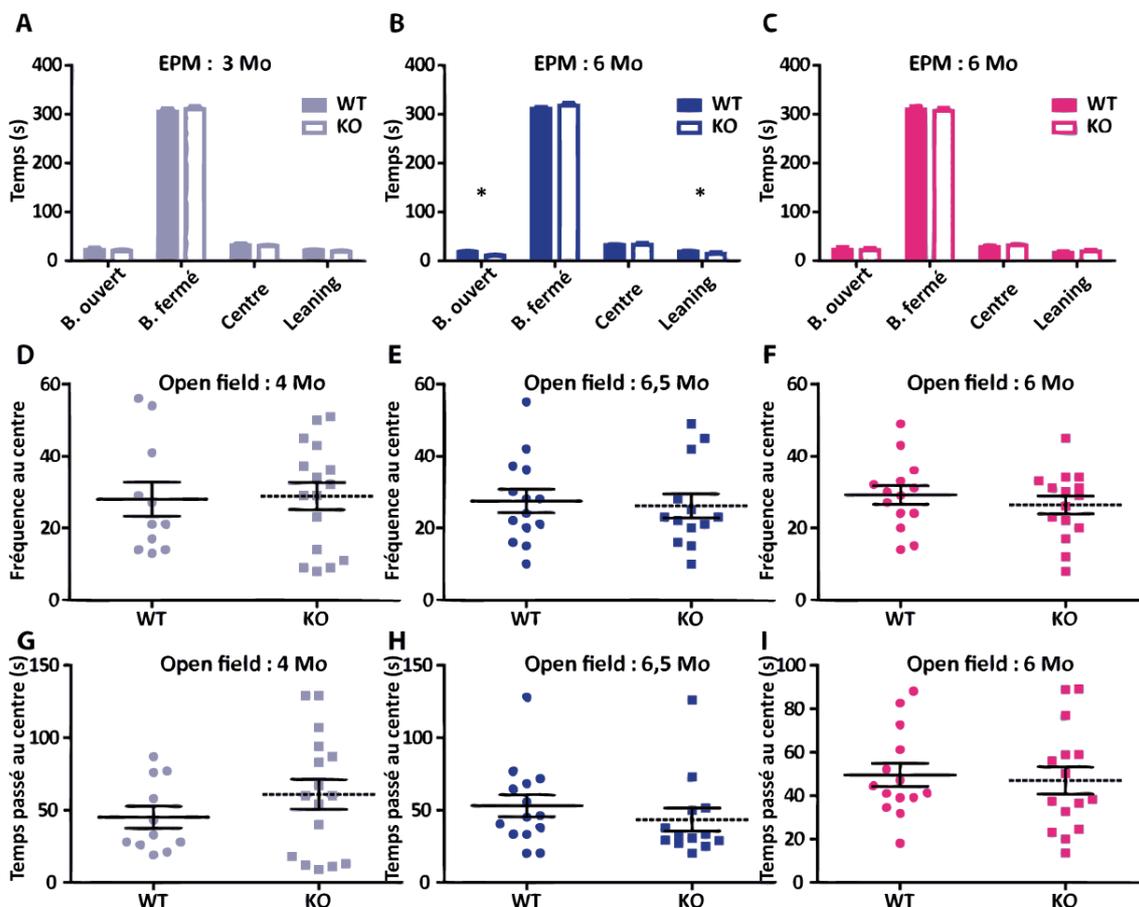


Figure 23. Etude de l'état d'anxiété des souris KO *Dclk3* constitutives et de leurs compagnons de portée WT au labyrinthe en croix surélevé (EPM) et à l'*Open Field*. (A)-(C) Le déplacement des souris a été

enregistré pendant 6 min : le temps passé dans les bras ouverts, les bras fermés, le centre et le penchement des souris dans le vide (leaning) a été mesuré. (Test U de Mann Whitney : p=0,6 pour bras ouvert, p=0,5 pour bras fermé, p=0,7 pour centre, p=0,5 pour leaning en (A) ; p=0,038 pour bras ouvert, p=0,059 pour bras fermé, p=0,4 pour centre, p=0,049 pour leaning en (B) ; p=0,9 pour bras ouvert, p=0,6 pour bras fermé, p=0,4 pour centre, p=0,7 pour leaning en (C). (D)-(I) L'activité spontanée des souris a été enregistrée pendant 10 min dans une arène au test de l'*Open Field*. La fréquence de passages (D)-(F) et le temps passé dans la zone centrale (G)-(I) ont été mesurés. Ces deux paramètres sont représentatifs de l'état d'anxiété des souris puisque la zone centrale représente une zone anxiogène (Test t de Student : p=0,9 en (D), p=0,8 en (E), p=0,5 en (F), p=0,3 en (G) ; Test U de Mann-Whitney : p=0,2 en (H), p=0,6 en (I)). Les données sont représentées par la moyenne \pm SEM et l'anxiété a été étudiée chez les souris Dclk3 mâles à 3-4 mois en (A) (D) (G) (n=11 WT, n=16 KO), chez les souris KO Dclk3 mâles à 6-6,5 mois en (B) (E) (H) (n=15/groupe), chez les souris KO Dclk3 femelles à 6 mois (n=14 WT, n=15 KO). * p<0,05 ; Mo : mois ; WT : wild-type ; KO : knockout ; B. : bras

2.1.2 Les souris constitutivement déficientes en Dclk3 (KO Dclk3) n'ont pas de déficits moteurs majeurs

Pour poursuivre la caractérisation comportementale des souris KO Dclk3, des tests moteurs ont été réalisés sur ces souris entre 3 et 6,5 mois environ. Parmi ces tests, le Rotarod en mode accélération est un test qui permet d'étudier la coordination motrice et l'apprentissage moteur des souris (Figure 24 A-C). A 3 mois, aucune différence n'a été observée entre les souris WT et KO. En revanche, le test a été invalidé car aucune progression significative n'a été observée dans les souris WT (ANOVA en mesures répétées, p=0,16 pour les jours). A 6 mois, le test a été validé aussi bien chez les mâles (Figure 24 B) que chez les femelles (Figure 24 C), les deux genres ayant appris. En revanche, aucune différence n'a été observée entre les souris WT et les souris KO.

La caractérisation phénotypique a été poursuivie avec le test de l'*Open Field* en étudiant deux paramètres qui reflètent les capacités motrices : la distance parcourue pendant le test (Figure 24 D-F) et le nombre de rearing (Figure 24 G-I) c'est-à-dire le nombre de fois où la souris s'élève sur ses pattes arrière. La distance parcourue pendant les 10 min est approximativement de 30 m quel que soit l'âge ou le sexe des souris. Egalement, le nombre de rearing n'est pas significativement différent entre les souris WT et les souris KO quels que soient l'âge et le sexe des souris.

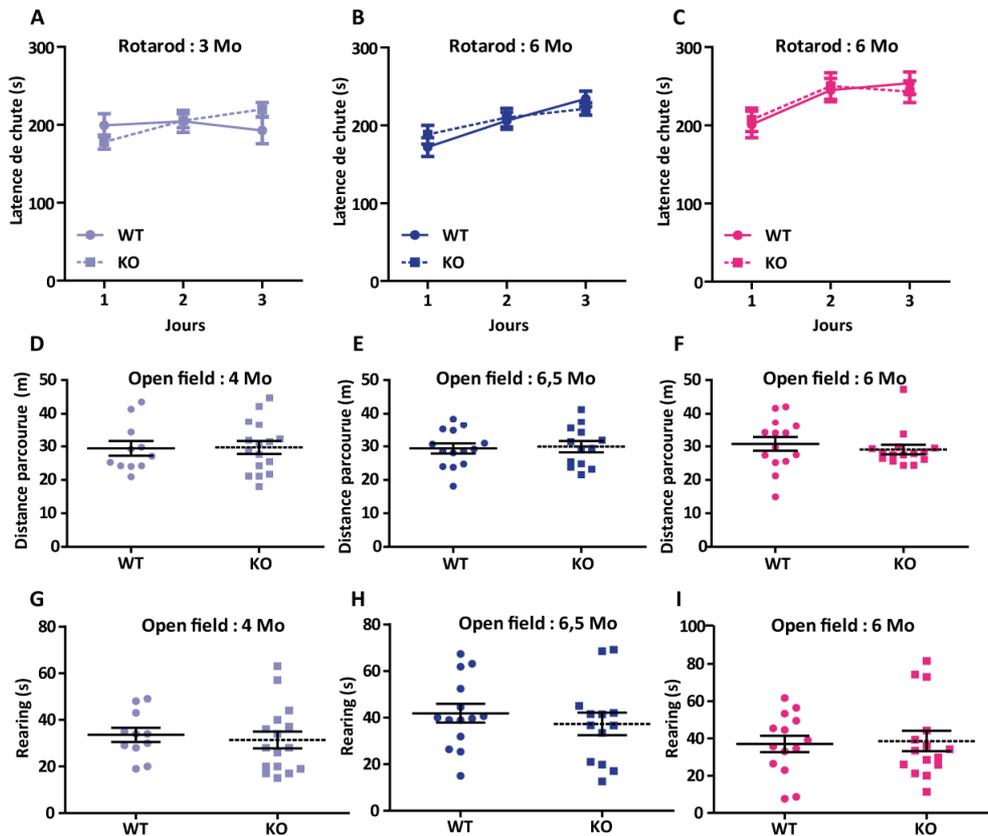


Figure 24. Etude du comportement moteur des souris KO *Dclk3* constitutives et de leurs compagnons de portée WT au Rotarod et à l'Open Field. (A)-(C) La coordination motrice a été testée par le test du Rotarod en mode accélération (2 à 40 rpm) pendant 5 min. La moyenne des 3 essais de chaque jour est représentée (A : ANOVA en mesures répétées, $p=0,16$ pour les jours, $p=0,068$ pour jours x génotype ; B : ANOVA en mesures répétées, $p=0,000003$ pour les jours, $p=0,25$ pour jours x génotype ; C : tests multivariés pour mesures répétées, $p=0,0007$ pour les jours, $p=0,61$ pour jours x génotype). (D)-(F) Pour étudier l'activité spontanée dans l'Open Field, les souris ont été placées au centre de l'arène et son activité a été enregistrée pendant 10 min (Test t de Student : $p=0,9$ en (D), $p=0,5$ en (E), $p=0,5$ en (F)). (G)-(I) Pendant le test de l'Open Field, le comportement de rearing a été enregistré manuellement (Test t de Student : $p=0,7$ en (G), $p=0,5$ en (H), $p=0,8$ en (I)). Les données sont représentées par la moyenne \pm SEM et l'activité motrice a été étudiée chez les souris KO *Dclk3* mâles à 3-4 mois en (A) (D) (G) ($n=11$ WT, $n=16$ KO), chez les souris KO *Dclk3* mâles à 6-6,5 mois en (B) (E) (H) ($n=15$ /groupe), chez les souris KO *Dclk3* femelles à 6 mois ($n=14$ WT, $n=15$ KO). Mo : mois ; WT : wild-type ; KO : knockout

2.1.3 La mémoire spatiale n'est pas atteinte dans les souris constitutivement déficientes en *Dclk3*

Les souris étant constitutivement déficientes en *Dclk3* et *Dclk3* étant présent dans le gyrus denté, nous avons caractérisé l'apprentissage et la mémoire spatiale à long terme grâce au test de la piscine de Morris. Les souris ont d'abord été testées à la plateforme visible pour vérifier leur capacité à nager correctement et leur acuité visuelle (Figure 25 B, F, J). Pendant ce test, la plateforme est formellement matérialisée. Quel que soit l'âge, le sexe ou le génotype des souris, le test de la plateforme visible a été validé puisqu'une diminution du temps d'échappement de la souris sur la plateforme a bien été observée entre le 1^{er} essai et le 4^{ème} essai.

Puis les souris ont été entraînées pendant 5 jours à raison de 3 essais par jour. Pour les souris mâles à 3 mois, les souris KO et WT ont significativement diminuées le temps nécessaire à trouver la plateforme ($p=0,0001$) (Figure 25 C). Ainsi, les souris KO et WT ont bien appris à retrouver la plateforme et aucune différence d'apprentissage n'a été observée entre les deux génotypes. Pour les souris mâles à 6 mois, les souris ont également significativement diminuées le temps d'échappement ($p<0,000001$) (Figure 25 G). En revanche, le profil d'apprentissage est significativement différent entre les deux génotypes ($p=0,005$ pour génotype x jours). Les souris femelles à 6 mois ont appris la position de la plateforme pour les deux génotypes ($p=0,0001$) mais aucune différence d'apprentissage n'a été observé entre les souris WT et les souris KO ($p=0,4$) (Figure 25 K).

72 h après le dernier jour d'apprentissage, la mémoire spatiale des souris a été testée en enlevant la plateforme de la piscine et en enregistrant pendant 60 s le déplacement des souris. Les WT et KO mâles à 3 mois ont retenu l'emplacement de la plateforme (Figure 25 D). Le temps passé dans le quadrant où se trouvait la plateforme n'est significativement pas différent entre les souris WT et KO. Ainsi, les souris KO mâles à 3 mois ne présentent pas de déficit de mémoire spatiale à long terme. A 6 mois, les souris mâles WT ont significativement passé plus de temps dans le quadrant où se trouvait la plateforme ($p=0,009$) mais pas les souris KO ($p=0,08$) (Figure 25 H). Cependant, au vue des résultats, nous ne pouvons pas affirmer que les souris KO ne se rappelaient pas de l'emplacement de la plateforme. De plus, aucune différence significative n'est observée entre les souris WT et les souris KO pour le temps passé dans le quadrant où se trouvait la plateforme. Pour les souris femelles à 6 mois, les souris WT n'ont pas préférentiellement passé plus de temps dans le quadrant de la plateforme (Figure 25). Même si les souris KO ont quant à elle passer plus de temps dans le quadrant de la plateforme, le test comportemental est invalidé.

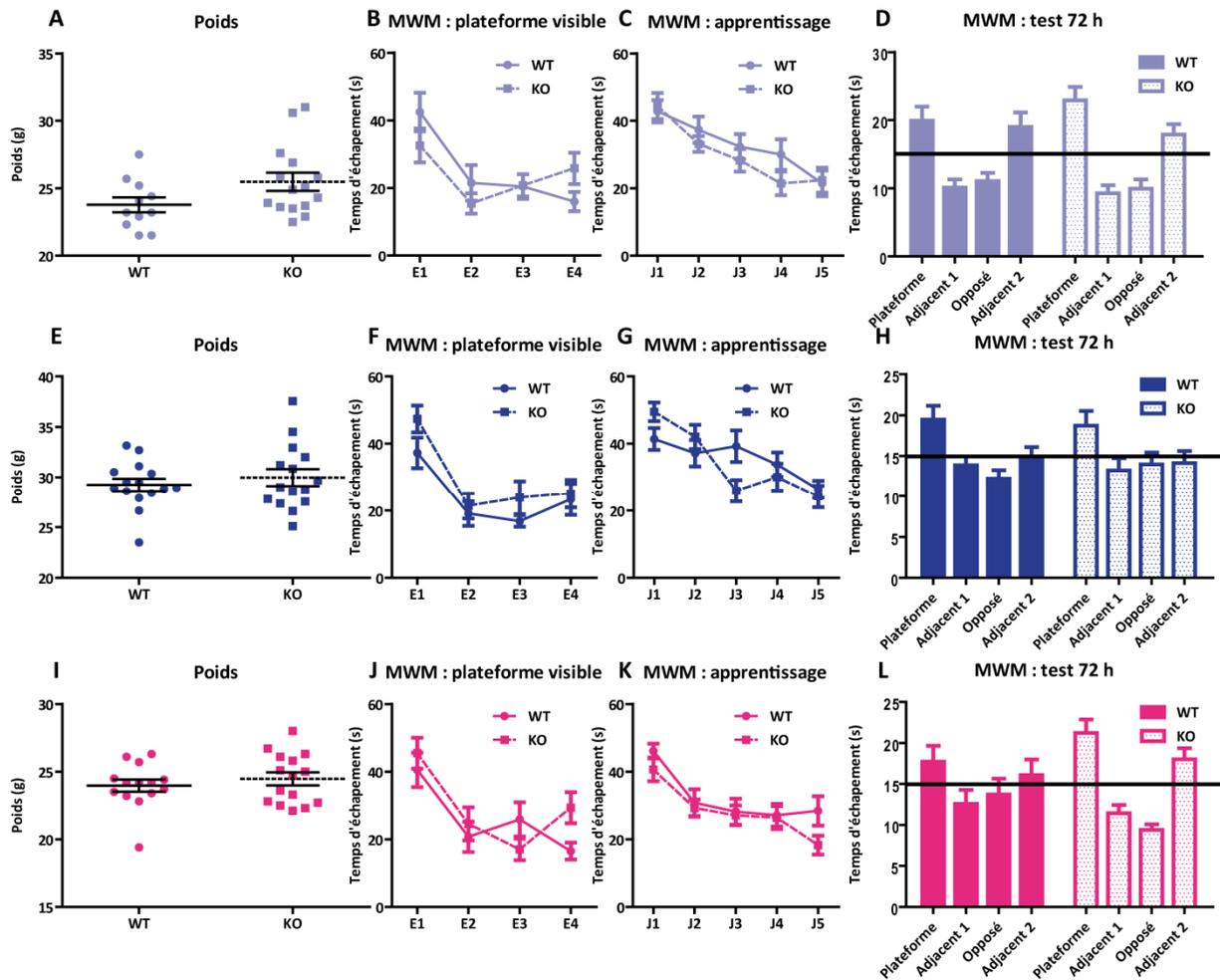


Figure 25. Etude de l'apprentissage et de la mémoire spatiale dans les souris KO *Dcl3* et de leurs compagnons de portée WT par le test de la piscine de Morris. (A), (E), (I) Le poids a été enregistré avant la session (A : Test U de Mann-Whitney, $p=0,08$; E et I : Test t de Student, $p=0,5$). (B), (F), (J) La capacité de nage et l'acuité visuelle ont été vérifiées au test de la plateforme visible (B : ANOVA en mesures répétées, $p=0,6$ pour le génotype, $p=0,0001$ pour les essais, $p=0,1$ pour génotype x essais ; F : Tests multivariés, $p=0,00012$ pour les essais, $p=0,7$ pour les essais x génotype ; J : Tests multivariés, $p=0,00009$ pour les essais, $p=0,1$ pour essais x génotype). (C), (G), (K) Temps de latence pour atteindre la plateforme immergée au cours de 5 jours d'apprentissage à raison de 3 essais par jour. La moyenne des 3 essais pour chaque jour a été représentée (C : Tests multivariés, $p=0,00009$ pour les jours, $p=0,4$ pour jours x génotype ; G : ANOVA en mesures répétées, $p<0,000001$ pour les jours, $p=0,7$ pour le génotype, $p=0,005$ pour génotype x jours ; K : test multivariés, $p=0,0001$ pour les jours, $p=0,6$ pour jours x génotype). (D), (H), (L) Temps passé dans chaque quadrant au cours du probe test 72 h après le dernier jour d'apprentissage (D : analyse intra-groupe par ANOVA à un facteur, $p=0,0001$ pour les WT, $p<0,000001$ pour les KO ; H : analyse intra-groupe par l'ANOVA de Kruskal-Wallis, $p=0,009$ pour les WT, $p=0,08$ pour les KO ; L : analyse intra-groupe par ANOVA à un facteur, $p=0,2$ pour les WT, $p<0,000001$ pour les KO). Comparaison du temps passé dans le quadrant cible entre les souris WT et les souris KO (Test t de Student : $p=0,3$ en (D), $p=0,8$ en (H), $p=0,2$ en (L)). La ligne noire pleine représente le temps théorique qu'une souris naïve passerait dans chaque quadrant. Les données sont représentées par la moyenne \pm SEM. La mémoire spatiale a été étudiée chez les souris KO *Dcl3* mâles à 3 mois en (A)-(D) ($n=11$ WT, $n=16$ KO), chez les souris KO *Dcl3* mâles à 6 mois en (E)-(H) ($n=15$ /groupe), chez les souris KO *Dcl3* femelles à 6 mois ($n=14$ WT, $n=15$ KO) en (I)-(L).

2.1.4 L'absence de Dclk3 ne change pas le profil métabolique du striatum et de l'hippocampe des souris KO Dclk3

Certaines souris de chaque groupe d'études ont été étudiées par imagerie par résonance magnétique (IRM) et par spectroscopie par résonance magnétique (SRM). Julien Flament, chercheur CEA en charge de la plateforme RMN de MIRCen a acquis des spectres bruts dans le striatum gauche et dans l'hippocampe gauche des souris de chaque groupe sur l'aimant à très haut champ de 11,75 T équipé d'une antenne cryogénique permettant d'augmenter significativement le rapport signal/bruit. Les profils métaboliques des souris mâles à 6 mois et des souris femelles à 12 mois sont représentés à la Figure 26. Notamment, des métabolites spécifiques des neurones comme le tNAA (N-acétyl-aspartate + N-acétyl-aspartyl-glutamate total) et la taurine et des métabolites astrocytaires comme la glutamine et l'inositol ont été quantifiés.

Dans le striatum des souris KO mâles à 5 mois, la glutamine est significativement plus élevée ($p=0,041$) et le glutamate ($p=0,047$) ainsi que la choline totale ($p=0,016$) sont significativement diminués dans les KO par rapport au WT. Le tNAA a tendance à diminuer dans les souris KO ($p=0,051$) sans toutefois atteindre le seuil de significativité. Ce profil de métabolites n'a pas été retrouvé dans les souris KO femelles à 12 mois. Seule la glutamine a tendance à diminuer dans ces souris femelles ($p=0,09$).

Dans l'hippocampe des souris KO mâles à 5 mois, la taurine qui est un marqueur principalement neuronal est significativement augmentée dans les KO par rapport au WT ($p=0,03$). A l'inverse, la tCho a tendance à diminuer dans les KO mais la diminution n'atteint pas le seuil de significativité ($p=0,09$). En revanche, ce profil de métabolites n'a pas été retrouvé dans les souris KO femelles à 12 mois. Néanmoins, dans ces souris femelles, la glutamine est significativement diminuée dans les KO par rapport aux souris WT.

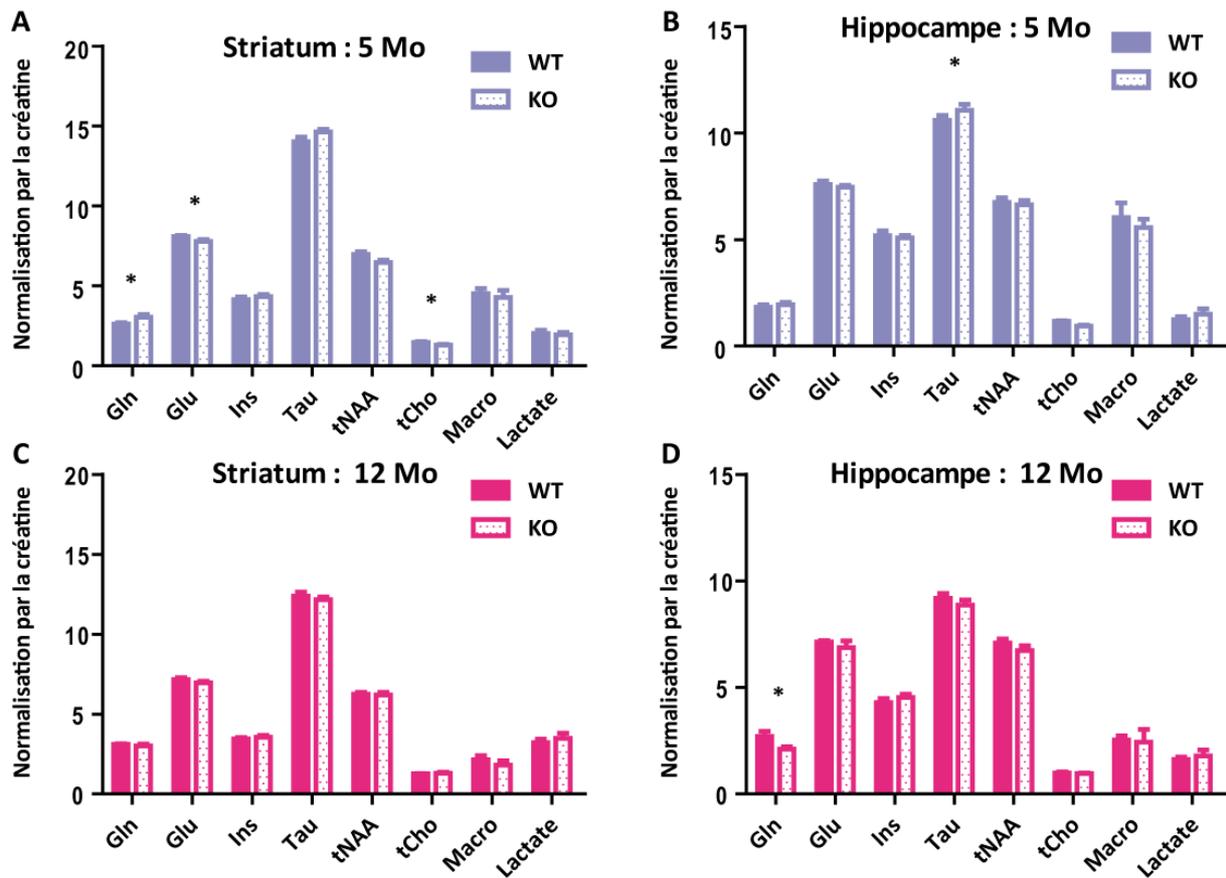


Figure 26. Profils métaboliques mesurés par spectroscopie par résonance magnétique des souris KO Dcl3 et de leurs compagnons de portée WT. La concentration des métabolites normalisée par rapport à la créatine à 8 mM a été mesurée dans le striatum gauche en (A) et (C) et dans l'hippocampe gauche en (B) et (D) des souris KO constitutifs et de leurs compagnons de portée WT **chez les mâles à 5 mois** en (A)-(B) (Test t de Student en (A) : $p=0,041$ pour Gln, $p=0,47$ pour Glu, $p=0,4$ pour Ins, $p=0,1$ pour Tau, $p=0,051$ pour tNAA, $p=0,016$ pour tCho, $p=0,7$ pour macro, $p=0,7$ pour Lactate ; Test de Mann-Whitney en (B) : $p=0,3$ pour Gln, $p=0,8$ pour Glu, $p=0,5$ pour Ins, $p=0,03$ pour Tau, $p=0,7$ pour tNAA, $p=0,09$ pour tCho, $p=0,9$ pour macro, $p=0,3$ pour Lactate) et **chez les femelles à 12 mois** en (C)-(D) (Test t de Student en (C) : $p=0,09$ pour Gln, $p=0,27$ pour Glu, $p=0,7$ pour Ins, $p=0,6$ pour Tau, $p=0,8$ pour tNAA, $p=0,9$ pour tCho, $p=0,7$ pour macro, $p=0,8$ pour Lactate ; Test t de Student en (D) : $p=0,047$ pour Gln, $p=0,3$ pour Ins, $p=0,4$ pour Tau, $p=0,3$ pour tNAA, $p=0,5$ pour tCho, $p=0,7$ pour macro (données transformées en racine) et Test t de Welch pour $p=0,4$ pour Glu, $p=0,3$ pour Lactate). Les métabolites suivants, glutamine (Gln), glutamate (Glu), Inositol (Ins), taurine (Tau), N-acétyl-aspartate + N-acétyl-aspartyl-glutamate total (tNAA), choline totale (tCho), les macromolécules (Macro) et le lactate ont été quantifiés de manière fiable (CRLB < 5 %). Les données sont représentées par la moyenne \pm écart-type ($n=6/\text{groupe}/\text{âge}$). * $p<0,05$.

2.1.5 L'analyse anatomopathologique n'a pas montré de différence macroscopique

Une coloration au crésyl violet a permis de marquer les noyaux de tous les types de cellules (Figure 27, à gauche). D'un point de vue macroscopique, une perte cellulaire n'a pas été observée aussi bien dans le striatum que dans l'hippocampe des souris KO par rapport aux souris WT. Le marquage NeuN a permis de différencier les neurones des autres types cellulaires (Figure 27, au milieu). Les souris KO ne présentent pas de différence macroscopique au niveau neuronal par rapport aux souris WT. Enfin, un marquage GFAP a permis de mettre en évidence la présence d'astrocytes. Particulièrement,

une réactivité astrocytaire est observée au cours de la neuroinflammation avec comme caractéristique une surexpression de GFAP. En revanche, aucune réactivité astrocytaire ou un nombre plus important d'astrocytes n'a été observé dans le striatum et l'hippocampe des souris KO par rapport aux souris WT (Figure 27, à droite).

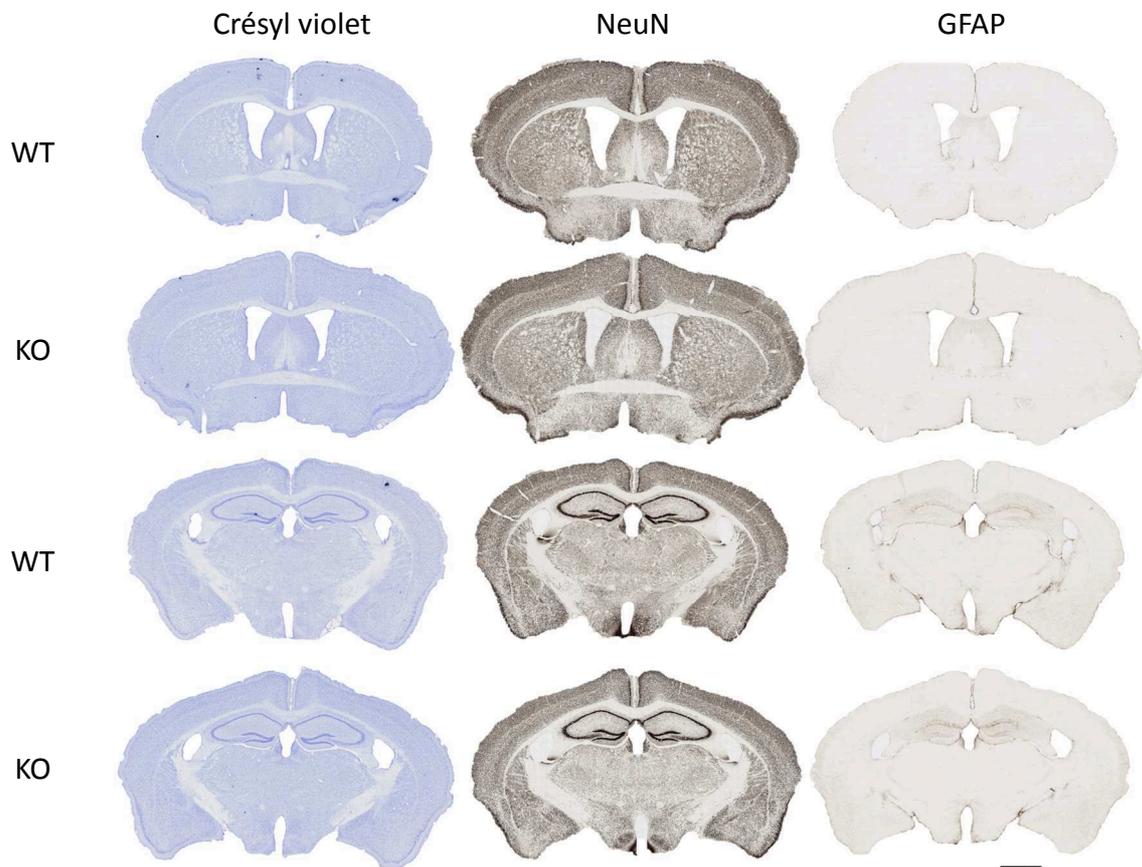


Figure 27. Etude anatomopathologique des souris KO Dclk3 mâles à 6 mois et de leurs compagnons de portée WT. A gauche, une coloration au crésyl violet marque les noyaux de tous types de cellules. Au milieu, un marquage immunohistochimique NeuN (Millipore, MAB377) marque les neurones. A droite, un marquage immunohistochimique GFAP (Dako, Z0334) marque les astrocytes. Les deux premières lignes correspondent à un niveau anatomique striatal. Les deux dernières lignes correspondent à un niveau anatomique hippocampique. Echelle : 1000 μ m. WT : wild-type ; KO : knockout ; GFAP : Protéine acide fibrillaire gliale ; NeuN : marqueur neuronal.

2.2 Délétion striatale de Dclk3 ($Dclk3^{flx/flx}/CRE$)

Au vue du très faible phénotype comportemental observé dans les souris KO Dclk3 constitutive, nous voulions étudier le rôle de Dclk3 spécifiquement dans le striatum pour éviter d'éventuelles compensations. De plus, la vulnérabilité régionale de la MH étant très striatale, la délétion de Dclk3 uniquement dans le striatum a donc été envisagée. Pour cela, nous avons croisé les souris conditionnelle Dclk3 avec les souris Rgs9-cre pour obtenir des souris déficientes en Dclk3 uniquement dans le striatum. Puis, nous avons caractérisé cette lignée en étudiant premièrement le

cycle circadien et l'état d'anxiété des souris. Dans un second temps, le phénotype moteur a été caractérisé puisque le striatum est impliqué dans les aptitudes motrices.

2.2.1 Les souris déficientes en Dclk3 dans le striatum ne présentent pas de cycle circadien perturbé ou d'anxiété exacerbée

Le cycle circadien et l'activité spontanée des souris mâles déficientes en Dclk3 dans le striatum ont été étudiés à 6 et 12 mois (Figure 28) en utilisant le PhenoTyper® (Noldus, Pays-Bas). Globalement, le rythme circadien des souris est maintenu avec une activité globale plus importante la nuit par rapport au jour. En revanche, aucune différence significative n'a été observée entre les souris déficientes en Dclk3 dans le striatum (Dclk3^{flox/flox} / CRE) et les souris contrôles (Dclk3^{flox/flox}). L'activité dans un environnement connu a été également analysée sur 24 h (Figure 28 B, D) ne montrant pas de différence selon le génotype des souris.

Le rythme circadien a été comparé entre 6 et 12 mois. L'âge est sans conteste un modificateur de l'activité basale des souris (ANOVA en mesures répétées : $p < 0,000001$ pour heures x âge). De manière surprenante, les souris à 12 mois ont une activité basale plus élevée que les souris à 6 mois. Néanmoins, le génotype n'influe pas sur l'augmentation de l'activité basale (ANOVA en mesures répétées : $p = 0,9$ pour génotype x heures x âge).

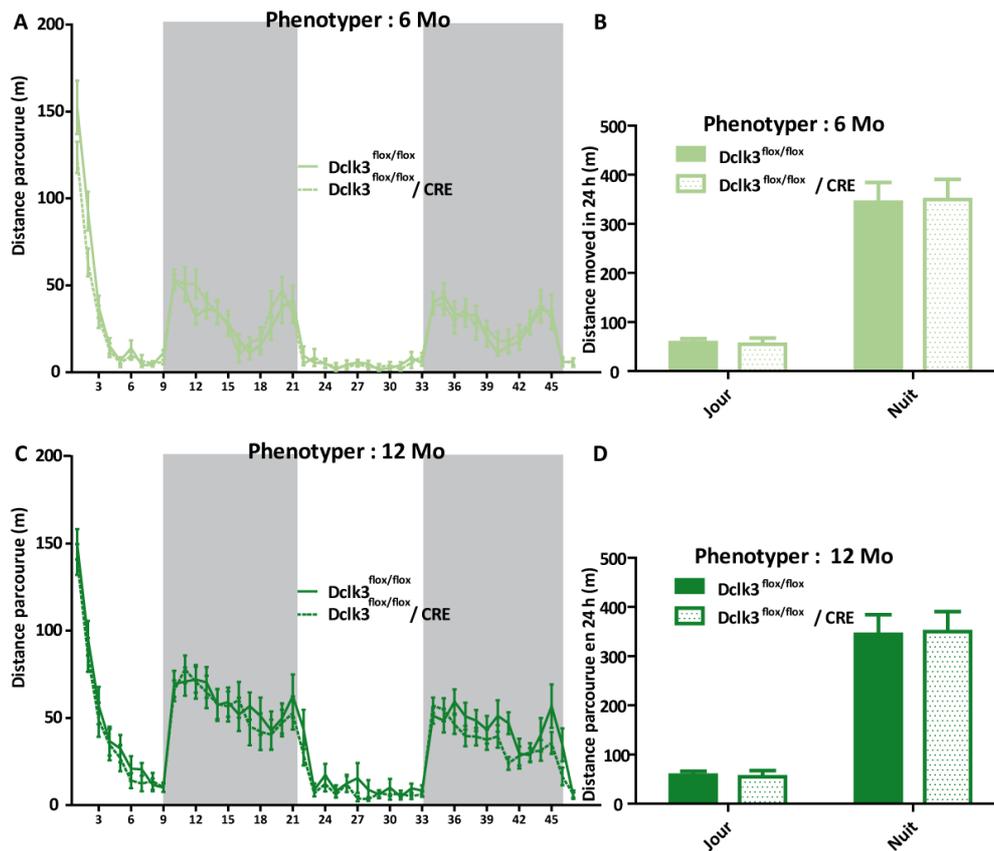


Figure 28. Activité spontanée des souris déficientes en Dclk3 dans le striatum (Dclk3^{flox/flox} / CRE) et de leurs compagnons de portée Dclk3^{flox/flox} dans un environnement proche de leur cage d'hébergement enregistrée avec un PhenoTyper. (A), (C) L'activité circadienne est enregistrée sur 47 h avec les périodes diurnes de 7 h à 19 h (en blanc) et les périodes nocturnes (en gris) (ANOVA en mesures répétées : $p=0,8$ pour génotype, $p<0,000001$ pour heures, $p=0,2$ pour heures x génotype en (A) ; $p=0,4$ pour génotype, $p<0,000001$ pour heures, $p=0,95$ pour heures x génotype en (C)). (B), (D) La distance parcourue en 24 h a été représentée en distinguant la période jour/nuit (Test U de Mann-Whitney : $p=0,9$ pour jour et pour nuit en (B), $p=0,4$ pour jour et pour nuit en (D)). L'activité spontanée est enregistrée pour les souris KO Dclk3 striatales mâles à 6 mois en (A)-(B) et 12 mois en (C)-(D). Les données sont représentées par la moyenne \pm SEM ($n=8$ Dclk3^{flox/flox} et $n=9$ Dclk3^{flox/flox} / CRE en (A-B) ; $n=11$ Dclk3^{flox/flox} et $n=13$ Dclk3^{flox/flox} / CRE en (C-D)). Mo : mois.

L'anxiété des souris a été caractérisée au test de l'*Open Field* en observant le temps passé et la fréquence de passages dans la zone centrale de l'arène qui est une zone anxiogène pour les souris stressées (Figure 29). De manière globale, aucune différence n'a été relevée sur ces deux paramètres entre les souris déficientes en Dclk3 dans le striatum par rapport aux souris contrôles et ceci quel que soit l'âge des souris. En effet, tous les souris ont été une quarantaine de fois au centre et sont restées entre 50 et 60 s sur les 10 min de test soit environ 8-10 %.

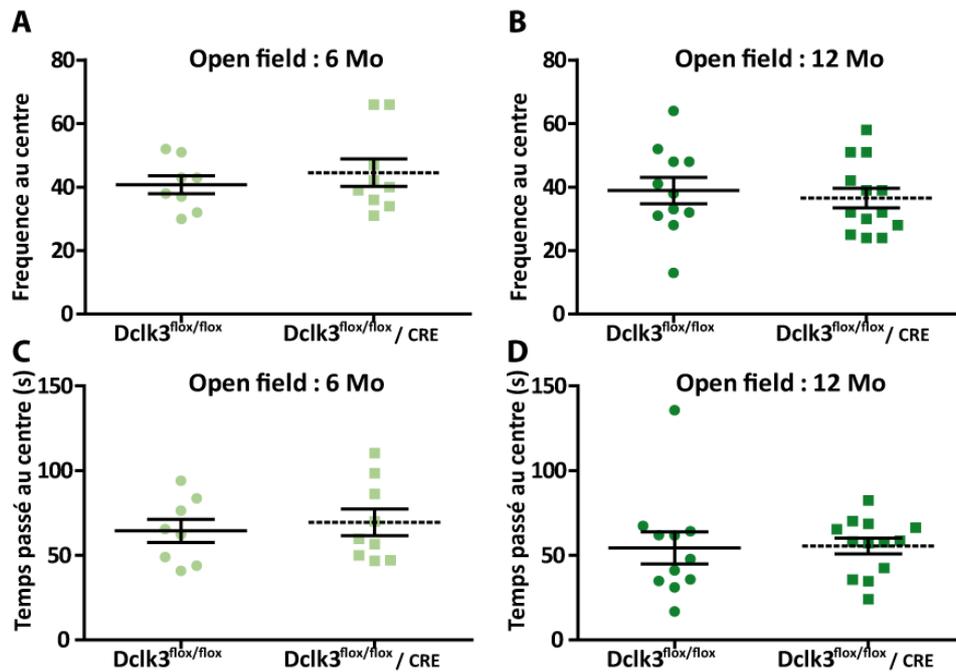


Figure 29. Etude de l'état d'anxiété des souris déficientes en $Dclk3$ dans le striatum ($Dclk3^{flox/flox} / CRE$) et de leurs compagnons de portée ($Dclk3^{flox/flox}$) au test de l'*Open Field*. L'activité spontanée des souris a été enregistrée pendant 10 min dans une arène au test de l'*Open Field*. La fréquence de passages (A)-(B) et le temps passé dans la zone centrale (C)-(D) ont été mesurés. Ces deux paramètres sont représentatifs de l'état d'anxiété des souris puisque la zone centrale représente une zone anxiogène (Test t de Student : $p=0,5$ en (A), $p=0,6$ en (B), $p=0,6$ en (C) ; Test U de Mann-Whitney : $p=0,5$ en (D)). Les données sont représentées par la moyenne \pm SEM et l'anxiété a été étudiée dans les souris mâles KO $Dclk3$ dans le striatum à 6 mois ($n=8 Dclk3^{flox/flox}$ et $n=9 Dclk3^{flox/flox} / CRE$) en (A), (C) et à 12 mois ($n=11 Dclk3^{flox/flox}$ et $n=13 Dclk3^{flox/flox} / CRE$) en (B), (D). Mo : mois

2.2.2 Les souris déficientes en $Dclk3$ dans le striatum n'ont pas de déficits moteurs

Pour caractériser les aptitudes motrices des souris déficientes en $Dclk3$ dans le striatum, ces dernières ont été évaluées au test du Rotarod en mode accélération et au test de l'*Open Field* (Figure 30).

Le test du Rotarod est un test qui permet d'évaluer la coordination et l'apprentissage moteurs. Aussi bien à 6 mois qu'à 12 mois, les souris ont appris la tâche puisque leurs performances se sont améliorées pendant les trois jours. En revanche, aucune différence n'est observable entre les souris déficientes en $Dclk3$ dans le striatum et les souris témoins. De même, comme pour les souris KO, les souris ont ensuite été évaluées selon la distance parcourue et le rearing au test de l'*Open Field*. Sur ces deux paramètres, les souris déficientes en $Dclk3$ ne sont significativement pas différentes des souris contrôles aussi bien à 6 mois qu'à 12 mois.

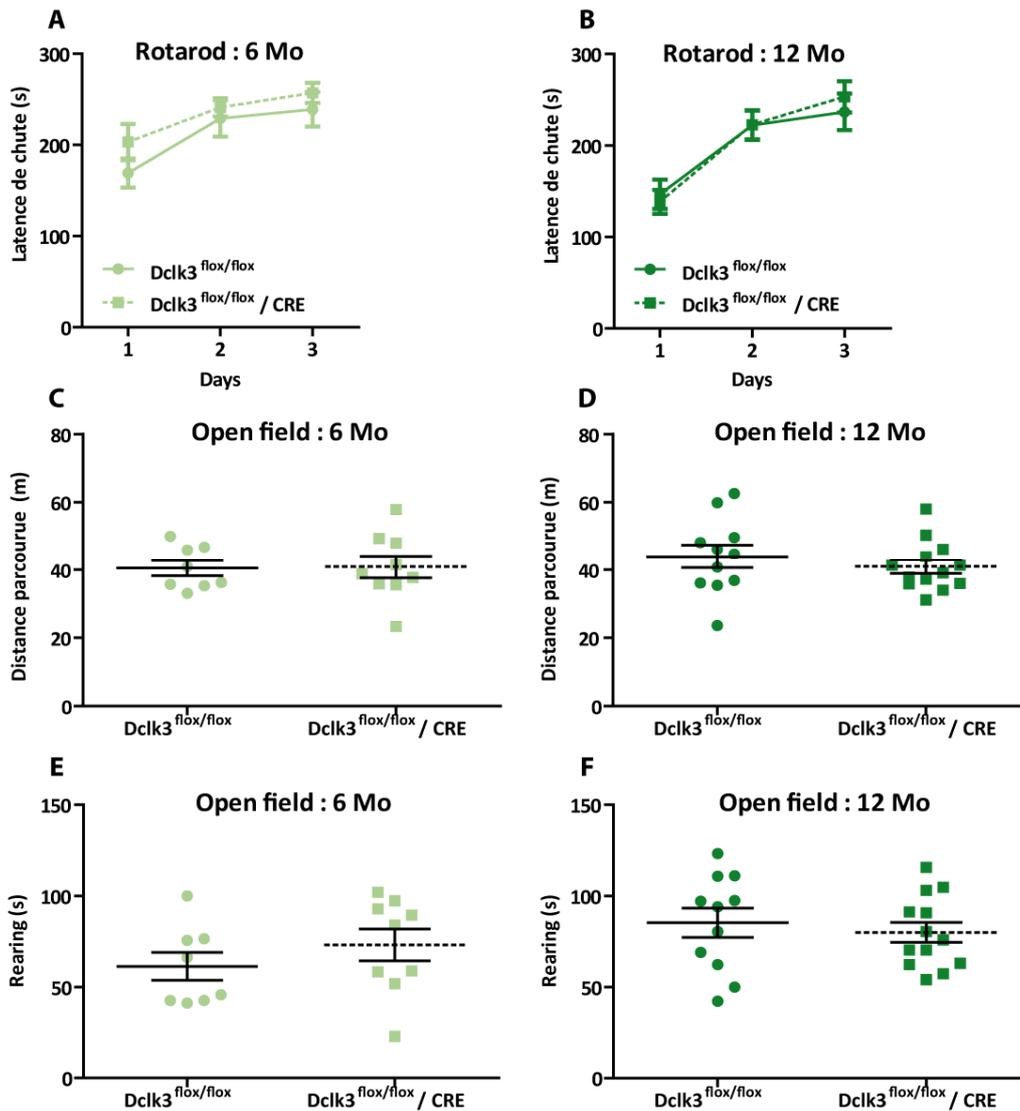


Figure 30. Etude du comportement moteur des souris déficientes en Dclk3 dans le striatum ($Dclk3^{flox/flox} / CRE$ et de leurs compagnons de portée ($Dclk3^{flox/flox}$)). (A)-(B) L'apprentissage moteur a été testé par le test du Rotarod en mode accélération (2 à 40 rpm) pendant 5 min. La moyenne des trois essais de chaque jour est représentée ((A) : ANOVA en mesures répétées, $p < 0,000001$ pour les jours, $p = 0,3$ pour le génotype, $p = 0,5$ pour jours x génotype ; (B) : tests multivariés pour mesures répétées, $p < 0,000001$ pour les jours, $p = 0,6$ pour jours x génotype). (C)-(D) Pour étudier l'activité spontanée dans l'Open Field, les souris ont été placées au centre de l'arène et son activité a été enregistrée pendant 10 min (Test t de Student : $p = 0,9$ en (C), $p = 0,4$ en (D)). (E)-(F) Pendant le test de l'Open Field, le comportement de rearing a été enregistré manuellement (Test t de Student : $p = 0,3$ en (E), $p = 0,6$ en (F)). Les données sont représentées par la moyenne \pm SEM et l'activité motrice a été étudiée chez les souris mâles KO Dclk3 dans le striatum à 6 mois en (A) (C) (E) ($n = 8$ Dclk3^{flox/flox} et $n = 9$ Dclk3^{flox/flox} / CRE) et à 12 mois en (B) (D) (F) ($n = 11$ Dclk3^{flox/flox} et $n = 13$ Dclk3^{flox/flox} / CRE).

2.2.3 Les souris déficientes en Dclk3 dans le striatum ne présentent pas un changement dans le profil des métabolites du striatum

De même que pour les souris KO Dclk3, des spectres bruts ont été analysés par SRM (collaboration avec Julien Flament) au niveau du striatum. Un certain nombre de métabolites ont été quantifiés comme précédemment décrits dont certains sont spécifiques de certains types cellulaires

(Figure 31). Globalement, les souris déficientes en *Dclk3* à 8 mois dans le striatum n'ont pas montré de différences significatives par rapport aux souris témoins. En revanche, la concentration en tNAA dans les souris déficientes en *Dclk3* dans le striatum est légèrement augmentée par rapport aux témoins, bien que la différence n'atteigne pas le seuil de significativité ($p=0,08$).

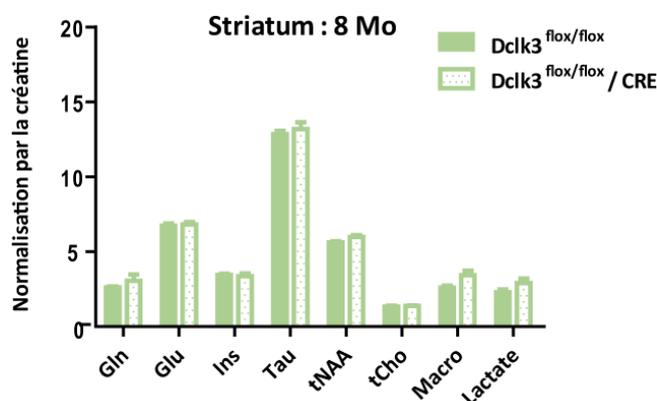


Figure 31. Profil des métabolites mesurés par spectroscopie par résonance magnétique des souris déficientes en *Dclk3* dans le striatum (*Dclk3*^{flox/flox} / CRE) et de leurs compagnons de portée (*Dclk3*^{flox/flox}) à 8 mois. La concentration des métabolites normalisée par rapport à la créatine à 8 mM a été mesurée dans le striatum gauche (Test de Mann-Whitney : $p=0,7$ pour Gln, $p=0,7$ pour Glu, $p=0,9$ pour Ins, $p=0,5$ pour Tau, $p=0,08$ pour tNAA, $p=0,7$ pour tCho, $p=0,1$ pour macro, $p=0,2$ pour Lactate). Les métabolites suivants, glutamine (Gln), glutamate (Glu), Inositol (Ins), taurine (Tau), N-acétyl-aspartate + N-acétyl-aspartyl-glutamate total (tNAA), choline totale (tCho), les macromolécules (Macro) et le lactate ont été quantifiés de manière fiable (CRLB < 5 %). Les données sont représentées par la moyenne \pm écart-type ($n=6$ *Dclk3*^{flox/flox} et $n=8$ *Dclk3*^{flox/flox} / CRE).

2.3 Délétion aigue de *Dclk3* par injection d'AAV-CRE

Un modèle de délétion conditionnelle de *Dclk3* (*Dclk3*^{flox/flox}) permet une manipulation conditionnelle du gène, en particulier locale et contrôlée dans le temps grâce à des vecteurs viraux exprimant la Cre. Pour éviter les phénomènes de compensation pendant le développement de la souris, nous avons sélectivement invalidé à l'âge adulte et de manière aigue le gène *Dclk3* selon la région ciblée en injectant un AAV9 codant à la fois pour la Cre recombinase et la GFP (AAV-cre) sous promoteur ubiquitaire CBA.

2.3.1 L'expression de *Dclk3* est diminuée dans le striatum des souris *Dclk3*^{flox/flox} injectées avec l'AAV-cre

L'AAV-cre et le véhicule (solution de PBS pluronique) ont été injectés dans le striatum des souris *Dclk3*^{flox/flox} et dans celui des WT. L'expression de *Dclk3* a été quantifiée au niveau transcriptionnel par RT-qPCR (Figure 32). Premièrement, les souris WT et *Dclk3*^{flox/flox} ont réagi de manière identique à l'injection de PBS pluronique avec une expression de *Dclk3* identique entre les deux groupes. Deuxièmement, l'injection d'AAV-cre dans les souris WT n'a pas induit une diminution d'expression de *Dclk3*. Enfin, l'injection d'AAV-cre dans le striatum des souris *Dclk3*^{flox/flox} a induit une

diminution d'expression de *Dcl3* de 40 %. En revanche, la quantification d'expression au niveau protéique n'a pas pu être menée par limitation des outils disponibles.

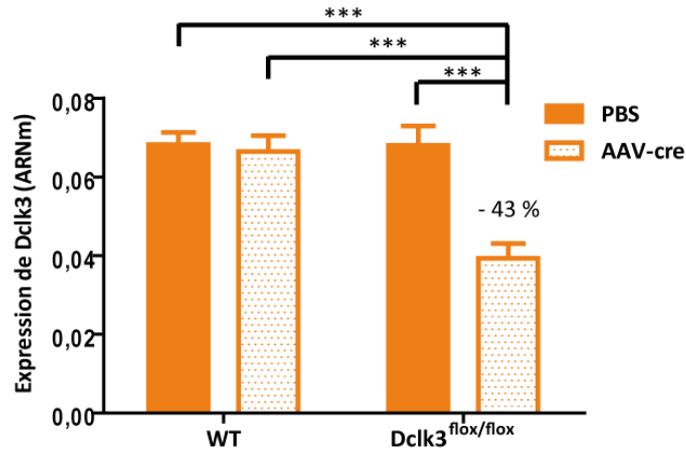


Figure 32. Quantification par RT-qPCR de la délétion de *Dcl3* dans le striatum des souris *Dcl3*^{flox/flox} et des souris WT après injection de l'AAV9-CRE ou de PBS. Pour chaque hémisphère, un seul site d'injection a été fait. Les données sont représentées par la moyenne \pm SEM avec n=9 WT/injection, n=7 *Dcl3*^{flox/flox} + PBS et n=6 *Dcl3*^{flox/flox} + AAV-cre (ANOVA à 2 facteurs : p=0,002 pour génotype, p=0,0006 pour injection et p=0,002 pour génotype x injection ; Test post-hoc Fisher LSD : p=0,00002 pour WT+PBS vs *Dcl3*^{flox/flox}+AAV-cre, p=0,00005 pour WT+AAV-cre ou *Dcl3*^{flox/flox}+PBS vs *Dcl3*^{flox/flox}+AAV-cre). ***p<0,001

2.3.2 La délétion locale et aigue de *Dcl3* dans le striatum n'entraîne pas de déficit moteur

Après double injection de l'AAV-CRE dans chaque hémisphère à 6 mois, les souris ont été testées à 8 mois au test du Rotarod (Figure 33 A). La coordination motrice a progressé chaque jour dans chaque groupe (p=0,000002). En revanche, la délétion du gène *Dcl3* dans le striatum des souris n'a pas entraîné de perturbation dans la coordination motrice des souris (p=0,72).

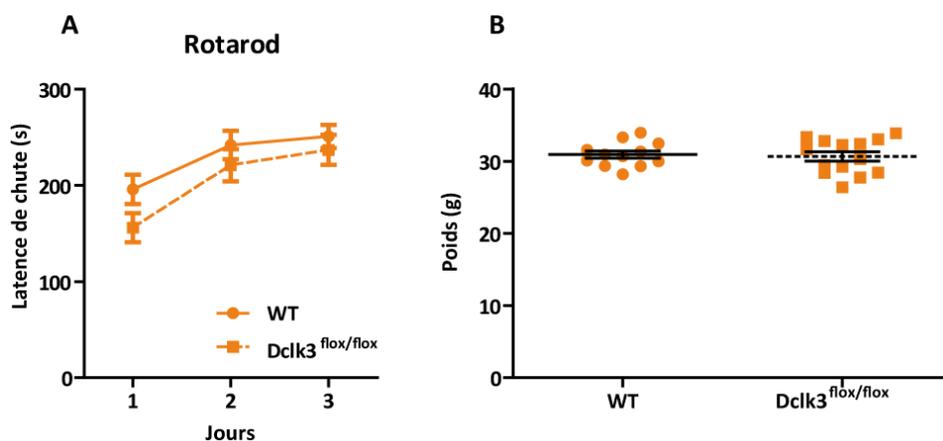


Figure 33. Etude de la coordination motrice par le test du Rotarod en mode accélération des souris *Dcl3*^{flox/flox} et de leurs compagnons de portée WT injectées avec de l'AAV9-cre. Les souris ont été injectées à 6 mois et testées à 8 mois. (A) La moyenne des trois essais de chaque jour est représentée (Tests multivariés pour mesures répétées, p=0,000002 pour les jours, p=0,72 pour jours x génotype). (B) Poids des souris avant le

test (Test t de Student $p=0,75$). Les données sont représentées par la moyenne \pm SEM avec $n=12$ WT et $n=14$ $Dclk3^{flox/flox}$.

2.3.3 La délétion locale et aigue de *Dclk3* dans l'hippocampe entraîne des déficits de mémoire spatiale

Dclk3 est très exprimée dans le gyrus denté de l'hippocampe. Nous avons étudié la délétion aigue à l'âge adulte de *Dclk3* dans l'hippocampe des souris $Dclk3^{flox/flox}$ en exprimant localement la Cre à l'aide de vecteurs viraux. Ainsi, les souris ($Dclk3^{flox/flox}$ ou souris WT « littermates ») âgées de 4 mois ont reçu une injection intra-hippocampique d'AAV-Cre et leur mémoire spatiale a été étudiée à 6 mois grâce au test de la piscine de Morris (Figure 34).

Le premier jour du test, l'acuité visuelle et les aptitudes motrices des souris ont été évaluées au test dit de la plateforme visible où la plateforme était effectivement matérialisée (Figure 34 B). Le temps d'échappement pour atteindre la plateforme a significativement diminué au cours des 4 essais ($p=0,02$) mais aucune différence n'a été observée entre les deux groupes ($p=0,8$). Ainsi, aucune différence motrice ou visuelle n'a été observée entre les deux groupes.

Puis les souris ont été entraînées pendant 5 jours à raison de 3 essais par jour. Le temps d'échappement a significativement diminué au cours des jours ($p<0,000001$) et ceci pour les deux groupes ($p=0,8$) sans différence significative (Figure 34 C). Dans un même temps, l'anxiété générée par la tâche a été étudiée au fil des jours en analysant la thigmotaxie c'est-à-dire le temps passé à nager en rond le long de la paroi (Figure 34 E). De même, au cours des jours d'apprentissage, la thigmotaxie a diminué drastiquement ($p<0,000001$) et ceci dans les deux groupes ($p=0,07$) même si le profil est légèrement différent entre les deux groupes puisque les souris $Dclk3^{flox/flox}$ ont été légèrement plus anxieuses le 1^{er} jour. De plus, d'autres paramètres qui peuvent refléter l'anxiété comme le poids ont été contrôlés au cours du temps (Figure 34 A, $p=0,3$) mais aussi la vitesse de nage au cours de l'apprentissage a été analysée (Figure 34 D) ne montrant pas de différence significative entre les deux groupes ($p=0,2$).

Enfin, les souris ont été testées 72 h après le dernier jour d'entraînement en analysant le temps passé à nager dans les 4 quadrants fictifs (Figure 34 F). Les souris contrôles WT n'ont passé le même temps dans tous les quadrants. Les souris WT ont largement passé plus de temps dans les quadrants où se trouvaient la plateforme et le quadrant adjacent ($p<0,000001$). En revanche, les souris déficientes en *Dclk3* n'ont pas significativement passé plus de temps dans le quadrant de la plateforme ($p=0,08$). Une tendance est néanmoins mise en évidence.

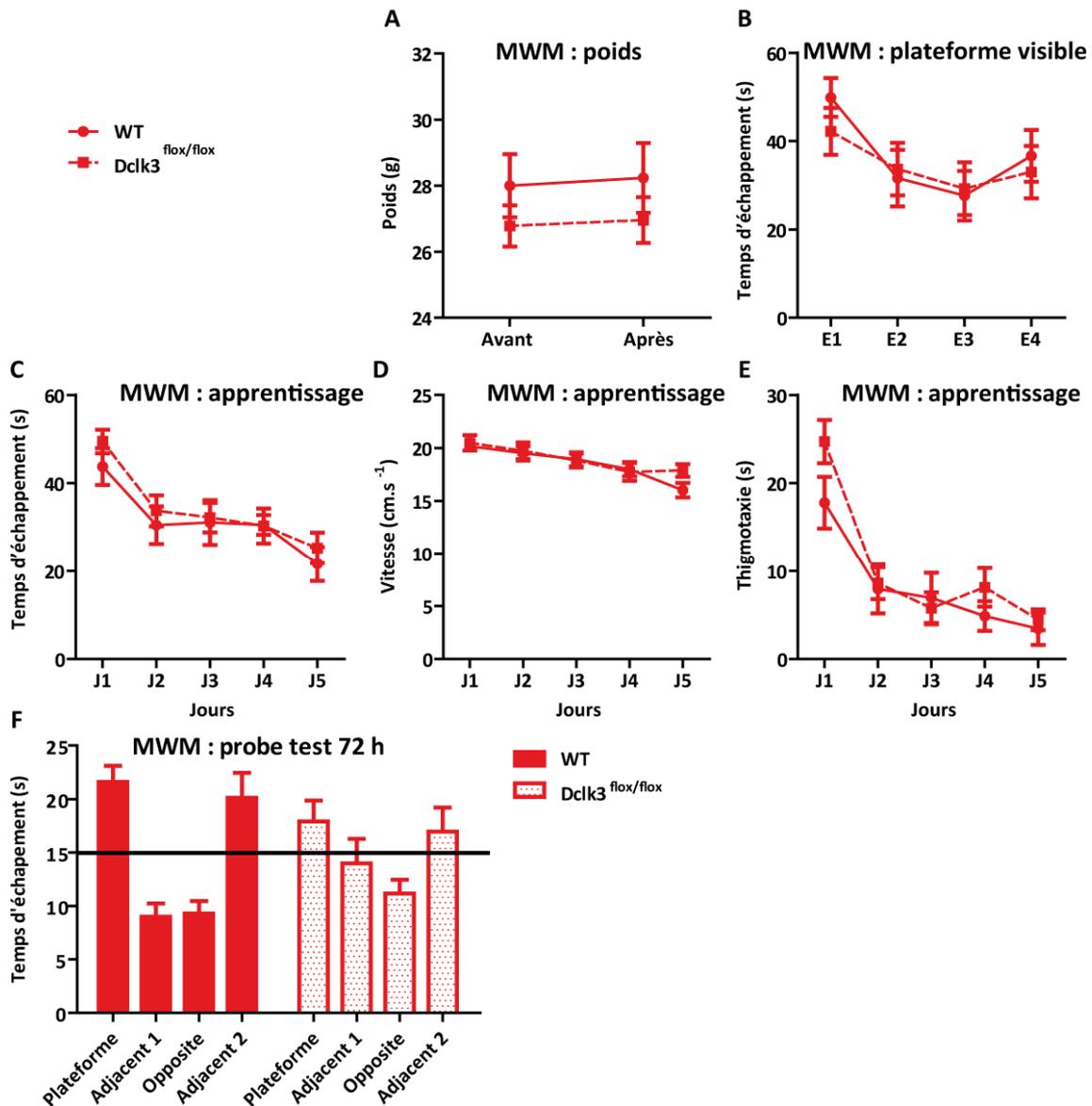


Figure 34. Etude de la mémoire à long-terme des souris *Dclk3^{flox/flox}* et de leurs compagnons de portée WT injectées avec de l'AAV9-cre par le test de la piscine de Morris (MWM). Les souris ont été injectées à 4 mois et testées à 6 mois. (A) Suivi de leur poids avant la plateforme visible et après le probe test (Test t de Student, $p=0,3$ pour avant et après). (B) Temps de latence pour atteindre la plateforme visible par les souris au cours des quatre essais (ANOVA en mesures répétées, $p=0,02$ pour les essais, $p=0,6$ pour le génotype, $p=0,8$ pour essais x génotype). (C) Temps de latence pour atteindre la plateforme immergée au cours de 5 jours d'apprentissage à raison de trois essais par jour. La moyenne des trois essais pour chaque jour a été représentée (Tests multivariés pour mesures répétées, $p<0,000001$ pour les jours, $p=0,8$ pour le génotype). (D) Vitesse moyenne de nage au cours de l'apprentissage (ANOVA en mesures répétées, $p<0,000001$ pour les jours, $p=0,6$ pour le génotype, $p=0,2$ pour jours x génotype). (E) Mesure de la thigmotaxie au cours de l'apprentissage (ANOVA en mesures répétées, $p<0,000001$ pour les jours, $p=0,4$ pour le génotype, $p=0,07$ pour jours x génotype). (F) Temps passé dans chaque quadrant au cours du probe test 72 h après le dernier jour d'apprentissage (Analyse intra-groupe par ANOVA à un facteur : $p<0,000001$ pour les WT, $p=0,08$ pour les *Dclk3^{flox/flox}*). Comparaison du temps passé dans le quadrant cible entre les souris WT et *Dclk3^{flox/flox}* (Test U de Mann-Whitney : $p=0,07$). La ligne noire pleine représente le temps théorique qu'une souris naïve passerait dans chaque quadrant. Les données sont représentées par la moyenne \pm SEM ($n=11$ WT, $n=12$ *Dclk3^{flox/flox}*). WT wild-type; MWM : piscine de Morris ; E. : essai ; J. : jours.

Suite à ces observations, nous avons décidé d'analyser les 30 premières secondes de l'enregistrement (Figure 35). Les souris WT ont passé significativement plus de temps dans le quadrant

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

1 Le rôle de DCLK3 dans le cerveau

Rappelons qu'aucune étude sur DCLK3 n'avait été publiée avant nos travaux et que le rôle de DCLK3 dans les neurones était totalement inconnu. Nous avons montré *in vivo* que DCLK3 était présente dans le noyau des neurones épineux de taille moyenne du striatum de primates non humains par microscopie confocale. DCLK3 peut aussi être retrouvée dans le cytoplasme des neurones. Sa localisation nucléaire indique cependant une fonction probablement très particulière pour cette kinase. Ces observations corroborent avec les précédentes données obtenues par criblage en double hybride et les données de transcriptomique suggérant un rôle clé de DCLK3 dans le noyau lié à la biologie de la chromatine et à la régulation de la transcription.

Le criblage en double hybride a déterminé 7 partenaires potentiels de DCLK3 dont la protéine TADA3 qui fait partie du complexe SAGA. SAGA possède deux activités de modification de la chromatine, l'acétylation H3K9 et la désubiquitination H2B. Ce complexe de régulation de la transcription est responsable de l'acétylation des promoteurs et de la désubiquitination des régions transcrites des gènes exprimés. En effet, SAGA est un élément majeur du recrutement de l'ARN polymérase II sur l'ensemble des gènes exprimés (Bonnet, et al., 2014). L'interaction de DCLK3 avec TADA3 révèle ainsi la possible implication de DCLK3 dans la machinerie de transcription et du remodelage de la chromatine. De plus, la surexpression du domaine kinase de DCLK3 dans les cellules souches embryonnaires humaines a entraîné l'augmentation de l'expression non seulement d'histones, de TAF7 qui est un facteur de transcription mais également de MLL5 et SUPT3H qui font aussi partie de SAGA. Nous analysons actuellement des données de RNA-seq dont les ARN ont été extraits du striatum et de l'hippocampe des souris KO *Dclk3* constitutives pour comprendre les réseaux de gènes associés à DCLK3 et qui pourraient donc être déséquilibrés en son absence.

Ces résultats concordent également avec le mécanisme d'une autre protéine de la sous-famille DCLKs : DCLK2. En effet, Nagamine et collaborateurs (2014) ont montré que DCLK2 était présente dans le cytoplasme mais pouvait se relocaliser et s'activer dans le noyau après le clivage de son domaine de régulation en C-terminal pour interagir avec son partenaire JDP2 qui est un facteur qui en association avec les histones régule la transcription. Par comparaison à DCLK2 du poisson zèbre, j'ai identifié dans la séquence protéique de DCLK3 une trentaine d'acides aminés proches de la séquence protéique du domaine d'auto-inhibition de DCLK2 (données non montrées). Une possible relocalisation de DCLK3 dans le noyau sous l'influence d'un stimulus pourrait être une étape déterminante pour que son

domaine kinase puisse exercer ses fonctions nucléaires liées à la transcription et au remodelage de la chromatine. Nous devons donc déterminer cette possibilité de relocalisation. Nous avons pour cela produit plusieurs constructions du gène *DCLK3* avec une étiquette de reconnaissance : *DCLK3* entier, *DCLK3* sans ce potentiel domaine d'auto-inhibition et le domaine kinase de *DCLK3* afin d'étudier la possible relocalisation de *DCLK3 in vitro* dans des cellules en culture après application d'un stress cellulaire de type glutamatergique par exemple.

La réelle fonction de *DCLK3* dans les neurones est loin d'être comprise, mais nos données qui indiquent (i) un rôle régulateur sur l'expression des gènes contrôlant la transcription ou la chromatine et (ii) un fractionnement possible de la kinase dans le cytoplasme et le noyau permettent d'émettre quelques hypothèses de travail. En particulier, dans les neurones du striatum et de l'hippocampe, la présence de *DCLK3* pourrait constituer de manière spécifique à ces cellules, par rapport à d'autres neurones n'exprimant pas *DCLK3*, un élément important de signalisation cellulaire permettant de moduler directement la transcription au niveau nucléaire en fonction d'évènements cytoplasmiques. Compte tenu (i) du caractère potentiellement « épigénétique » des effets de l'activation de *DCLK3* et de sa présence au noyau et (ii) de sa présence dans des structures cérébrales très associées à des fonctions mnésiques comme la mémoire procédurale pour le striatum et la mémoire spatiale pour l'hippocampe, nous sommes tentés de spéculer que l'une des fonctions importantes de *DCLK3* soit liée à des processus régulant la mémoire. Cette hypothèse possiblement simpliste requiert néanmoins un certain nombre d'études expérimentales pour la valider. Mon travail de thèse a initié cette démarche systématique, notamment en caractérisant par différentes méthodes complémentaires de nouvelles souris dont le gène *Dclk3* a été invalidé de manière constitutive ou conditionnelle.

2 La perte de *DCLK3* pour le cerveau

Les souris KO *Dclk3* de manière constitutive ont d'abord été étudiées au niveau comportemental. L'activité basale des souris et le rythme circadien ont été enregistrés sur 47 h et aucune différence significative n'a été observée. Le génotype n'intervient pas en effet dans les modifications du rythme circadien quels que soient l'âge et le sexe des souris testées. L'anxiété des souris a également été testée par le test du labyrinthe en croix surélevé et le test de l'*Open Field*. Mis à part à 6 mois chez les souris mâles, aucune différence d'anxiété n'a été observée entre 3 et 6 mois d'âge. Une anxiété légère mais significative a été observée chez les souris mâles âgées de 6 mois lors du test du labyrinthe en croix surélevé où les souris KO ont passé significativement moins de temps dans les bras ouverts et de ce fait moins de temps à se pencher dans le vide. En revanche, le test de l'*Open Field*, possiblement moins sensible ou moins anxiogène, n'a pas révélé une anxiété plus élevée pour les souris KO. De même, les tests moteurs n'ont pas montré de déficits moteurs chez les souris

KO *Dcl3* comparées aux souris témoins issues de la même fratrie. D'un point de vue anatomopathologique, aucune différence macroscopique majeure n'a pu être mise en évidence entre les souris KO *Dcl3* et les souris témoins. Les premières analyses morphométriques issues des acquisitions d'IRM n'ont pas révélé de différence au niveau du volume cérébral ou de différences notables dans les volumes des nombreuses structures cérébrales étudiées (collaboration avec Marc Dhenain et Nachiket Nadkarni). Le volume de quelques structures d'intérêt a été représenté à la Figure 36. Ces résultats sont encore préliminaires. Elles corroborent néanmoins l'observation que l'inactivation totale ou régionale de *Dcl3* ne produirait pas de modifications structurales majeures du cerveau chez la souris. Nous devons poursuivre ces analyses morphométriques.

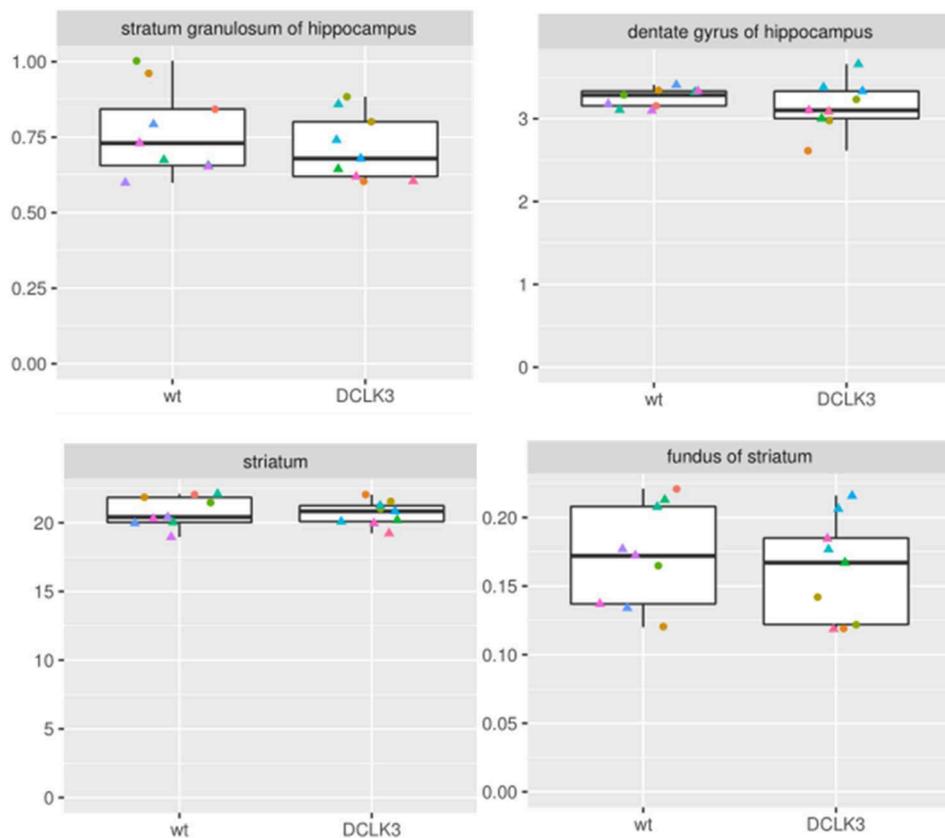


Figure 36. Analyse morphométrique préliminaire sur les souris KO *Dcl3* à 6 mois et de leurs compagnons de portée WT. Les images anatomiques de haute résolution ont été acquises avec une séquence MSME (multi slices multi echoes) (TE/TR = 5/10000 ms, 17 echoes, TE effectif : 45 ms, résolution dans le plan : 100 x 100 μm^2 , 100 coupes avec une épaisseur de 200 μm , temps d'acquisition de 20 min). Le traitement ultérieur a été effectué en utilisant le module python *sammba-mri* (<https://sammba-mri.github.io/>), qui utilise le logiciel AFNI pour la plupart des prétraitements spatiaux, et le logiciel RATS pour l'extraction du cerveau. Les images anatomiques ont d'abord été converties au format NIFTI-1. Ces images ont été immatriculées les unes par rapport aux autres par des étapes linéaires et non-linéaires pour créer un modèle d'étude. Ce dernier a été enregistré de manière non-linéaire sur un atlas cérébral de souris (Dorr, Lerch, Spring, Kabani, & Henkelman, 2008). L'atlas cérébral de la souris a ensuite été transformé en image originale de chaque individu en appliquant les transformations inverses concaténées du modèle d'étude à l'atlas du cerveau de souris et de l'individu au modèle d'étude. Ainsi, chaque individu disposait désormais d'un atlas cérébral personnalisé, utilisé pour mesurer le volume cérébral de chaque région de chaque individu. Les données ont été extraites et ont été analysées en utilisant R (<https://www.R-project.org>). (Collaboration avec Marc Dhenain et Nachiket Nadkarni).

Nous avons observé que la perte de *Dclk3* dans les différentes structures du cerveau des souris et ceci dès la naissance n'affecte pas sévèrement le phénotype comportemental des souris avec les méthodes d'évaluation comportementale utilisées lors de ma thèse. Bien que surprenant, cette absence phénotypique pourrait s'expliquer par des compensations qui s'établissent dès la naissance voire même avant la naissance chez ces souris qui naissent sans protéine *Dclk3*. Comme souligné dans le chapitre 2.2 « DCLK1 et DCLK2 », bien que des mutations du gène *DCX* soient responsables de graves maladies chez l'Homme comme la lissencéphalie, les souris KO *Dcx* ne présentent que très peu de perturbations phénotypiques (Dijkmans, van Hooijdonk, Fitzsimons, & Vreugdenhil, 2010). De même les souris déficientes en *Dclk1* ou *Dclk2* ne présentent qu'un phénotype léger. Seules les souris présentant une double déficience en *Dcx* et *Dclk1/Dclk2* ont un phénotype proche de ce qui est observé chez l'Homme. Des systèmes de compensation et des redondances protéiques doivent exister ce qui pourrait expliquer nos résultats concernant *Dclk3*. Une étude à un temps plus précoce peut être envisagée. Egalement, à l'instar des autres membres de la famille DCLKs, l'étude d'une double déficience *Dclk3/Dcx* pourrait être envisagée. Néanmoins, quelques différences entre les souris KO *Dclk3* et les souris WT ont été observées au niveau du profil des métabolites du striatum et de l'hippocampe. La glutamine qui est un métabolite principalement astrocytaire, est significativement augmentée dans le striatum des souris mâles KO à 5 mois alors qu'elle a tendance à diminuer dans le striatum des souris femelles KO à 12 mois. Ces dernières ont également une diminution significative de la glutamine dans l'hippocampe. De plus, le glutamate et la choline totale sont significativement diminués dans le striatum des souris KO mâles à 5 mois et la taurine est significativement augmentée dans l'hippocampe. La taurine est un marqueur neuronal qui montrerait l'intégrité neuronale dans l'hippocampe. Les situations de stress ou souffrance neuronale chez la souris sont souvent associées à une augmentation de la taurine, considérée comme un « osmorégulateur ». Bien que l'interprétation biologique de ces changements métaboliques (faibles mais significatifs) ne puisse être qu'hypothétique dans l'état actuel des connaissances, les résultats de spectroscopie RMN suggèrent que les souris KO *Dclk3* ne sont pas totalement « normales » comparées aux souris témoins de la même fratrie. Le plus grand nombre de changements concernerait les souris KO mâles à 6 mois. Les changements induits par la perte de *Dclk3* pourraient s'amplifier avec le vieillissement. D'une part, une étude de spectroscopie RMN chez les mâles et chez les femelles à 3 mois permettrait de déterminer si les changements sont premièrement dépendants du sexe et deuxièmement s'ils peuvent être précoces et compensés plus tard lorsque les souris deviennent adultes. D'autre part, une étude RMN chez des souris mâles et des femelles plus âgées (~18 mois) pourrait permettre de déterminer si une décompensation se produit avec le vieillissement cérébral. Chez les souris KO pour certains gènes, le phénotype n'apparaît clairement que chez les animaux très âgés, période où tout un ensemble de

perturbations cellulaires liées à l'âge empêchent les systèmes de compensation de fonctionner (décompensation).

Le striatum est préférentiellement impliqué dans la MH. De plus, pour éviter les compensations qui ont probablement lieu dans les souris KO constitutives, nous avons croisé les souris $Dclk3^{flox/flox}$ avec des souris Rgs9-cre pour obtenir une délétion uniquement striatale du gène *Dclk3* dans la souris (Dang, et al., 2006). Les souris issues du croisement ont été caractérisées sur le plan comportemental. Egalement, les souris déficientes en *Dclk3* dans le striatum n'ont pas montré d'activité spontanée et de rythme circadien perturbés au test du PhenoTyper. L'anxiété a été évaluée au test de l'*Open Field* selon la fréquence et le temps passé au centre de l'arène et les souris déficientes n'ont pas montré une anxiété exacerbée par rapport aux souris contrôles. Au test de l'*Open Field* et du Rotarod, les performances motrices et l'apprentissage moteur ont été équivalents entre les souris déficientes en *Dclk3* dans le striatum et les souris contrôles montrant que l'absence de *Dclk3* dans le striatum uniquement n'affecte pas particulièrement les souris. Le profil des métabolites est quasiment identique entre les souris contrôles et les souris déficientes en *Dclk3* dans le striatum. De manière surprenante, le tNAA qui est un métabolite préférentiellement neuronal, a tendance à augmenter dans les souris déficientes sans toutefois atteindre le seuil de significativité. Des compensations ont pu aussi avoir lieu dans ces souris. Même si ce phénomène n'a pas été étudié, un transport de *Dclk3* en provenance des autres structures du cerveau peut être envisagé puisque *Dclk3* peut également s'associer aux microtubules. De plus, les premières quantifications de la diminution de *Dclk3* que nous avons réalisées par RT-qPCR dans le striatum des souris $Dclk3^{flox/flox} / Cre$ ont montré une diminution de 30 % des ARNm de *Dclk3* loin des 60 % obtenus par Dang et collaborateurs (2006), suggérant une efficacité d'excision du gène *Dclk3^{flox/flox}* partielle. Ces résultats sont préliminaires et restent à confirmer au travers d'études complémentaires. Cette diminution d'expression de *Dclk3* n'est peut-être pas suffisante pour engendrer un effet fonctionnel important. Egalement, une étude très récente a montré la limitation de l'utilisation des souris Rgs9-cre. En effet, des recombinaisons hors cible dans la lignée germinale ont été mises en évidence (Liput, 2018). Ces recombinaisons hors cible avaient été repérées dans notre lignée où nous avons observé une délétion du gène *Dclk3* alors que le génotypage se faisait à partir du prélèvement d'un bout de queue. Ces individus ont été écartés de l'étude. Devant ces observations, la possibilité de recombinaison hors cible dans d'autres structures du cerveau est donc envisageable. Nous devons ainsi quantifier l'expression de *Dclk3* dans les autres structures du cerveau afin de vérifier cette hypothèse.

Enfin, nous avons injecté localement et à l'âge adulte un AAV-Cre dans le striatum et dans l'hippocampe des souris $Dclk3^{flox/flox}$ et des souris témoins de la même fratrie. Les souris injectées dans le striatum ont été évaluées par le test du Rotarod pour évaluer la coordination et l'apprentissage

moteurs. Les deux groupes de souris ont appris la tâche mais aucune différence significative n'a été observée entre les deux groupes. Une diminution partielle de la quantité de *Dclk3* dans le striatum des souris n'a pas entraîné de déficits moteurs. Dans une autre expérience, les souris témoins ou *Dclk3*^{flox/flox} ont reçu des injections d'AAV-Cre dans l'hippocampe puis leur mémoire spatiale a été évaluée par la piscine de Morris. Les capacités d'apprentissage ont été préservées dans les deux groupes. En analysant les 60 secondes d'enregistrement, nous avons observé une tendance dans l'atteinte de la mémoire spatiale dans les souris *Dclk3*^{flox/flox} injectées par rapport aux souris témoins injectées elles-aussi avec l'AAV-Cre ($p=0,07$ entre les deux groupes). En revanche, en analysant les 30 premières secondes, un défaut de mémoire spatiale est significativement observé dans les souris déficientes en *Dclk3*. Nous avons choisi d'analyser seulement les 30 premières secondes du test car nous avons émis l'hypothèse que ces 30 premières secondes sont déterminantes. En effet, pendant cette période, les souris qui se rappellent de la localisation de la plateforme vont nager dans les environs de la localisation de la plateforme, ne la trouvant pas, les souris vont probablement aller nager dans les autres quadrants pour vérifier que la plateforme n'a pas été déplacée. De plus, cette analyse différentielle permet éventuellement de discriminer les souris qui se souviennent immédiatement de la localisation de la plateforme et de celles qui ont besoin d'un peu plus de temps pour s'en souvenir. Ces résultats encourageants doivent être reproduits avec une deuxième cohorte pour confirmer ou infirmer le défaut de mémoire spatiale par l'inactivation localisée de *Dclk3* dans l'hippocampe. Si cet effet est confirmé, des études supplémentaires devront être entreprises pour tenter de comprendre par quels mécanismes, la baisse transitoire et aigue d'expression de *Dclk3* pourrait altérer la trace mnésique après l'apprentissage. Possiblement, d'autres tests de mémorisation pourraient être utilisés pour caractériser plus finement les performances mnésiques des souris KO *Dclk3* (Labyrinthe en double H, test de Barnes, test de reconnaissance d'objets...).

3 DCLK3 dans la maladie de Huntington

Dans nos premières études qui ont fait l'objet d'une publication (Galvan, et al., 2018), nous avons montré l'activité neuroprotectrice de *Dclk3* et particulièrement de son domaine kinase face à la toxicité de l'Httm et dans les modèles animaux de la MH. En particulier, l'expression d'un shARN ciblant *Dclk3* et diminuant son ARNm d'environ 75 %, n'était pas toxique en soit mais augmentait significativement les effets neurotoxiques de l'Httm. Ainsi, l'absence de phénotype comportemental peut paraître curieuse. Néanmoins, plusieurs souris KO pour une protéine donnée ont déjà été caractérisées d'un point de vue comportemental sans retrouver les effets délétères ou bénéfiques escomptés. Outre les souris KO *Dcx* évoquées précédemment, les souris transgéniques ou KO *Lrrk2* ne récapitulent pas exactement les principales caractéristiques de la maladie de Parkinson et notamment

la perte des neurones dopaminergiques de la substance noire qui est une caractéristique anatomopathologique de cette maladie (Hinkle, et al., 2012).

L'absence de phénotype comportemental des souris KO *Dclk3* peut aussi s'expliquer par l'absence de condition délétère pour révéler le rôle de *Dclk3*. En effet, nous pouvons émettre l'hypothèse que, tout comme *DCLK2*, *DCLK3* se relocaliserait dans le noyau après un stress cellulaire comme une excitotoxicité exacerbée pour agir dans le noyau et exercer son activité neuroprotectrice. Un stress cellulaire est donc nécessaire comme par exemple la surexpression de l'HTT pour observer éventuellement une toxicité accrue en l'absence de *Dclk3*. Nous avons ici au laboratoire, un AAV-Htt-171-82Q qui infecte 10 fois plus de volume qu'un Lenti-Htt-171-82Q. L'injection de cet AAV-Htt-171-82Q aux souris KO *Dclk3* pourrait révéler un phénotype plus délétère dans ces souris déficientes en *Dclk3*. Nous envisageons en effet cette expérience pour ensuite étudier ces souris sur le plan comportemental et sur le plan anatomopathologique afin de déterminer si l'absence de *Dclk3* est néfaste lorsqu'une souffrance cellulaire induite par l'HTT existe.

En outre, les résultats de la délétion aigue à l'âge adulte de *Dclk3* dans l'hippocampe des souris sont encourageants. En effet, nous avons montré que la délétion de *Dclk3* dans l'hippocampe pourrait entraîner des déficits de mémoire à long-terme. De toute évidence, cette expérience doit être répétée afin de confirmer ces résultats. Néanmoins, *Dclk3* pourrait également jouer un rôle dans l'hippocampe et dans les aspects cognitifs de la MH. Le domaine kinase de *DCLK3* est très proche de celui de la protéine CaMKII qui fait partie des facteurs impliqués dans la neuroplasticité. Or, de plus en plus de preuves montrent que la plasticité synaptique hippocampique est altérée dans la MH notamment à cause de la dérégulation des récepteurs AMPA et de la voie de signalisation TrkB-CaMKII (Zhang, et al., 2018). Hypothétiquement, *DCLK3* pourrait jouer un rôle dans la plasticité synaptique. De plus en plus d'études montrent le rôle de l'épigénétique dans les processus d'apprentissage et de mémoire (Annexe 1). Pendant ces processus, le neurone passe d'un état de repos à un état actif lié à leur capacité d'excitabilité. Ce type de stimulus permettrait d'activer *DCLK3* qui pourrait agir au niveau nucléaire dans des processus épigénétiques par exemple. *DCLK3* jouerait le rôle d'un relai entre les événements cellulaires cytoplasmiques et les changements épigénétiques nucléaires. Les modifications épigénétiques ont une conséquence directe sur la transcription avec l'activation des gènes de plasticité cellulaire comme les gènes précoces qui seraient très intéressants d'étudier dans notre problématique. Nous envisageons de répéter l'expérience d'injection d'AAV-cre dans l'hippocampe des souris et de tester leur mémoire spatiale à long terme par le test de la piscine de Morris. Les souris seront sacrifiées 1 h après le test d'évaluation afin de pouvoir étudier en immunohistochimie les gènes précoces comme *c-fos*, *Egr1* et *Arc* qui sont les premiers à changer après un apprentissage.

De plus, la mémoire spatiale qui nécessite aussi une certaine plasticité synaptique est altérée dans certains modèles murins de la MH (Tableau 3) et notamment les souris R6/1. L'effet neuroprotecteur pourrait être davantage souligné par l'injection d'un AAV-Dclk3 dans l'hippocampe de ces souris R6/1 dont la mémoire spatiale serait testée par la suite grâce à la piscine de Morris ou le test de Barnes. Le défaut de mémoire spatiale chez les patients atteints de la MH est débattu (Possin, et al., 2017; Begeti, Schwab, Mason, & Barker, 2016) mais l'interaction entre le noyau caudé et l'hippocampe est trop souvent négligée alors que ces deux systèmes contribuent de manière non compétitive et compétitive à la reconnaissance de la voie à prendre (Voermans, et al., 2004). Cette interaction a également été étudiée dans les souris R6/1 montrant un déséquilibre progressif entre les systèmes de mémoire spatiale et procédurale dans l'évolution de la pathologie (Ciamei & Morton, 2009). DCLK3 étant enrichie dans le gyrus denté de l'hippocampe, DCLK3 pourrait également intervenir au niveau de la neurogenèse et de la migration neuronale comme DCLK1 et DCLK2 (Shin, et al., 2013; Friocourt, et al., 2007; Koizumi, Tanaka, & Gleeson, 2006). De plus, DCLK3 interagirait de manière privilégiée avec CDK5 (Varjosalo, et al., 2013). CDK5 est une kinase dépendante des cyclines qui est nécessaire au développement du cerveau et qui est impliquée dans la maturation neuronale et dans la migration cellulaire (Jessberger, et al., 2008). Son rôle dans d'autres maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer a été mis en évidence (Qu, et al., 2011)(pour revue, (Monaco III, 2004; Dhavan & Tsai, 2001). Egalement, plusieurs modèles murins de la MH présentent des déficits de neurogenèse (Tableau 4). De plus, la neurogenèse contribue aussi aux mécanismes de plasticité. Après injection de l'AAV-Dclk3 dans l'hippocampe, nous pourrions étudier la neurogenèse dans ces souris R6/1 qui sont connues pour avoir un défaut de neurogenèse et ainsi voir si la surexpression de Dclk3 rétablit un taux de neurogenèse suffisant. Enfin, par comparaison à DCLK1 et DCLK2, DCLK3 pourrait intervenir dans le remodelage dendritique et à la suppression des synapses matures (Shin, et al., 2013) mais aussi à la survie neuronale en stabilisant les microtubules au niveau axonal (Nawabi, et al., 2015).

La présence de DCLK3 dans le noyau a permis de corroborer les résultats obtenus en double-hybride montrant l'interaction de DCLK3 avec TADA3 et les résultats de transcriptomique montrant la possible implication de DCLK3 dans la transcription et dans le remodelage de la chromatine. Notamment, la surexpression du domaine kinase de DCLK3 dans les cellules souches embryonnaires humaines a entraîné la surexpression d'un certain nombre d'histones. Tout comme DCLK2 qui se relocalise dans le noyau pour interagir avec son partenaire JDP2, qui en association avec les histones, régule la transcription, nous pouvons émettre l'hypothèse que DCLK3 étant une kinase, peut phosphoryler les histones. Or, la phosphorylation des histones est une modification post-traductionnelle qui intervient dans plusieurs processus physiologiques comme la régulation des gènes et dans le processus de réparation de l'ADN comme les cassures double-brins de l'ADN (pour revue,

(Rossetto, Avvakumov, & Côté, 2012)). Cette hypothèse validerait à nouveau le rôle de DCLK3 comme une protéine intervenant dans les processus épigénétiques mais aussi que DCLK3 pourrait être impliquée dans les processus de réparation de l'ADN.

Des données très récentes montrent que *DCLK3* serait un gène régulé par des *super-enhancers* (Figure 37). Les *super-enhancers* sont une classe d'*enhancers* qui régulent des gènes impliqués dans l'identité tissulaire et la fonction. Nous avons vu dans les chapitres 1.4.3 « Dérégulation transcriptionnelle » et 1.4.4 « La piste épigénétique de la dérégulation transcriptionnelle » que la transcription et l'épigénétique étaient dérégulées dans la MH. Précisément, les gènes dont l'expression est diminuée dans le striatum présentent une signature neuronale car ces gènes sont impliqués dans l'identité et la fonction neuronale des neurones du striatum. Ces données montrent des dérégulations épigénétiques qui aboutissent à l'altération de l'activité des *super-enhancers*. En conséquence, les gènes cibles de ces *super-enhancers* sont sous-exprimés. En effet, la diminution de l'acétylation H3K27 est sélectivement réduite au niveau des gènes striataux régulés par les *super-enhancers* (Figure 37) et en particulier au niveau de *Dclk3* dans le striatum des souris R6/1. L'acétylation H3K27 est une marque de régulation des gènes par les *super-enhancers* pour favoriser la transcription de ces gènes cibles. Ainsi ces résultats montrent que *Dclk3*, qui est une cible des *super-enhancers* et dont la fonction serait liée à la biologie de la chromatine pourrait fortement contribuer à la pathogénèse de la MH. Ainsi la diminution de l'activité des *super-enhancers* a pour conséquence la diminution de l'expression de *Dclk3* en retour. Cette dérégulation pourrait jouer comme un cercle vicieux où l'expression de DCLK3 serait diminuée dû aux dérèglements des *super-enhancers* et donc par conséquent ne peut plus jouer son rôle épigénétique en retour. Par ailleurs, l'expression de DCLK3 kinase pourrait avoir un effet «stimulant» sur une partie de la transcription dépendante de SAGA via son interaction avec TADA3. En conséquence, sa perte d'expression pourrait avoir un effet délétère sur l'expression de nombreux gènes permettant un fonctionnement optimal des neurones. Dans notre travail publié en collaboration avec Anselme Perrier (Galvan et al, 2018), nous avons montré que plusieurs des gènes « cibles » régulés par le domaine kinase de DCLK3 dans des neurones striataux humains en culture (notamment des histones et facteurs de transcription) sont aussi régulés par DCLK3 en présence de l'Httm. Ces mêmes gènes peuvent être associés à un effet neuroprotecteur. Par exemple, l'augmentation d'expression de la phosphodiesterase 10A (PDE10A) est un marqueur clé des neurones striataux.

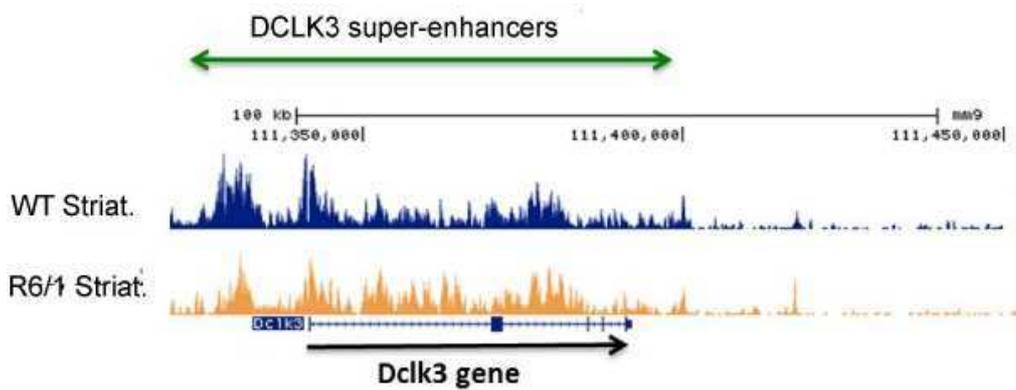


Figure 37. Analyse ChIPseq H3K27ac montrant la régulation de *Dclk3* par des super-enhancers dans le striatum des souris WT et R6/1. Les super-enhancers sont un ensemble d'enhancers qui contrôlent des gènes impliqués dans l'identité des cellules. Le signal H3K27ac est représentatif des gènes contrôlés par des super-enhancers. (Collaboration Karine Merienne).

Enfin, le gène *DCLK3* est associé à *MLH1* dans les cancers colorectaux due à un effet à distance d'un polymorphisme nucléotidique dans le promoteur du gène *MLH1* (Liu, et al., 2017). Les deux gènes sont très proches sur le chromosome 3. De manière intéressante, *MLH1* est un modificateur génétique de la progression de la MH selon le polymorphisme nucléotidique impliqué (Lee, et al., 2017b; Genetic Modifiers of Huntington's Disease Consortium, 2015; Pinto, et al., 2013). *MLH1* et *MLH3* constituent un complexe impliqué dans le « mismatch repair ». Ce processus pourrait être un processus impliqué dans la pathogénèse de la MH (Swami, et al., 2009) et d'autres atteintes avec expansion de CAG (pour revue, (Jones, Houlden, & Tabrizi, 2017)). En effet, l'inactivation de *Mlh1* réduit fortement l'expansion (mosaïsme) des CAG chez les souris knock-in 111, modèle de la MH (Pinto, et al., 2013). Hypothétiquement, si une inhibition de *MLH1* est mise en place pour éviter la progression de la pathogénèse, en particulier l'expansion des CAG dans le striatum, l'expression de *DCLK3* pourrait être aussi inhibée par cette relation à distance avec *MLH1*, ce qui pourrait amplifier le phénomène de dégénérescence striatale.

CONCLUSIONS

De nombreuses questions restent en suspens quant aux rôles de DCLK3 dans la cellule et plus globalement dans la MH. Même si l'inactivation constitutive de Dclk3 n'a pas d'effet majeur sur le comportement, la délétion locale et aigue de Dclk3 à l'âge adulte altérerait la mémoire spatiale suggérant l'importance de DCLK3 dans la compensation d'un stress aigu, qui dans des conditions normales ou pathologiques pourrait altérer la mémoire spatiale. Ainsi, comprendre le rôle de DCLK3 permettrait 1) de trouver des mécanismes pour favoriser son activité neuroprotectrice et 2) de trouver de nouvelles cibles d'étude dans les voies de régulation de DCLK3 afin de potentiellement développer de nouvelles stratégies. Par exemple, l'activation spécifique de sa kinase par une molécule thérapeutique est à envisager.

En revanche, les recherches actuelles suggèrent que la stratégie thérapeutique la plus convaincante est l'utilisation de la thérapie génique et notamment de la technique CRISPR-Cas9 associée à la vectorisation virale. Néanmoins ces techniques restent compliquées à mettre en œuvre pour assurer la sûreté de la technique. L'HTT est nécessaire à la vie de la cellule (Duyao, et al., 1993) et une ablation totale de l'expression de l'HTT n'est donc pas envisageable. Un ciblage spécifique de l'allèle muté doit donc être développé. De plus, les thérapies géniques qui touchent directement l'ADN est irréversible. Par conséquent, la technique utilisée doit être vérifiée pour ne pas avoir de délétion hors cible ce qui pourrait être néfaste pour l'individu. Enfin, à l'heure actuelle, la diffusion des vecteurs viraux est également une limitation non négligeable à prendre en compte.

Par conséquent, l'étude de cibles thérapeutiques comme DCLK3 et ses partenaires moléculaires reste pertinente afin notamment de ralentir la pathogénèse et assurer ainsi une meilleure qualité de vie aux patients. Enfin, la MH a toujours été une maladie « modèle » pour comprendre la pathogénèse des maladies neurodégénératives. L'étude de DCLK3 dans d'autres maladies neurodégénératives est aussi une possibilité et notamment dans la maladie d'Alzheimer, maladie où l'atteinte hippocampique et les déficits mnésiques sont majeurs.

BIBLIOGRAPHIE

- Abada, Y., Schreiber, R., & Ellenbroek, B. (2013). Motor, emotional and cognitive deficits in adult BACHD mice: a model for Huntington's disease. *Behavioural brain research*, 238, 243-251.
- Achour, M., Le Gras, S., Keime, C., Parmentier, F., Lejeune, F., Boutillier, A., . . . Merienne, K. (2015). Neuronal identity genes regulated by super-enhancers are preferentially down-regulated in the striatum of Huntington's disease mice. *Human molecular genetics*, 24(12), 3481-3486.
- ACMG/ASHG statement. (1998). Laboratory Guidelines for Huntington Disease Genetic Testing. *The American Society of Human Genetics*, 62, 1243-1247.
- Aggarwal, M., Duan, W., Hou, Z., Rakesh, N., Peng, Q., Ross, C., . . . Zhang, J. (2012). Spatiotemporal mapping of brain atrophy in mouse models of Huntington's disease using longitudinal in vivo magnetic resonance imaging. *Neuroimage*, 60(4), 2086-2095.
- Ahmad, K., Baig, M., Mushtaq, G., Kamal, M., Greig, N., & Choi, I. (2017). Commonalities in Biological Pathways, Genetics, and Cellular Mechanism between Alzheimer Disease and Other Neurodegenerative Diseases: An In Silico-Updated Overview. *Current Alzheimer research*, 14(11), 1190-1197.
- Albin, R., Young, A., & Penney, J. (1989). The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends in Neurosciences*, 12(10), 366-375.
- Al-Ramahi, I., Lu, B., Di Paola, S., Pang, K., de Haro, M., Peluso, I., . . . Botas, J. (2018). High-Throughput Functional Analysis Distinguishes Pathogenic, Nonpathogenic, and Compensatory Transcriptional Changes in Neurodegeneration. *Cell systems*, 28-40.e4.
- Andrew, S., Goldberg, Y., Kremer, B., Telenius, H., Theilmann, J., Adam, S., . . . Kalchman, M. (1993). The relationship between trinucleotide (CAG) repeat length and clinical features of Huntington's disease. *Nature genetics*, 4(4), 398-403.
- Arango, M., Holbert, S., Zala, D., Brouillet, E., Pearson, J., Régulier, E., . . . Néri, C. (2006). CA150 expression delays striatal cell death in overexpression and knock-in conditions for mutant huntingtin neurotoxicity. *The journal of neuroscience*, 26(17), 4649-4659.
- Aurnhammer, C., Haase, M., Muether, N., Hausl, M., Rauschhuber, C., Huber, I., . . . Baiker, A. (2012). Universal real-time PCR for the detection and quantification of adeno-associated virus

- serotype 2-derived inverted terminal repeat sequences. *Human gene therapy methods*, 23(1), 18-28.
- Aylward, E., Sparks, B., Field, K., Yallapragada, V., Shpritz, B., Rosenblatt, A., . . . Ross, C. (2004). Onset and rate of striatal atrophy in preclinical Huntington disease. *Neurology*, 63(1), 66-72.
- Bae, B., Xu, H., Igarashi, S., Fujimuro, M., Agrawal, N., Taya, Y., . . . Sawa, A. (2005). p53 mediates cellular dysfunction and behavioral abnormalities in Huntington's disease. *Neuron*, 47(1), 29-41.
- Baldo, B., Cheong, R., & Petersén, Å. (2014). Effects of deletion of mutant huntingtin in steroidogenic factor 1 neurons on the psychiatric and metabolic phenotype in the BACHD mouse model of Huntington disease. *PloS one*, 9(10), e107691.
- Ballas, N., Grunseich, C., Lu, D., Speh, J., & Mandel, G. (2005). REST and its corepressors mediate plasticity of neuronal gene chromatin throughout neurogenesis. *Cell*, 121(4), 645-657.
- Bañez-Coronel, M., Ayhan, F., Tarabochia, A., Zu, T., Perez, B., Tusi, S., . . . Ranum, L. (2015). RAN Translation in Huntington Disease. *Neuron*, 88(4), 667-677.
- Bannister, A., & Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell research*, 21(3), 381-395.
- Baquet, Z., Gorski, J., & Jones, K. (2004). Early striatal dendrite deficits followed by neuron loss with advanced age in the absence of anterograde cortical brain-derived neurotrophic factor. *The journal of neuroscience*, 24(17), 4250-4258.
- Bartsch, T., & Wulff, P. (2015). The hippocampus in aging and disease: from plasticity to vulnerability. *Neuroscience*, 309, 1-16.
- Baxa, M., Hruska-Plochan, M., Juhas, S., Vodicka, P., Pavlok, A., Juhasova, J., . . . Sontag, E. (2013). A transgenic minipig model of Huntington's Disease. *Journal of Huntington's disease*, 2(1), 47-68.
- Bayram-Weston, Z., Jones, L., Dunnett, S., & Brooks, S. (2012). Light and electron microscopic characterization of the evolution of cellular pathology in the R6/1 Huntington's disease transgenic mice. *Brain research bulletin*, 88(2-3), 104-112.

- Beal, M., Brouillet, E., Jenkins, B., Ferrante, R., Kowall, N., Miller, J., . . . Hyman, B. (1993). Neurochemical and histologic characterization of striatal excitotoxic lesions produced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. *The journal of neuroscience*, *13*(10), 4181-4192.
- Beal, M., Kowall, N., Ellison, D., Mazurek, M., Swartz, K., & Martin, J. (1986). Replication of the neurochemical characteristics of Huntington's disease by quinolinic acid. *Nature*, *321*(6066), 168-171.
- Begeti, F., Schwab, L., Mason, S., & Barker, R. (2016). Hippocampal dysfunction defines disease onset in Huntington's disease. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, *87*(9), 975-981.
- Ben Haim, L., Ceyzériat, K., Carrillo-de Sauvage, M., Aubry, F., Auregan, G., Guillermier, M., . . . Escartin, C. (2015). The JAK/STAT3 pathway is a common inducer of astrocyte reactivity in Alzheimer's and Huntington's diseases. *The journal of neuroscience*, *35*(6), 2817-2829.
- Benchoua, A., Trioulier, Y., Zala, D., Gaillard, M., Lefort, N., Dufour, N., . . . Brouillet, E. (2006). Involvement of mitochondrial complex II defects in neuronal death produced by N-terminus fragment of mutated huntingtin. *Molecular biology of the cell*, *17*(4), 1652-1663.
- Benn, C., Sun, T., Sadri-Vakili, G., McFarland, K., DiRocco, D., Yohrling, G., . . . Cha, J. (2008). Huntingtin modulates transcription, occupies gene promoters in vivo, and binds directly to DNA in a polyglutamine-dependent manner. *The journal of neuroscience*, *28*(42), 10720-10733.
- Berson, A., Nativio, R., Berger, S., & Bonini, N. (2018). Epigenetic Regulation in Neurodegenerative Diseases. *Trends in neurosciences*, *41*(9), 587-598.
- Biagioli, M., Ferrari, F., Mendenhall, E., Zhang, Y., Erdin, S., Vijayvargia, R., . . . Seong, I. (2015). Htt CAG repeat expansion confers pleiotropic gains of mutant huntingtin function in chromatin regulation. *Human molecular genetics*, *24*(9), 2442-2457.
- Bliss, T., & Collingridge, G. (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, *361*(6407), 31-39.
- Bolivar, V., Manley, K., & Messer, A. (2003). Exploratory activity and fear conditioning abnormalities develop early in R6/2 Huntington's disease transgenic mice. *Behavioral neuroscience*, *117*(6), 1233-1242.
- Bonnet, J., Wang, C., Baptista, T., Vincent, S., Hsiao, W., Stierle, M., . . . Devys, D. (2014). The SAGA coactivator complex acts on the whole transcribed genome and is required for RNA polymerase II transcription. *Genes & Development*, *28*(18), 1999-2012.

- Borrelli, E., Nestler, E., Allis, C., & Sassone-Corsi, P. (2008). Decoding the epigenetic language of neuronal plasticity. *Neuron*, *60*(6), 961-974.
- Bossy-Wetzell, E., Petrilli, A., & Knott, A. (2008). Mutant huntingtin and mitochondrial dysfunction. *Trends in neurosciences*, *31*(12), 609-616.
- Bousiges, O., Neidl, R., Majchrzak, M., Muller, M., Barbelivien, A., Pereira de Vasconcelos, A., . . . Boutillier, A. (2013). Detection of histone acetylation levels in the dorsal hippocampus reveals early tagging on specific residues of H2B and H4 histones in response to learning. *PLoS one*, *8*(3).
- Brennan, W. J., Bird, E., & Aprille, J. (1985). Regional mitochondrial respiratory activity in Huntington's disease brain. *Journal of neurochemistry*, *44*(6), 1948-1950.
- Brochier, C., Gaillard, M., Diguët, E., Caudy, N., Dossat, C., Ségurens, B., . . . de Chaldée, M. (2008). Quantitative gene expression profiling of mouse brain regions reveals differential transcripts conserved in human and affected in disease models. *Physiological genomics*, *33*(2), 170-179.
- Brooks, S., & Dunnett, S. (2009). Tests to assess motor phenotype in mice: a user's guide. *Nature reviews. Neuroscience*, *10*(7), 519-529.
- Brooks, S., Janghra, N., Higgs, G., Bayram-Weston, Z., Heuer, A., Jones, L., & Dunnett, S. (2012a). Selective cognitive impairment in the YAC128 Huntington's disease mouse. *Brain research bulletin*, *88*(2-3), 121-129.
- Brooks, S., Janghra, N., Workman, V., Bayram-Weston, Z., Jones, L., & Dunnett, S. (2012b). Longitudinal analysis of the behavioural phenotype in R6/1 (C57BL/6J) Huntington's disease transgenic mice. *Brain research bulletin*, *88*(2-3), 91-103.
- Brooks, S., Jones, L., & Dunnett, S. (2012c). Longitudinal analyses of operant performance on the serial implicit learning task (SILT) in the YAC128 Huntington's disease mouse line. *Brain research bulletin*, *88*, 130-136.
- Brouillet, E. (2014). The 3-NP Model of Striatal Neurodegeneration. *Current protocols in neuroscience*, *67*.
- Brouillet, E., Hantraye, P., Ferrante, R., Dolan, R., Leroy-Willig, A., Kowall, N., & Beal, M. (1995). Chronic mitochondrial energy impairment produces selective striatal degeneration and abnormal choreiform movements in primates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *92*(15), 7105-7109.

- Brouillet, E., Jacquard, C., Bizat, N., & Blum, D. (2005). 3-Nitropropionic acid: a mitochondrial toxin to uncover physiopathological mechanisms underlying striatal degeneration in Huntington's disease. *Journal of neurochemistry*, *95*(6), 1521-1540.
- Brustovetsky, N. (2016). Mutant Huntingtin and Elusive Defects in Oxidative Metabolism and Mitochondrial Calcium Handling. *Molecular neurobiology*, *53*(5), 2944-2953.
- Buckley, N., Johnson, R., Zuccato, C., Bithell, A., & Cattaneo, E. (2010). The role of REST in transcriptional and epigenetic dysregulation in Huntington's disease. *Neurobiology of disease*, *39*(1), 28-39.
- Burgess, H., & Reiner, O. (2001). Cleavage of doublecortin-like kinase by calpain releases an active kinase fragment from a microtubule anchorage domain. *The journal of biological chemistry*, *276*(39), 36397-36403.
- Burgess, H., Martinez, S., & Reiner, O. (1999). KIAA0369, doublecortin-like kinase, is expressed during brain development. *Journal of neuroscience research*, *58*(4), 567-575.
- Busse, M., Quinn, L., Debono, K., Jones, K., Collett, J., Playle, R., . . . Rosser, A. (2013). A randomized feasibility study of a 12-week community-based exercise program for people with Huntington's disease. *Journal of neurologic physical therapy*, *37*(4), 149-158.
- Butterworth, J., Yates, C., & Reynolds, G. (1985). Distribution of phosphate-activated glutaminase, succinic dehydrogenase, pyruvate dehydrogenase and gamma-glutamyl transpeptidase in post-mortem brain from Huntington's disease and agonal cases. *Journal of neurological sciences*, *67*(2), 161-171.
- Calabresi, P., Picconi, B., Tozzi, A., Ghiglieri, V., & Di Filippo, M. (2014). Direct and indirect pathways of basal ganglia: a critical reappraisal. *Nature neuroscience*, *17*(8), 1022-1030.
- Cayzac, S., Delcasso, S., Paz, V., Jeantet, Y., & Cho, Y. (2011). Changes in striatal procedural memory coding correlate with learning deficits in a mouse model of Huntington disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(22), 9280-9285.
- Cha, J. (2007). Transcriptional signatures in Huntington's disease. *Progress in neurobiology*, *83*(4), 228-248.
- Chan, D. (2006). Mitochondria: Dynamic Organelles in Disease, Aging, and Development. *Cell*, *125*(7), 1241-1252.

- Chang, D., Rintoul, G., Pandipati, S., & Reynolds, I. (2006). Mutant huntingtin aggregates impair mitochondrial movement and trafficking in cortical neurons. *Neurobiology of disease*, *22*(2), 388-400.
- Choo, Y., Johnson, G., MacDonald, M., Detloff, P., & Lesort, M. (2004). Mutant huntingtin directly increases susceptibility of mitochondria to the calcium-induced permeability transition and cytochrome c release. *Human molecular genetics*, *13*(14), 1407-1420.
- Chung, D., Rudnicki, D., Yu, L., & Margolis, R. (2011). A natural antisense transcript at the Huntington's disease repeat locus regulates HTT expression. *Human molecular genetics*, *20*(17), 3467-3477.
- Ciamei, A., & Morton, A. (2009). Progressive imbalance in the interaction between spatial and procedural memory systems in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. *Neurobiology of learning and memory*, *92*(3), 417-428.
- Colin, E., Zala, D., Liot, G., Rangone, H., Borrell-Pagès, M., Li, X., . . . Humbert, S. (2008). Huntingtin phosphorylation acts as a molecular switch for anterograde/retrograde transport in neurons. *EMBO*, *27*(15), 2124-2134.
- Coppen, E., & Roos, R. (2017). Current Pharmacological Approaches to Reduce Chorea in Huntington's Disease. *Drugs*, *77*(1), 29-46.
- Corbo, J., Deuel, T., Long, J., LaPorte, P., Tsai, E., Wynshaw-Boris, A., & Walsh, C. (2002). Doublecortin is required in mice for lamination of the hippocampus but not the neocortex. *The journal of neuroscience*, *22*(17), 7548-7557.
- Cui, L., Jeong, H., Borovecki, F., Parkhurst, C., Tanese, N., & Krainc, D. (2006). Transcriptional repression of PGC-1alpha by mutant huntingtin leads to mitochondrial dysfunction and neurodegeneration. *Cell*, *127*(1), 59-69.
- Damiano, M., Diguët, E., Malgorn, C., D'Aurelio, M., Galvan, L., Petit, F., . . . Brouillet, E. (2013). A role of mitochondrial complex II defects in genetic models of Huntington's disease expressing N-terminal fragments of mutant huntingtin. *Human molecular genetics*, *22*(19), 3869-3882.
- Dang, M., Yokoi, F., Yin, H., Lovinger, D., Wang, Y., & Li, Y. (2006). Disrupted motor learning and long-term synaptic plasticity in mice lacking NMDAR1 in the striatum. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(41), 15254-15259.
- Davidson, B., Stein, C., Heth, J., Martins, I., Kotin, R., Derksen, T., . . . Chiorini, J. (2000). Recombinant adeno-associated virus type 2, 4, and 5 vectors: transduction of variant cell types and regions

- in the mammalian central nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(7), 3428-3432.
- Day, J., & Sweatt, J. (2010). DNA methylation and memory formation. *Nature neuroscience*, 13(11), 1319-1323.
- de Almeida, L., Ross, C., Zala, D., Aebischer, P., & Déglon, N. (2002). Lentiviral-mediated delivery of mutant huntingtin in the striatum of rats induces a selective neuropathology modulated by polyglutamine repeat size, huntingtin expression levels, and protein length. *The journal of neuroscience*, 22(9), 3473-3483.
- de la Monte, S., Vonsattel, J., & Richardson, E. J. (1988). Morphometric demonstration of atrophic changes in the cerebral cortex, white matter, and neostriatum in Huntington's disease. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 47(5), 516-525.
- Deaton, A., & Bird, A. (2011). CpG islands and the regulation of transcription. *Genes & development*, 25(10), 1010-1022.
- Déglon, N., & Hantraye, P. (2005). Viral vectors as tools to model and treat neurodegenerative disorders. *The journal of gene medicine*, 7(5), 530-539.
- DeLong, M. (1990). Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends in neurosciences*, 13(7), 281-285.
- des Portes, V., Francis, F., Pinard, J., Desguerre, I., Moutard, M., Snoeck, I., . . . Beldjord, C. (1998a). doublecortin is the major gene causing X-linked subcortical laminar heterotopia (SCLH). *Human molecular genetics*, 7(7), 1063-1070.
- des Portes, V., Pinard, J., Billuart, P., Vinet, M., Koulakoff, A., Carrié, A., . . . Chelly, J. (1998b). A novel CNS gene required for neuronal migration and involved in X-linked subcortical laminar heterotopia and lissencephaly syndrome. *Cell*, 92(1), 51-61.
- Desplats, P., Kass, K., Gilmartin, T., Stanwood, G., Woodward, E., Head, S., . . . Thomas, E. (2006). Selective deficits in the expression of striatal-enriched mRNAs in Huntington's disease. *Journal of neurochemistry*, 96(3), 743-757.
- Deuel, T., Liu, J., Corbo, J., Yoo, S., Rorke-Adams, L., & Walsh, C. (2006). Genetic interactions between doublecortin and doublecortin-like kinase in neuronal migration and axon outgrowth. *Neuron*, 49(1), 41-53.

- Dhavan, R., & Tsai, L. (2001). A decade of CDK5. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 2(10), 749-759.
- Di Figlia, M. (1990). Excitotoxic injury of the neostriatum: a model for Huntington's disease. *Trends in neurosciences*, 13(7), 286-289.
- DiFiglia, M., Sapp, E., Chase, K., Davies, S., Bates, G., Vonsattel, J., & Aronin, N. (1997). Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science*, 277(5334), 1990-1993.
- DiFiglia, M., Sena-Esteves, M., Chase, K., Sapp, E., Pfister, E., Sass, M., . . . Aronin, N. (2007). Therapeutic silencing of mutant huntingtin with siRNA attenuates striatal and cortical neuropathology and behavioral deficits. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(43), 17204-17209.
- Diguet, E., Petit, F., Escartin, C., Cambon, K., Bizat, N., Dufour, N., . . . Brouillet, E. (2009). Normal aging modulates the neurotoxicity of mutant huntingtin. *PloS one*, 4(2), e4637.
- Dijkmans, T., van Hooijdonk, L., Fitzsimons, C., & Vreugdenhil, E. (2010). The doublecortin gene family and disorders of neuronal structure. *Central nervous system agents in medicinal chemistry*, 10(1), 32-46.
- Dong, X., Tsuji, J., Labadorf, A., Roussos, P., Chen, J., Myers, R., . . . Weng, Z. (2015). The Role of H3K4me3 in Transcriptional Regulation Is Altered in Huntington's Disease. *PloS one*, 10(12).
- Dorr, A., Lerch, J., Spring, S., Kabani, N., & Henkelman, R. (2008). High resolution three-dimensional brain atlas using an average magnetic resonance image of 40 adult C57Bl/6J mice. *Neuroimage*, 42(1), 60-69.
- Dragatsis, I., Levine, M., & Zeitlin, S. (2000). Inactivation of Hdh in the brain and testis results in progressive neurodegeneration and sterility in mice. *Nature genetics*, 26(3), 300-306.
- Drouet, V., Perrin, V., Hassig, R., Dufour, N., Auregan, G., Alves, S., . . . Déglon, N. (2009). Sustained effects of nonallele-specific Huntingtin silencing. *Annals of neurology*, 65(3), 276-285.
- Duan, W., Peng, Q., Masuda, N., Ford, E., Tryggestad, E., Ladenheim, B., . . . Ross, C. (2008). Sertraline slows disease progression and increases neurogenesis in N171-82Q mouse model of Huntington's disease. *Neurobiology of disease*, 30(3), 312-322.
- Duyao, M., Ambrose, C., Myers, R., Novelletto, A., Persichetti, F., Frontali, M., . . . Abbott, M. (1993). Trinucleotide repeat length instability and age of onset in Huntington's disease. *Nature genetics*, 4(4), 387-392.

- Duyao, M., Auerbach, A., Ryan, A., Persichetti, F., Barnes, G., McNeil, S., . . . Joyner, A. (1995). Inactivation of the mouse Huntington's disease gene homolog Hdh. *Science*, *269*(5222), 407-410.
- Edelman, A., Kim, W., Higgins, D., Goldstein, E., Oberdoerster, M., & Sigurdson, W. (2005). Doublecortin kinase-2, a novel doublecortin-related protein kinase associated with terminal segments of axons and dendrites. *The journal of biological chemistry*, *280*(9), 8531-8543.
- Engels, B., Schouten, T., van Dullemen, J., Gosens, I., & Vreugdenhil, E. (2004). Functional differences between two DCLK splice variants. *Brain research. Molecular brain research*, *120*(2), 103-114.
- Estrada-Sánchez, A., & Rebec, G. (2012). Corticostriatal dysfunction and glutamate transporter 1 (GLT1) in Huntington's disease: interactions between neurons and astrocytes. *Basal ganglia*, *2*(2), 57-66.
- Estrada-Sánchez, A., Burroughs, C., Cavaliere, S., Barton, S., Chen, S., Yang, X., & Rebec, G. (2015). Cortical efferents lacking mutant huntingtin improve striatal neuronal activity and behavior in a conditional mouse model of Huntington's disease. *The journal of neuroscience*, *35*(10), 4440-4451.
- Faideau, M., Kim, J., Cormier, K., Gilmore, R., Welch, M., Auregan, G., . . . Bonvento, G. (2010). In vivo expression of polyglutamine-expanded huntingtin by mouse striatal astrocytes impairs glutamate transport: a correlation with Huntington's disease subjects. *Human molecular genetics*, *19*(15), 3053-3067.
- Farina, F., Lambert, E., Commeau, L., Lejeune, F., Roudier, N., Fonte, C., . . . Neri, C. (2017). The stress response factor daf-16/FOXO is required for multiple compound families to prolong the function of neurons with Huntington's disease. *Scientific reports*.
- Fedele, V., Roybon, L., Nordström, U., Li, J., & Brundin, P. (2011). Neurogenesis in the R6/2 mouse model of Huntington's disease is impaired at the level of NeuroD1. *Neuroscience*, *173*, 76-81.
- Ferrante, R., Gutekunst, C., Persichetti, F., McNeil, S., Kowall, N., Gusella, J., . . . Hersch, S. (1997). Heterogeneous topographic and cellular distribution of huntingtin expression in the normal human neostriatum. *Journal of Neuroscience*, *17*(9), 3052-3063.
- Francelle, L., Galvan, L., & Brouillet, E. (2014). Possible involvement of self-defense mechanisms in the preferential vulnerability of the striatum in Huntington's disease. *Frontiers in cellular neuroscience*, *8*(295).

- Francelle, L., Lotz, C., Outeiro, T., Brouillet, E., & Merienne, K. (2017). Contribution of Neuroepigenetics to Huntington's Disease. *Frontiers in human neuroscience*, *11*(17).
- Francis, F., Koulakoff, A., Boucher, D., Chafey, P., Schaar, B., Vinet, M., . . . Chelly, J. (1999). Doublecortin is a developmentally regulated, microtubule-associated protein expressed in migrating and differentiating neurons. *Neuron*, *23*(2), 247-256.
- Friocourt, G., Liu, J., Antypa, M., Rakic, S., Walsh, C., & Parnavelas, J. (2007). Both doublecortin and doublecortin-like kinase play a role in cortical interneuron migration. *The journal of neuroscience*, *27*(14), 3875-3883.
- Futter, M., Diekmann, H., Schoenmakers, E., Sadiq, O., Chatterjee, K., & Rubinsztein, D. (2009). Wild-type but not mutant huntingtin modulates the transcriptional activity of liver X receptors. *Journal of medical genetics*, *46*(7), 438-446.
- Galvan, L., Francelle, L., Gaillard, M., de Longprez, L., Carrillo-de Sauvage, M., Liot, G., . . . Petit, F. (2018). The striatal kinase DCLK3 produces neuroprotection against mutant huntingtin. *Brain*, *141*(5), 1434-1454.
- Galvan, L., Lepejová, N., Gaillard, M., Malgorn, C., Guillemier, M., Houitte, D., . . . de Chaldée, M. (2012). Capucin does not modify the toxicity of a mutant Huntingtin fragment in vivo. *Neurobiology of aging*, *33*(8), 1845.e5-6.
- Gauthier, L., Charrin, B., Borrell-Pagès, M., Dompierre, J., Rangone, H., Cordelières, F., . . . Saudou, F. (2004). Huntingtin controls neurotrophic support and survival of neurons by enhancing BDNF vesicular transport along microtubules. *Cell*, *118*(1), 127-138.
- Genetic Modifiers of Huntington's Disease Consortium. (2015). Identification of Genetic Factors that Modify Clinical Onset of Huntington's Disease. *Cell*, *162*, 516-526.
- Gil, J., & Rego, A. (2009). The R6 lines of transgenic mice: a model for screening new therapies for Huntington's disease. *Brain research reviews*, *59*(2), 410-431.
- Gil, J., Mohapel, P., Araújo, I., Popovic, N., Li, J., Brundin, P., & Petersén, A. (2005). Reduced hippocampal neurogenesis in R6/2 transgenic Huntington's disease mice. *Neurobiology of disease*, *20*(3), 744-751.
- Gipson, T., Neueder, A., Wexler, N., Bates, G., & Housman, D. (2013). Aberrantly spliced HTT, a new player in Huntington's disease pathogenesis. *RNA biology*, *10*(11), 1647-1652.

- Giralt, A., Saavedra, A., Carretón, O., Xifró, X., Alberch, J., & Pérez-Navarro, E. (2011). Increased PKA signaling disrupts recognition memory and spatial memory: role in Huntington's disease. *Human molecular genetics*, *20*(21), 4232-4247.
- Glajch, K., & Sadri-Vakili, G. (2015). Epigenetic Mechanisms Involved in Huntington's Disease Pathogenesis. *Journal of Huntington's disease*, *4*(1), 1-15.
- Gleeson, J., Lin, P., Flanagan, L., & Walsh, C. (1999). Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons. *Neuron*, *23*(2), 257-271.
- Gray, M., Shirasaki, D., Cepeda, C., André, V., Wilburn, B., Lu, X., . . . Yang, X. (2008). Full-length human mutant huntingtin with a stable polyglutamine repeat can elicit progressive and selective neuropathogenesis in BACHD mice. *The journal of neuroscience*, *28*(24), 6182-6195.
- Green, D., & Reed, J. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science*, *281*(5381), 1309-1312.
- Grote, H., Bull, N., Howard, M., van Dellen, A., Blakemore, C., Bartlett, P., & Hannan, A. (2005). Cognitive disorders and neurogenesis deficits in Huntington's disease mice are rescued by fluoxetine. *The European journal of neuroscience*, *22*(8), 2081-2088.
- Gu, M., Gash, M., Mann, V., Javoy-Agid, F., Cooper, J., & Schapira, A. (1996). Mitochondrial defect in Huntington's disease caudate nucleus. *Annals of neurology*, *39*(3), 385-389.
- Gutekunst, C., Li, S., Yi, H., Mulroy, J., Kuemmerle, S., Jones, R., . . . Li, X. (1999). Nuclear and neuropil aggregates in Huntington's disease: relationship to neuropathology. *The journal of neuroscience*, *19*(1), 2522-2534.
- Halder, R., Hennion, M., Vidal, R., Shomroni, O., Rahman, R., Rajput, A., . . . Benito, E. (2016). DNA methylation changes in plasticity genes accompany the formation and maintenance of memory. *Nature neuroscience*, *19*(1), 102-110.
- Hammond, C. M., Strømme, C. B., Huang, H., Patel, D. J., & Groth, A. (2017). Histone chaperone networks shaping chromatin function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *18*(3), 141-158.
- Hantraye, P., Riche, D., Maziere, M., & Isacson, O. (1990). A primate model of Huntington's disease: behavioral and anatomical studies of unilateral excitotoxic lesions of the caudate-putamen in the baboon. *Experimental neurology*, *108*(2), 91-104.
- Hardingham, G., Fukunaga, Y., & Bading, H. (2002). Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nature neuroscience*, *5*(5), 405-414.

- Henley, J., & Wilkinson, K. (2016). Synaptic AMPA receptor composition in development, plasticity and disease. *Nature reviews neuroscience*, *17*, 337-350.
- Hervás-Corpión, I., Guiretti, D., Alcaraz-Iborra, M., Olivares, R., Campos-Caro, A., Barco, Á., & Valor, L. (2018). Early alteration of epigenetic-related transcription in Huntington's disease mouse models. *Scientific reports*, *8*(1).
- Hickey, M., Kosmalska, A., Enayati, J., Cohen, R., Zeitlin, S., Levine, M., & Chesselet, M. (2008). Extensive early motor and non-motor behavioral deficits are followed by striatal neuronal loss in knock-in Huntington's disease mice. *Neuroscience*, *157*(1), 280-295.
- Hinkle, K., Yue, M., Behrouz, B., Dächsel, J., Lincoln, S., Bowles, E., . . . Melrose, H. (2012). LRRK2 knockout mice have an intact dopaminergic system but display alterations in exploratory and motor co-ordination behaviors. *Molecular neurodegeneration*, *7*(25).
- Hodges, A., Hughes, G., Brooks, S., Elliston, L., Holmans, P., Dunnett, S., & Jones, L. (2008). Brain gene expression correlates with changes in behavior in the R6/1 mouse model of Huntington's disease. *Genes, brain, and behavior*, *7*(3), 288-299.
- Hodges, A., Strand, A., Aragaki, A., Kuhn, A., Sengstag, T., Hughes, G., . . . Young, A. (2006). Regional and cellular gene expression changes in human Huntington's disease brain. *Human molecular genetics*, *15*(6), 967-977.
- Hodgson, J., Agopyan, N., Gutekunst, C., Leavitt, B., LePiane, F., Singaraja, R., . . . Hayden, M. (1999). A YAC mouse model for Huntington's disease with full-length mutant huntingtin, cytoplasmic toxicity, and selective striatal neurodegeneration. *Neuron*, *23*(1), 181-192.
- Holbert, S., Dedeoglu, A., Humbert, S., Saudou, F., Ferrante, R., & Néri, C. (2003). Cdc42-interacting protein 4 binds to huntingtin: neuropathologic and biological evidence for a role in Huntington's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(5), 2712-2717.
- Holbert, S., Daghien, I., Kiechle, T., Rosenblatt, A., Wellington, C., Hayden, M., . . . Néri, C. (2001). The Gln-Ala repeat transcriptional activator CA150 interacts with huntingtin: neuropathologic and genetic evidence for a role in Huntington's disease pathogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *98*(4), 1811-1816.
- Hollenbeck, P., & Saxton, W. (2005). The axonal transport of mitochondria. *Journal of cell science*, *118*(Pt 23), 5411-5419.

- Holmans, P. A., Massey, T. H., & Jones, L. (2017). Genetic modifiers of Mendelian disease: Huntington's disease and the trinucleotide repeat disorders. *Human molecular genetics*, *26*(R2), R83-R90.
- Horvath, S., Langfelder, P., Kwak, S., Aaronson, J., Rosinski, J., Vogt, T., . . . Yang, X. (2016). Huntington's disease accelerates epigenetic aging of human brain and disrupts DNA methylation levels. *Aging*, *8*(7), 1485-1512.
- Hughes, A., Mort, M., Elliston, L., Thomas, R., Brooks, S., Dunnett, S., & Jones, L. (2014). Identification of novel alternative splicing events in the huntingtin gene and assessment of the functional consequences using structural protein homology modelling. *Journal of Molecular Biology*, *426*(7), 1428-1438.
- Huntington study group. (1996). Unified Huntington's disease rating scale: reliability and consistency. *Movement disorders*, *11*(2), 136-142.
- Huntington, G. (2003). On chorea. *The journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences*, *15*(1), 109-112.
- Hwang, J., Aromolaran, K., & Zukin, R. (2017). The emerging field of epigenetics in neurodegeneration and neuroprotection. *Nature reviews. Neuroscience*, *18*(6), 347-361.
- Hwang, S., Disatnik, M., & Mochly-Rosen, D. (2015). Impaired GAPDH-induced mitophagy contributes to the pathology of Huntington's disease. *EMBO molecular medicine*, *7*(10), 1307-1326.
- Jacobsen, J., Bawden, C., Rudiger, S., McLaughlan, C., Reid, S., Waldvogel, H., . . . Snell, R. (2010). An ovine transgenic Huntington's disease model. *Human molecular genetics*, *19*(10), 1873-1882.
- Jang, M., Lee, S., & Cho, I. (2018). Adeno-Associated Viral Vector Serotype DJ-Mediated Overexpression of N171-82Q-Mutant Huntingtin in the Striatum of Juvenile Mice Is a New Model for Huntington's Disease. *Frontiers in cellular neuroscience*, *12*(157).
- Jansen, A., van Hal, M., Op den Kelder, I., Meier, R., de Ruiter, A., Schut, M., . . . Reits, E. (2017). Frequency of nuclear mutant huntingtin inclusion formation in neurons and glia is cell-type-specific. *Glia*, *65*(1), 50-61.
- Jenuwein, T., & Allis, C. (2001). Translating the histone code. *Science*, *293*(5532), 1074-1080.
- Jessberger, S., Aigner, S., Clemenson, G. J., Toni, N., Lie, D., Karalay, O., . . . Gage, F. (2008). Cdk5 regulates accurate maturation of newborn granule cells in the adult hippocampus. *PLoS biology*, *6*(11).

- Jones, L., Houlden, H., & Tabrizi, S. (2017). DNA repair in the trinucleotide repeat disorders. *The Lancet. Neurology*, *16*(1), 88-96.
- Kaltenbach, L., Romero, E., Becklin, R., Chettier, R., Bell, R., Phansalkar, A., . . . Olson, J. (2007). Huntingtin interacting proteins are genetic modifiers of neurodegeneration. *PLoS genetics*, *3*(5), e82.
- Kappeler, C., Saillour, Y., Baudoin, J., Tuy, F., Alvarez, C., Houbron, C., . . . Francis, F. (2006). Branching and nucleokinesis defects in migrating interneurons derived from doublecortin knockout mice. *Human molecular genetics*, *15*(9), 1387-1400.
- Kassubek, J., Juengling, F., Ecker, D., & Landwehrmeyer, G. (2005). Thalamic atrophy in Huntington's disease co-varies with cognitive performance: a morphometric MRI analysis. *Cerebral cortex*, *15*(6), 846-853.
- Kegel, K., Kim, M., Sapp, E., McIntyre, C., Castano, J., Aronin, N., & DiFiglia, M. (2000). Huntingtin expression stimulates endosomal-lysosomal activity, endosome tubulation, and autophagy. *The journal of neuroscience*, *20*(19), 7268-7278.
- Kerjan, G., Koizumi, H., Han, E., Dubé, C., Djakovic, S., Patrick, G., . . . Gleeson, J. (2009). Mice lacking doublecortin and doublecortin-like kinase 2 display altered hippocampal neuronal maturation and spontaneous seizures. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(16), 6766-6771.
- Khalil, H., Quinn, L., van Deursen, R., Dawes, H., Playle, R., Rosser, A., & Busse, M. (2013). What effect does a structured home-based exercise programme have on people with Huntington's disease? A randomized, controlled pilot study. *Clinical rehabilitation*, *27*(7), 646-658.
- Kloos, A., Fritz, N., Kostyk, S., Young, G., & Kegelmeier, D. (2013). Video game play (Dance Dance Revolution) as a potential exercise therapy in Huntington's disease: a controlled clinical trial. *Clinical rehabilitation*, *27*(11), 972-982.
- Koizumi, H., Tanaka, T., & Gleeson, J. (2006). Doublecortin-like kinase functions with doublecortin to mediate fiber tract decussation and neuronal migration. *Neuron*, *49*(1), 55-66.
- Korzus, E. (2010). Manipulating the brain with epigenetics. *Nature neuroscience*, *13*(4), 405-406.
- Kuhn, A., Goldstein, D., Hodges, A., Strand, A., Sengstag, T., Kooperberg, C., . . . Ferrante, R. (2007). Mutant huntingtin's effects on striatal gene expression in mice recapitulate changes observed

- in human Huntington's disease brain and do not differ with mutant huntingtin length or wild-type huntingtin dosage. *Human molecular genetics*, 16(15), 1845-1865.
- Labbadia, J., & Morimoto, R. (2013). Huntington's disease: underlying molecular mechanisms and emerging concepts. *Trends in biochemical sciences*, 378-385.
- Labuschagne, I., Jones, R., Callaghan, J., Whitehead, D., Dumas, E., Say, M., . . . Stout, J. (2013). Emotional face recognition deficits and medication effects in pre-manifest through stage-II Huntington's disease. *Psychiatry research*, 207(1-2), 118-126.
- Lai, W. K., & Pugh, B. F. (2017). Understanding nucleosome dynamics and their links to gene expression and DNA replication. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(9), 548-562.
- Langbehn, D., Hayden, M., Paulsen, J., & Group., t. P.-H. (2010). CAG-repeat length and the age of onset in Huntington disease (HD): a review and validation study of statistical approaches. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*, 153B(2), 397-410.
- Langfelder, P., Cattle, J., Chatzopoulou, D., Wang, N., Gao, F., Al-Ramahi, I., . . . Schaab, C. (2016). Integrated genomics and proteomics define huntingtin CAG length-dependent networks in mice. *Nature neurosciences*, 19(4), 623-633.
- Langfelder, P., Gao, F., Wang, N., Howland, D., Kwak, S., Vogt, T., . . . Yang, X. (2018). MicroRNA signatures of endogenous Huntingtin CAG repeat expansion in mice. *PloS one*, 13(1), e0190550.
- Lardenoije, R., Iatrou, A., Kenis, G., Kompotis, K., Steinbusch, H., Mastroeni, D., . . . Rutten, B. (2015). The epigenetics of aging and neurodegeneration. *Progress in neurobiology*, 131, 21-64.
- Lazic, S., Grote, H., Armstrong, R., Blakemore, C., Hannan, A., van Dellen, A., & Barker, R. (2004). Decreased hippocampal cell proliferation in R6/1 Huntington's mice. *Neuroreport*, 15(5), 811-813.
- Lazic, S., Grote, H., Blakemore, C., Hannan, A., van Dellen, A., Phillips, W., & Barker, R. (2006). Neurogenesis in the R6/1 transgenic mouse model of Huntington's disease: effects of environmental enrichment. *The European journal of neuroscience*, 23(7), 1829-1838.
- Le Gras, S., Keime, C., Anthony, A., Lotz, C., De Longprez, L., Brouillet, E., . . . Merienne, K. (2017). Altered enhancer transcription underlies Huntington's disease striatal transcriptional signature. *Scientific reports*, 7(42875).

- Leavitt, B., van Raamsdonk, J., Shehadeh, J., Fernandes, H., Murphy, Z., Graham, R., . . . Hayden, M. (2006). Wild-type huntingtin protects neurons from excitotoxicity. *Journal of neurochemistry*, *96*(4), 1121-1129.
- Lee, A., Ung, H., Sands, L., & Kikis, E. (2017a). A new *Caenorhabditis elegans* model of human huntingtin 513 aggregation and toxicity in body wall muscles. *PloS one*, *12*(3), e0173644.
- Lee, J., Chao, M., Harold, D., Abu Elneel, K., Gillis, T., Holmans, P., . . . Gusella, J. (2017b). A modifier of Huntington's disease onset at the MLH1 locus. *Human molecular genetics*, *26*(19), 3859-3867.
- Lee, J., Gillis, T., Mysore, J., Ramos, E., Myers, R., Hayden, M., . . . Squitieri, F. (2012). Common SNP-based haplotype analysis of the 4p16.3 Huntington disease gene region. *The American Journal of Human Genetics*, *90*, 434-444.
- Lerner, R., Trejo Martinez, L. C., Zhu, C., Chesselet, M., & Hickey, M. (2012). Striatal atrophy and dendritic alterations in a knock-in mouse model of Huntington's disease. *Brain research bulletin*, *87*(6), 571-578.
- Lewerenz, J., & Maher, P. (2015). Chronic Glutamate Toxicity in Neurodegenerative Diseases-What is the Evidence? *Frontiers in neuroscience*, *9*(469).
- Li, J., Popovic, N., & Brundin, P. (2005). The use of the R6 transgenic mouse models of Huntington's disease in attempts to develop novel therapeutic strategies. *NeuroRx*, *2*(3), 447-464.
- Lim, S., Fiez, J., & Holt, L. (2014). How may the basal ganglia contribute to auditory categorization and speech perception? *Frontiers in Neuroscience*, *8*(230).
- Lin, M., & Beal, M. (2006). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*, *443*(7113), 787-795.
- Lin, P., Gleeson, J., Corbo, J., Flanagan, L., & Walsh, C. (2000). DCAMKL1 encodes a protein kinase with homology to doublecortin that regulates microtubule polymerization. *The journal of neuroscience*, *20*(24), 9152-9161.
- Lione, L., Carter, R., Hunt, M., Bates, G., Morton, A., & Dunnett, S. (1999). Selective discrimination learning impairments in mice expressing the human Huntington's disease mutation. *The journal of neuroscience*, *19*(23), 10428-10437.

- Liot, G., Valette, J., Pépin, J., Flament, J., & Brouillet, E. (2017). Energy defects in Huntington's disease: Why "in vivo" evidence matters. *Biochemical and biophysical research communications*, 483(4), 1084-1095.
- Liot, G., Zala, D., Pla, P., Mottet, G., Piel, M., & Saudou, F. (2013). Mutant Huntingtin alters retrograde transport of TrkB receptors in striatal dendrites. *The journal of neuroscience*, 33(15), 6298-6309.
- Liput, D. (2018). Cre-Recombinase Dependent Germline Deletion of a Conditional Allele in the Rgs9cre Mouse Line. *Frontiers in neural circuits*, 12(68).
- Liu, N., Ter Huurne, M., Nguyen, L., Peng, T., Wang, S., Studd, J., . . . Stunnenberg, H. (2017). The non-coding variant rs1800734 enhances DCLK3 expression through long-range interaction and promotes colorectal cancer progression. *Nature communications*, 8, 14418.
- Liu, Y., Deth, R., & Devys, D. (1997). SH3 domain-dependent association of huntingtin with epidermal growth factor receptor signaling complexes. *The journal of biological chemistry*, 272(13), 8121-8124.
- López-Sendón, J., Royuela, A., Trigo, P., Orth, M., Lange, H., Reilmann, R., . . . de Yébenes, J. (2011). What is the impact of education on Huntington's disease? *Movement disorders*, 26(8), 1489-1495.
- LoTurco, J. (2004). Doublecortin and a tale of two serines. *Neuron*, 41(2), 175-177.
- Luthi-Carter, R., Hanson, S., Strand, A., Bergstrom, D., Chun, W., Peters, N., . . . Olson, J. (2002). Dysregulation of gene expression in the R6/2 model of polyglutamine disease: parallel changes in muscle and brain. *Human molecular genetics*, 11(17), 1911-1926.
- Luthi-Carter, R., Strand, A., Peters, N., Solano, S., Hollingsworth, Z., Menon, A., . . . Olson, J. (2000). Decreased expression of striatal signaling genes in a mouse model of Huntington's disease. *Human molecular genetics*, 9(9), 1259-1271.
- Ma, L., Zhao, Y., Chen, Y., Cheng, B., Peng, A., & Huang, K. (2018). *Caenorhabditis elegans* as a model system for target identification and drug screening against neurodegenerative diseases. *European journal of pharmacology*, 819, 169-180.
- Majumder, P., Raychaudhuri, S., Chattopadhyay, B., & Bhattacharyya, N. (2007). Increased caspase-2, calpain activations and decreased mitochondrial complex II activity in cells expressing

- exogenous huntingtin exon 1 containing CAG repeat in the pathogenic range. *Cellular and molecular neurobiology*, 27(8), 1127-1145.
- Mangiarini, L., Sathasivam, K., Seller, M., Cozens, B., Harper, A., Hetherington, C., . . . Bates, G. (1996). Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell*, 87(3), 493-506.
- Mann, V., Cooper, J., Javoy-Agid, F., Agid, Y., Jenner, P., & Schapira, A. (1990). Mitochondrial function and parental sex effect in Huntington's disease. *Lancet*, 336(8717), 749.
- Marques Sousa, C., & Humbert, S. (2013). Huntingtin: here, there, everywhere! *Journal of Huntington's disease*, 2(4), 395-403.
- Marsh, J., Pallos, J., & Thompson, L. (2003). Fly models of Huntington's disease. *Human molecular genetics*, 12(2), R187–R193.
- Martin, D., Heit, R., Yap, M., Davidson, M., Hayden, M., & Berthiaume, L. (2014). Identification of a post-translationally myristoylated autophagy-inducing domain released by caspase cleavage of huntingtin. *Human molecular genetics*, 23(12), 3166-3179.
- Martin, D., Ladha, S., Ehrnhoefer, D., & Hayden, M. (2015). Autophagy in Huntington disease and huntingtin in autophagy. *Trends in neurosciences*, 38(1), 26-35.
- Martinez-Vicente, M., Tallozy, Z., Wong, E., Tang, G., Koga, H., Kaushik, S., . . . Cuervo, A. (2010). Cargo recognition failure is responsible for inefficient autophagy in Huntington's disease. *Nature neuroscience*, 13(5), 567-576.
- Mason, R., & Giorgini, F. (2011). Modeling Huntington disease in yeast: perspectives and future directions. *Prion*, 5(4), 269-276.
- Mayer, M., & Westbrook, G. (1987). Permeation and block of N-methyl-D-aspartic acid receptor channels by divalent cations in mouse cultured central neurones. *The journal of physiology*, 394, 501-527.
- Mazarakis, N., Cybulska-Klosowicz, A., Grote, H., Pang, T., Van Dellen, A., Kossut, M., . . . Hannan, A. (2005). Deficits in experience-dependent cortical plasticity and sensory-discrimination learning in presymptomatic Huntington's disease mice. *The journal of neuroscience*, 25(12), 3059-3066.

- Maze, I., Noh, K.-M., Soshnev, A. A., & Allis, C. D. (2014). Every amino acid matters: essential contributions of histone variants to mammalian development and disease. *Nature reviews genetics*, *15*(4), 259-271.
- McFarland, K., Das, S., Sun, T., Leyfer, D., Xia, E., Sangrey, G., . . . Cha, J. (2012). Genome-wide histone acetylation is altered in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *PLoS one*, *7*(7).
- McGill, J., & Beal, M. (2006). PGC-1alpha, a new therapeutic target in Huntington's disease? *Cell*, *127*(3), 465-468.
- Menalled, L. (2005). Knock-in mouse models of Huntington's disease. *NeuroRx*, *2*(3), 465-470.
- Menalled, L., El-Khodor, B., Patry, M., Suárez-Fariñas, M., Orenstein, S., Zahasky, B., . . . Brunner, D. (2009). Systematic behavioral evaluation of Huntington's disease transgenic and knock-in mouse models. *Neurobiology of disease*, *35*(3), 319-336.
- Menalled, L., Kudwa, A., Miller, S., Fitzpatrick, J., Watson-Johnson, J., Keating, N., . . . Brunner, D. (2012). Comprehensive behavioral and molecular characterization of a new knock-in mouse model of Huntington's disease: zQ175. *PLoS one*, *7*(12), e49838.
- Menalled, L., Sison, J., Dragatsis, I., Zeitlin, S., & Chesselet, M. (2003). Time course of early motor and neuropathological anomalies in a knock-in mouse model of Huntington's disease with 140 CAG repeats. *The journal of comparative neurology*, *465*(1), 11-26.
- Mews, P., Donahue, G., Drake, A., Luczak, V., Abel, T., & Berger, S. (2017). Acetyl-CoA synthetase regulates histone acetylation and hippocampal memory. *Nature*, *546*(7658), 381-386.
- Miller, C., & Sweatt, J. (2007). Covalent modification of DNA regulates memory formation. *Neuron*, *53*(6), 857-869.
- Milnerwood, A., Gladding, C., Pouladi, M., Kaufman, A., Hines, R., Boyd, J., . . . Raymond, L. (2010). Early increase in extrasynaptic NMDA receptor signaling and expression contributes to phenotype onset in Huntington's disease mice. *Neuron*, *65*(2), 178-190.
- Minatohara, K., Akiyoshi, M., & Okuno, H. (2016). Role of Immediate-Early Genes in Synaptic Plasticity and Neuronal Ensembles Underlying the Memory Trace. *Frontiers in molecular neuroscience*, *8*(78).
- Ming, G., & Song, H. (2011). Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron*, *70*(4), 687-702.

- Mo, C., Hannan, A., & Renoir, T. (2015). Environmental factors as modulators of neurodegeneration: insights from gene-environment interactions in Huntington's disease. *Neuroscience and behavioral reviews*, 52, 178-192.
- Molero, A., Arteaga-Bracho, E., Chen, C., Gulinello, M., Winchester, M., Pichamoorthy, N., . . . Mehler, M. (2016). Selective expression of mutant huntingtin during development recapitulates characteristic features of Huntington's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(20), 5736-5741.
- Monaco III, E. (2004). Recent evidence regarding a role for Cdk5 dysregulation in Alzheimer's disease. *Current Alzheimer research*, 1(1), 33-38.
- Montoya, A., Price, B. H., Menear, M., & Lepage, M. (2006). Brain imaging and cognitive dysfunctions in Huntington's disease. *Journal of Psychiatry Neurosciences*, 31(1), 21-29.
- Morton, A., Rudiger, S., Wood, N., Sawiak, S., Brown, G., Mclaughlan, C., . . . Bawden, C. (2014). Early and progressive circadian abnormalities in Huntington's disease sheep are unmasked by social environment. *Human molecular genetics*, 23(13), 3375-3383.
- Moumné, L., Betuing, S., & Caboche, J. (2013). Multiple Aspects of Gene Dysregulation in Huntington's Disease. *Frontiers in neurology*, 4(127).
- Nagamine, T., Nomada, S., Onouchi, T., Kameshita, I., & Sueyoshi, N. (2014). Nuclear translocation of doublecortin-like protein kinase and phosphorylation of a transcription factor JDP2. *Biochemical and biophysical research communications*, 446(1), 73-78.
- Nagamine, T., Shimomura, S., Sueyoshi, N., & Kameshita, I. (2011). Influence of Ser/Pro-rich domain and kinase domain of double cortin-like protein kinase on microtubule-binding activity. *Journal of biochemistry*, 149(5), 619-627.
- Naia, L., Ferreira, I., Cunha-Oliveira, T., Duarte, A., Ribeiro, M., Rosenstock, T., . . . Rego, A. (2015). Activation of IGF-1 and insulin signaling pathways ameliorate mitochondrial function and energy metabolism in Huntington's Disease human lymphoblasts. *Molecular neurobiology*, 51(1), 331-348.
- Naver, B., Stub, C., Møller, M., Fenger, K., Hansen, A., Hasholt, L., & Sørensen, S. (2003). Molecular and behavioral analysis of the R6/1 Huntington's disease transgenic mouse. *Neuroscience*, 122(4), 1049-1057.

- Nawabi, H., Belin, S., Cartoni, R., Williams, P., Wang, C., Latremolière, A., . . . He, Z. (2015). Doublecortin-Like Kinases Promote Neuronal Survival and Induce Growth Cone Reformation via Distinct Mechanisms. *Neuron*, *88*(4), 704-719.
- Neri, C. (2012). Role and Therapeutic Potential of the Pro-Longevity Factor FOXO and Its Regulators in Neurodegenerative Disease. *Frontiers in pharmacology*.
- Neueder, A., & Bates, G. (2018). RNA Related Pathology in Huntington's Disease. *Advances in experimental medicine and biology*, *1049*, 85-101.
- Nithianantharajah, J., Barkus, C., Murphy, M., & Hannan, A. (2008). Gene-environment interactions modulating cognitive function and molecular correlates of synaptic plasticity in Huntington's disease transgenic mice. *Neurobiology of disease*, *29*(3), 490-504.
- Nosten-Bertrand, M., Kappeler, C., Dinocourt, C., Denis, C., Germain, J., Phan Dinh Tuy, F., . . . Francis, F. (2008). Epilepsy in Dcx knockout mice associated with discrete lamination defects and enhanced excitability in the hippocampus. *PloS one*, *3*(6), e2473.
- Nowak, L., Bregestovski, P., Ascher, P., Herbet, A., & Prochiantz, A. (1984). Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature*, *307*(5950), 462-465.
- Nucifora, F. J., Sasaki, M., Peters, M., Huang, H., Cooper, J., Yamada, M., . . . Ross, C. (2001). Interference by huntingtin and atrophin-1 with cbp-mediated transcription leading to cellular toxicity. *Science*, *291*(5512), 2423-2428.
- Ochaba, J., Lukacsovich, T., Csikos, G., Zheng, S., Margulis, J., Salazar, L., . . . Steffan, J. (2014). Potential function for the Huntingtin protein as a scaffold for selective autophagy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(47), 16889-16894.
- Ohmae, S., Takemoto-Kimura, S., Okamura, M., Adachi-Morishima, A., Nonaka, M., Fuse, T., . . . Bito, H. (2006). Molecular identification and characterization of a family of kinases with homology to Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases I/IV. *The journal of biological chemistry*, *281*(29), 20427-20439.
- Orr, A., Li, S., Wang, C., Li, H., Wang, J., Rong, J., . . . Li, X. (2008). N-terminal mutant huntingtin associates with mitochondria and impairs mitochondrial trafficking. *The journal of neuroscience*, *28*(11), 2783-2792.

- Palfi, S., Brouillet, E., Jarraya, B., Bloch, J., Jan, C., Shin, M., . . . Déglon, N. (2007). Expression of mutated huntingtin fragment in the putamen is sufficient to produce abnormal movement in non-human primates. *Molecular therapy*, *15*(8), 1444-1451.
- Pallier, P., Drew, C., & Morton, A. (2009). The detection and measurement of locomotor deficits in a transgenic mouse model of Huntington's disease are task- and protocol-dependent: influence of non-motor factors on locomotor function. *Brain research bulletin*, *78*(6), 347-355.
- Pan, Y., Daito, T., Sasaki, Y., Chung, Y., Xing, X., Pondugula, S., . . . Yano, H. (2016). Inhibition of DNA Methyltransferases Blocks Mutant Huntingtin-Induced Neurotoxicity. *Scientific reports*, *6*(31022).
- Panaretou, B., & Jones, G. (2014). Yeast models for amyloid disease. *Essays in biochemistry*, *56*, 85-97.
- Panov, A., Gutekunst, C., Leavitt, B., Hayden, M., Burke, J., Strittmatter, W., & Greenamyre, J. (2002). Early mitochondrial calcium defects in Huntington's disease are a direct effect of polyglutamines. *Nature neuroscience*, *5*(8), 731-736.
- Paoletti, P., Bellone, C., & Zhou, Q. (2013). NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nature reviews neuroscience*, *14*, 383-400.
- Parsons, M., & Raymond, L. (2014). Extrasynaptic NMDA Receptor Involvement in Central Nervous System Disorders. *Neuron*, *82*(2), 279-293.
- Patel, O., Dai, W., Mentzel, M., Griffin, M., Serindoux, J., Gay, Y., . . . Lucet, I. (2016). Biochemical and Structural Insights into Doublecortin-like Kinase Domain 1. *Structure*, 1550-1561.
- Peng, Q., Wu, B., Jiang, M., Jin, J., Hou, Z., Zheng, J., . . . Duan, W. (2016). Characterization of Behavioral, Neuropathological, Brain Metabolic and Key Molecular Changes in zQ175 Knock-In Mouse Model of Huntington's Disease. *PloS one*, *11*(2), e0148839.
- Petersén, A., Larsen, K., Behr, G. R., Przedborski, S., Brundin, P., & Sulzer, D. (2001). Expanded CAG repeats in exon 1 of the Huntington's disease gene stimulate dopamine-mediated striatal neuron autophagy and degeneration. *Human molecular genetics*, *10*(12), 1243-1254.
- Pinto, R., Dragileva, E., Kirby, A., Lloret, A., Lopez, E., St Claire, J., . . . Cohen, P. (2013). Mismatch Repair Genes Mlh1 and Mlh3 Modify CAG. *Plos Genetics*, *9*(10).
- Pollard, J. (2008). *Hurry up and wait*. Paperbacks.

- Possin, K., Kim, H., Geschwind, M., Moskowitz, T., Johnson, E., Sha, S., . . . Kramer, J. (2017). Egocentric and allocentric visuospatial working memory in premotor Huntington's disease: A double dissociation with caudate and hippocampal volumes. *Neuropsychologia*, *101*, 57-64.
- Pouladi, M., Morton, A., & Hayden, M. (2013). Choosing an animal model for the study of Huntington's disease. *Nature reviews. Neuroscience*, *14*(10), 708-721.
- Pringsheim, T., Wiltshire, K., Day, L., Dykeman, J., Steeves, T., & Jette, N. (2012). The incidence and prevalence of Huntington's disease: a systematic review and meta-analysis. *Movement disorders*, *27*(9), 1083-1090.
- Provencher, S. (1993). Estimation of metabolite concentrations from localized in vivo proton NMR spectra. *Magnetic resonance in medicine*, *30*(6), 672-679.
- Puigserver, P., & Spiegelman, B. (2003). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocrine reviews*, *24*(1), 78-90.
- Qu, J., Nakamura, T., Cao, G., Holland, E., McKercher, S., & Lipton, S. (2011). S-Nitrosylation activates Cdk5 and contributes to synaptic spine loss induced by beta-amyloid peptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(34), 14330-14335.
- Quarrell, O. W., Nance, M. A., Nopoulos, P., Paulsen, J. S., Smith, J. A., & Squitieri, F. (2013). Managing juvenile Huntington's disease. *Neurodegenerative disease management*, *3*(3).
- Quarrell, O. W., Rigby, A. S., Barron, L., Crow, Y., Dalton, A., Dennis, N., . . . M, P. (2007). Reduced penetrance alleles for Huntington's disease: a multi-centre direct observational study. *Journal of medical genetics*, *44*.
- Quintanilla, R., Jin, Y., von Bernhardi, R., & Johnson, G. (2013). Mitochondrial permeability transition pore induces mitochondria injury in Huntington disease. *Molecular neurodegeneration*, *8*(45).
- Ramaswamy, S., McBride, J., & Kordower, J. (2007). Animal models of Huntington's disease. *ILAR journal*, *48*, 356-373.
- Ransome, M., & Hannan, A. (2012). Behavioural state differentially engages septohippocampal cholinergic and GABAergic neurons in R6/1 Huntington's disease mice. *Neurobiology of learning and memory*, *97*(2), 261-270.

- Ravikumar, B., Vacher, C., Berger, Z., Davies, J., Luo, S., Oroz, L., . . . Rubinsztein, D. (2004). Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nature genetics*, *36*(6), 585-595.
- Raymond, L., André, V., Cepeda, C., Gladding, C., Milnerwood, A., & Levine, M. (2011). Pathophysiology of Huntington's disease: time-dependent alterations in synaptic and receptor function. *Neuroscience*, *198*, 252-273.
- Reiner, O., Coquelle, F., Peter, B., Levy, T., Kaplan, A., Sapir, T., . . . Bergmann, S. (2006). The evolving doublecortin (DCX) superfamily. *BMC genomics*, *7*(188).
- Rigamonti, D., Bauer, J., De-Fraja, C., Conti, L., Sipione, S., Sciorati, C., . . . Cattaneo, E. (2000). Wild-type huntingtin protects from apoptosis upstream of caspase-3. *Journal of Neurosciences*, *20*(10), 3705-3713.
- Rigamonti, D., Sipione, S., Goffredo, D., Zuccato, C., Fossale, E., & Cattaneo, E. (2001). Huntingtin's neuroprotective activity occurs via inhibition of procaspase-9 processing. *The journal of biological chemistry*, *276*(18), 14545-14548.
- Rocher, A., Gubellini, P., Merienne, N., Boussicault, L., Petit, F., Gipchtein, P., . . . Bonvento, G. (2016). Synaptic scaling up in medium spiny neurons of aged BACHD mice: A slow-progression model of Huntington's disease. *Neurobiology of disease*, *86*, 131-139.
- Roos, R. A. (2010). Huntington's disease: a clinical review. *Orphanet journal of rare diseases*, *5*(40).
- Rosas, H., Koroshetz, W., Chen, Y., Skeuse, C., Vangel, M., Cudkowicz, M., . . . Goldstein, J. (2003). Evidence for more widespread cerebral pathology in early HD: an MRI-based morphometric analysis. *Neurology*, *60*(10), 1615-1620.
- Rosas, H., Liu, A., Hersch, S., Glessner, M., Ferrante, R., Salat, D., . . . Fischl, B. (2002). Regional and progressive thinning of the cortical ribbon in Huntington's disease. *Neurology*, *58*(5), 695-701.
- Rosas, H., Salat, D., Lee, S., Zaleta, A., Pappu, V., Fischl, B., . . . Hersch, S. (2008). Cerebral cortex and the clinical expression of Huntington's disease: complexity and heterogeneity. *Brain*, *131*(Pt4), 1057-1068.
- Ross, C., & Poirier, M. (2005). Opinion: What is the role of protein aggregation in neurodegeneration? *Nature reviews. Molecular cell biology*, *6*(11), 891-898.

- Ross, C., Aylward, E. H., Wild, E. J., Langbehn, D. R., Long, J. D., Warner, J. H., . . . Wexler, A. (2014). Huntington disease: natural history, biomarkers and prospects for therapeutics. *Nature reviews Neurology*, *10*, 204-216.
- Rossetto, D., Avvakumov, N., & Côté, J. (2012). Histone phosphorylation A chromatin modification involved in diverse nuclear events. *Epigenetics*, *7*(10), 1098-1108.
- Roze, E., Betuing, S., Deyts, C., Marcon, E., Brami-Cherrier, K., Pagès, C., . . . Caboche, J. (2008). Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 deficiency is involved in expanded-huntingtin-induced transcriptional dysregulation and striatal death. *FASEB journal*, *22*(4), 1083-1093.
- Rüb, U., Hoche, F., Brunt, E., Heinsen, H., Seidel, K., Del Turco, D., . . . den Dunnen, W. (2013). Degeneration of the cerebellum in Huntington's disease (HD): possible relevance for the clinical picture and potential gateway to pathological mechanisms of the disease process. *Brain pathology*, *23*(2), 167-177.
- Rubinsztein, D., Leggo, J., Coles, R., Almqvist, E., Biancalana, V., Cassiman, J., . . . Sherr, M. (1996). Phenotypic characterization of individuals with 30-40 CAG repeats in the Huntington disease (HD) gene reveals HD cases with 36 repeats and apparently normal elderly individuals with 36-39 repeats. *The American Society of Human Genetics*, *59*(1), 16-22.
- Ruiz, M., & Déglon, N. (2012). Viral-mediated overexpression of mutant huntingtin to model HD in various species. *Neurobiology of disease*, *48*(2), 202-211.
- Ruzo, A., Ismailoglu, I., Popowski, M., Haremaki, T., Croft, G., Deglincerti, A., & Brivanlou, A. (2015). Discovery of novel isoforms of huntingtin reveals a new hominid-specific exon. *Plos One*, *10*.
- Sapp, E., Schwarz, C., Chase, K., Bhide, P., Young, A., Penney, J., . . . DiFiglia, M. (1997). Huntingtin localization in brains of normal and Huntington's disease patients. *Annals of neurology*, *42*(4), 604-612.
- Sathasivam, K., Neueder, A., Gipson, T., Landles, C., Benjamin, A., Bondulich, M., . . . Bates, G. (2013). Aberrant splicing of HTT generates the pathogenic exon 1 protein in Huntington disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(6), 2366-2370.
- Saudou, F., & Humbert, S. (2016). The Biology of Huntingtin. *Neuron*, *89*, 910-926.
- Sawa, A., Wiegand, G., Cooper, J., Margolis, R., Sharp, A., Lawler, J. J., . . . Ross, C. (1999). Increased apoptosis of Huntington disease lymphoblasts associated with repeat length-dependent mitochondrial depolarization. *Nature medicine*, *5*(10), 1194-1198.

- Schaar, B., Kinoshita, K., & McConnell, S. (2004). Doublecortin microtubule affinity is regulated by a balance of kinase and phosphatase activity at the leading edge of migrating neurons. *Neuron*, *41*(2), 203-213.
- Schilling, G., Becher, M., Sharp, A., Jinnah, H., Duan, K., Kotzok, J., . . . Borchelt, D. (1999). Intranuclear inclusions and neuritic aggregates in transgenic mice expressing a mutant N-terminal fragment of huntingtin. *Human molecular genetics*, *8*(3), 397-407.
- Schratt, G. (2009). microRNAs at the synapse. *Nature reviews. Neuroscience*, *10*(12), 842-849.
- Schuldenzucker, V., Schubert, R., Muratori, L., Freisfeld, F., Rieke, L., Matheis, T., . . . Reilmann, R. (2017). Behavioral testing of minipigs transgenic for the Huntington gene-A three-year observational study. *PloS one*, *12*(10), e0185970.
- Schwab, L., Richetin, K., Barker, R., & Déglon, N. (2017). Formation of hippocampal mHTT aggregates leads to impaired spatial memory, hippocampal activation and adult neurogenesis. *Neurobiology of disease*, *102*, 105-112.
- Senut, M., Suhr, S., Kaspar, B., & Gage, F. (2000). Intraneuronal aggregate formation and cell death after viral expression of expanded polyglutamine tracts in the adult rat brain. *The journal of Neuroscience*, *20*(1), 219-229.
- Seong, I., Woda, J., Song, J., Lloret, A., Abeyrathne, P., Woo, C., . . . MacDonald, M. (2010). Huntingtin facilitates polycomb repressive complex 2. *Human molecular genetics*, *19*(4), 573-583.
- Sepers, M., & Raymond, L. (2014). Mechanisms of synaptic dysfunction and excitotoxicity in Huntington's disease. *Drug discovery today*, *19*(7), 990-996.
- Seredenina, T., & Luthi-Carter, R. (2012). What have we learned from gene expression profiles in Huntington's disease? *Neurobiology of disease*, *45*(1), 83-92.
- Shin, E., Kashiwagi, Y., Kuriu, T., Iwasaki, H., Tanaka, T., Koizumi, H., . . . Okabe, S. (2013). Doublecortin-like kinase enhances dendritic remodelling and negatively regulates synapse maturation. *Nature communications*, *4*, 1440.
- Shin, J., Fang, Z., Yu, Z., Wang, C., Li, S., & Li, X. (2005). Expression of mutant huntingtin in glial cells contributes to neuronal excitotoxicity. *The journal of cell biology*, *171*(6), 1001-1012.

- Shirasaki, D., Greiner, E., Al-Ramahi, I., Gray, M., Boontheung, P., Geschwind, D., . . . Yang, X. (2012). Network organization of the huntingtin proteomic interactome in mammalian brain. *Neuron*, *75*(1), 41-57.
- Shirendeb, U., Reddy, A., Manczak, M., Calkins, M., Mao, P., Tagle, D., & Reddy, P. (2011). Abnormal mitochondrial dynamics, mitochondrial loss and mutant huntingtin oligomers in Huntington's disease: implications for selective neuronal damage. *Human molecular genetics*, *20*(7), 1438-1455.
- Shu, T., Tseng, H., Sapir, T., Stern, P., Zhou, Y., Sanada, K., . . . Tsai, L. (2006). Doublecortin-like kinase controls neurogenesis by regulating mitotic spindles and M phase progression. *Neuron*, *49*(1), 25-39.
- Sieradzan, K., & Mann, D. (2001). The selective vulnerability of nerve cells in Huntington's disease. *Neuropathology and applied neurobiology*, *27*(1), 1-21.
- Simmons, D., Rex, C., Palmer, L., Pandyarajan, V., Fedulov, V., Gall, C., & Lynch, G. (2009). Up-regulating BDNF with an ampakine rescues synaptic plasticity and memory in Huntington's disease knockin mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(12), 4906-4911.
- Simonin, C., Duru, C., Salleron, J., Hincker, P., Charles, P., Delval, A., . . . Buée, L. (2013). Association between caffeine intake and age at onset in Huntington's disease. *Neurobiology of disease*, *58*, 179-182.
- Simpson, J., Gil-Mohapel, J., Pouladi, M., Ghilan, M., Xie, Y., Hayden, M., & Christie, B. (2011). Altered adult hippocampal neurogenesis in the YAC128 transgenic mouse model of Huntington disease. *Neurobiology of disease*, *41*(2), 249-260.
- Slow, E., van Raamsdonk, J., Rogers, D., Coleman, S., Graham, R., Deng, Y., . . . Hayden, M. (2003). Selective striatal neuronal loss in a YAC128 mouse model of Huntington disease. *Human molecular genetics*, *12*(13), 1555-1567.
- Song, W., Chen, J., Petrilli, A., Liot, G., Klinglmayr, E., Zhou, Y., . . . Bossy-Wetzler, E. (2011). Mutant huntingtin binds the mitochondrial fission GTPase dynamin-related protein-1 and increases its enzymatic activity. *Nature medicine*, *17*(3), 377-382.
- Soylu-Kucharz, R., Baldo, B., & Petersén, Å. (2016). Metabolic and behavioral effects of mutant huntingtin deletion in Sim1 neurons in the BACHD mouse model of Huntington's disease. *Scientific reports*, *6*, 28322.

- Spargo, E., Everall, I., & Lantos, P. (1993). Neuronal loss in the hippocampus in Huntington's disease: a comparison with HIV infection. *Journal of neurology, surgery and psychiatry*, *56*(5), 487-491.
- Stack, E., Kubilus, J., Smith, K., Cormier, K., Del Signore, S., Guelin, E., . . . Ferrante, R. (2005). Chronology of behavioral symptoms and neuropathological sequela in R6/2 Huntington's disease transgenic mice. *The journal of comparative neurology*, *490*(4), 354-370.
- Steffan, J., Bodai, L., Pallos, J., Poelman, M., McCampbell, A., Apostol, B., . . . Thompson, L. (2001). Histone deacetylase inhibitors arrest polyglutamine-dependent neurodegeneration in *Drosophila*. *Nature*, *413*(6857), 739-743.
- Steffan, J., Kazantsev, A., Spasic-Boskovic, O., Greenwald, M., Zhu, Y., Gohler, H., . . . Thompson, L. (2000). The Huntington's disease protein interacts with p53 and CREB-binding protein and represses transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *97*(12), 6763-6768.
- Stine, O., Pleasant, N., Franz, M., Abbott, M., Folstein, S., & Ross, C. (1993). Correlation between the onset age of Huntington's disease and length of the trinucleotide repeat in IT-15. *Human molecular genetics*, *2*(10), 1547-1549.
- St-Pierre, J., Drori, S., Uldry, M., Silvaggi, J., Rhee, J., Jäger, S., . . . Spiegelman, B. (2006). Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell*, *127*(2), 397-408.
- Sultan, F., & Day, J. (2011). Epigenetic mechanisms in memory and synaptic function. *Epigenomics*, *3*(2), 157-181.
- Sun, Y., Savanenin, A., Reddy, P., & Liu, Y. (2001). Polyglutamine-expanded huntingtin promotes sensitization of N-methyl-D-aspartate receptors via post-synaptic density 95. *The journal of biological chemistry*, *276*(27), 24713-24718.
- Swami, M., Hendricks, A., Gillis, T., Massood, T., Mysore, J., Myers, R., & Wheeler, V. (2009). Somatic expansion of the Huntington's disease CAG repeat in the brain is associated with an earlier age of disease onset. *Human molecular genetics*, *18*(16), 3039-3047.
- Sweatt, J. (2016). Neural plasticity and behavior - sixty years of conceptual advances. *Journal of neurochemistry*, *130*(Suppl. 2), 179-199.
- Tabrizi, S., Langbehn, D., Leavitt, B., Roos, R., Durr, A., Craufurd, D., . . . Tobin, A. (2009). Biological and clinical manifestations of Huntington's disease in the longitudinal TRACK-HD study: cross-sectional analysis of baseline data. *The lancet neurology*, *8*(9), 791-801.

- Tabrizi, S., Reilmann, R., Roos, R., Durr, A., Leavitt, B., Owen, G., . . . Langbehn, D. (2012). Potential endpoints for clinical trials in premanifest and early Huntington's disease in the TRACK-HD study: analysis of 24 month observational data. *The Lancet. Neurology*, *11*(1), 42-53.
- Tanaka, T., Koizumi, H., & Gleeson, J. (2006). The doublecortin and doublecortin-like kinase 1 genes cooperate in murine hippocampal development. *Cerebral cortex*, *16*(suppl_1), i69-73.
- Tanaka, T., Serneo, F., Tseng, H., Kulkarni, A., Tsai, L., & Gleeson, J. (2004). Cdk5 phosphorylation of doublecortin ser297 regulates its effect on neuronal migration. *Neuron*, *41*(2), 215-227.
- Taylor, K., Holzer, A., Bazan, J., Walsh, C., & Gleeson, J. (2000). Patient mutations in doublecortin define a repeated tubulin-binding domain. *The journal of biological chemistry*, *275*(44), 34442-34450.
- The Huntington's Disease Collaborative Research group. (1993). A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell*, *72*, 971-983.
- Tognini, P., Napoli, D., & Pizzorusso, T. (2015). Dynamic DNA methylation in the brain: a new epigenetic mark for experience-dependent plasticity. *Frontiers in cellular neurosciences*, *9*(331).
- Tourette, C., Li, B., Bell, R., O'Hare, S., Kaltenbach, L., Mooney, S., & Hughes, R. (2014). A large scale Huntingtin protein interaction network implicates Rho GTPase signaling pathways in Huntington disease. *The journal of biological chemistry*, *289*(10), 6709-6726.
- Trottier, Y., Devys, D., Imbert, G., Saudou, F., An, I., Lutz, Y., . . . Mandel, J. (1995a). Cellular localization of the Huntington's disease protein and discrimination of the normal and mutated form. *Nature genetics*, *10*(1), 104-110.
- Trottier, Y., Lutz, Y., Stevanin, G., Imbert, G., Devys, D., Cancel, G., . . . Tora, L. (1995b). Polyglutamine expansion as a pathological epitope in Huntington's disease and four dominant cerebellar ataxias. *Nature*, *378*(6555), 403-406.
- Tsompana, M., & Buck, M. (2014). Chromatin accessibility: a window into the genome. *Epigenetics & chromatin*, *7*(1).
- Van Raamsdonk, J., Pearson, J., Slow, E., Hossain, S., Leavitt, B., & Hayden, M. (2005). Cognitive dysfunction precedes neuropathology and motor abnormalities in the YAC128 mouse model of Huntington's disease. *The journal of neuroscience*, *25*(16), 4169-4180.

- Varjosalo, M., Keskitalo, S., Van Drogen, A., Nurkkala, H., Vichalkovski, A., Aebersold, R., & Gstaiger, M. (2013). The protein interaction landscape of the human CMGC kinase group. *Cell reports*, 3(4), 1306-1320.
- Vashishtha, M., Ng, C., Yildirim, F., Gipson, T., Kratter, I., Bodai, L., . . . Housman, D. (2013). Targeting H3K4 trimethylation in Huntington disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(32), E3027–E3036.
- Vécsei, L., & Beal, M. (1991). Comparative behavioral and neurochemical studies with striatal kainic acid- or quinolinic acid-lesioned rats. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 39(2), 473-478.
- Voermans, N., Petersson, K., Daudey, L., Weber, B., Van Spaendonck, K., Kremer, H., & Fernández, G. (2004). Interaction between the human hippocampus and the caudate nucleus during route recognition. *Neuron*, 43(3), 427-435.
- von Hörsten, S., Schmitt, I., Nguyen, H., Holzmann, C., Schmidt, T., Walther, T., . . . Grasshoff, U. (2003). Transgenic rat model of Huntington's disease. *Human molecular genetics*, 12(6), 617-624.
- Vonsattel, J., Myers, R., Stevens, T., Ferrante, R., Bird, E., & Richardson, E. J. (1985). Neuropathological classification of Huntington's disease. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 44(6), 559-577.
- Vreugdenhil, E., Engels, B., Middelburg, R., van Koningsbruggen, S., Knol, J., Veldhuisen, B., & de Kloet, E. (2001). Multiple transcripts generated by the DCAMKL gene are expressed in the rat hippocampus. *Brain research. Molecular brain research*, 94(1-2), 67-74.
- Walker, F. O. (2007). Huntington's disease. *The Lancet*, 369, 218-228.
- Wang, L., Schuster, G., Hultenby, K., Zhang, Q., Andersson, S., & Gustafsson, J. (2002). Liver X receptors in the central nervous system: from lipid homeostasis to neuronal degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(21), 13878-13883.
- Wang, Y., Faiola, F., Xu, M., Pan, S., & Martinez, E. (2008). Human ATAC Is a GCN5/PCAF-containing acetylase complex with a novel NC2-like histone fold module that interacts with the TATA-binding protein. *The journal of biological chemistry*, 283(49), 33808-33815.
- Wexler, N., Lorimer, J., Porter, J., Gomez, F., Moskowitz, C., Shackell, E., . . . Dlouhy, S. (2004). Venezuelan kindreds reveal that genetic and environmental factors modulate Huntington's disease age of onset. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(10), 3498-3503.

- Weydt, P., Pineda, V., Torrence, A., Libby, R., Satterfield, T., Lazarowski, E., . . . La Spada, A. (2006). Thermoregulatory and metabolic defects in Huntington's disease transgenic mice implicate PGC-1alpha in Huntington's disease neurodegeneration. *Cell metabolism*, 4(5), 349-362.
- White, J., Auerbach, W., Duyao, M., Vonsattel, J., Gusella, J., Joyner, A., & MacDonald, M. (1997). Huntingtin is required for neurogenesis and is not impaired by the Huntington's disease CAG expansion. *Nature genetics*, 14(4), 404-410.
- Wild, E., & Tabrizi, S. (2017). Therapies targeting DNA and RNA in Huntington's disease. *The Lancet Neurology*, 16(10), 837-847.
- Woldemichael, B., & Mansuy, I. (2016). Micro-RNAs in cognition and cognitive disorders: Potential for novel biomarkers and therapeutics. *Biochemical pharmacology*, 104, 1-7.
- Wong, Y., & Holzbaur, E. (2014). The regulation of autophagosome dynamics by huntingtin and HAP1 is disrupted by expression of mutant huntingtin, leading to defective cargo degradation. *The journal of neuroscience*, 34(4), 1293-1305.
- Yan, S., Tu, Z., Liu, Z., Fan, N., Yang, H., Yang, S., . . . Li, X. (2018). A Huntingtin Knockin Pig Model Recapitulates Features of Selective Neurodegeneration in Huntington's Disease. *Cell*, 173(4), 989-1002.e13.
- Yang, S., Cheng, P., Banta, H., Piotrowska-Nitsche, K., Yang, J., Cheng, E., . . . Chan, A. (2008). Towards a transgenic model of Huntington's disease in a non-human primate. *Nature*, 453(7197), 921-924.
- Yu-Taeger, L., Petrasch-Parwez, E., Osmand, A., Redensek, A., Metzger, S., Clemens, L., . . . Nguyen, H. (2012). A novel BACHD transgenic rat exhibits characteristic neuropathological features of Huntington disease. *The journal of neuroscience*, 32(44), 15426-15438.
- Zala, D., Hinckelmann, M., Yu, H., Lyra da Cunha, M., Liot, G., Cordelières, F., . . . Saudou, F. (2013). Vesicular glycolysis provides on-board energy for fast axonal transport. *Cell*, 152(3), 479-491.
- Zhang, H., Zhang, C., Vincent, J., Zala, D., Benstaali, C., Sainlos, M., . . . Choquet, D. (2018). Modulation of AMPA receptor surface diffusion restores hippocampal plasticity and memory in Huntington's disease models. *Nature communications*, 9(1).
- Zhang, Y., Chen, K., Sloan, S., Bennett, M., Scholze, A., O'Keefe, S., . . . Wu, J. (2014). An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex. *The journal of neuroscience*, 34(36), 11929-11947.

- Zheng, S., Clabough, E., Sarkar, S., Futter, M., Rubinsztein, D., & Zeitlin, S. (2010). Deletion of the huntingtin polyglutamine stretch enhances neuronal autophagy and longevity in mice. *PLoS genetics*, *6*(2), e1000838.
- Zuccato, C., & Cattaneo, E. (2007). Role of brain-derived neurotrophic factor in Huntington's disease. *Progress in Neurobiology*, *81*, 294-330.
- Zuccato, C., Belyaev, N., Conforti, P., Ooi, L., Tartari, M., Papadimou, E., . . . Cattaneo, E. (2007). Widespread disruption of repressor element-1 silencing transcription factor/neuron-restrictive silencer factor occupancy at its target genes in Huntington's disease. *The journal of neuroscience*, *27*(26), 6972-6983.
- Zuccato, C., Tartari, M., Crotti, A., Goffredo, D., Valenza, M., Conti, L., . . . Cattaneo, E. (2003). Huntingtin interacts with REST/NRSF to modulate the transcription of NRSE-controlled neuronal genes. *Nature genetics*, *35*(1), 76-83.
- Zuccato, C., Valenza, M., & Cattaneo, E. (2010). Molecular mechanisms and potential therapeutical targets in Huntington's disease. *Physiological reviews*, *90*(3), 905-981.
- Zucker, B., Luthi-Carter, R., Kama, J., Dunah, A., Stern, E., Fox, J., . . . Augood, S. (2005). Transcriptional dysregulation in striatal projection- and interneurons in a mouse model of Huntington's disease: neuronal selectivity and potential neuroprotective role of HAP1. *Human molecular genetics*, *14*(2), 179-189.

ANNEXES

1 Rappel de notions d'épigénétique

Les modifications post-traductionnelles des histones

Les modifications post-traductionnelles (MPT) des histones régulent le degré de compaction des nucléosomes rendant la chromatine plus ou moins accessible à différents facteurs et notamment les facteurs de transcription. Certains résidus de la queue des histones peuvent ainsi subir des acétylations, des méthylations, des phosphorylations et des ubiquitinations à la base du « code des histones ». Selon les MPT, la transcription peut donc être impactée.

Ainsi, l'acétylation des histones est généralement retrouvée au niveau de l'euchromatine, au niveau des résidus lysine dans la région N-terminale des histones. Le groupe acétyle ainsi ajouté supprime la charge positive de la lysine ce qui réduirait par conséquent les interactions électrostatiques existant entre les histones chargées positivement et l'ADN chargé négativement. L'acétylation a donc généralement un effet activateur de la transcription. Cette acétylation est catalysée par des histones acétyle transférases (HAT) alors que la désacétylation est réalisée par les histones désacétylases (HDAC).

La méthylation des histones a lieu sur les résidus lysine et arginine et n'entraîne aucune modification de la charge des histones. Selon le motif de méthylation et le lieu de méthylation (régions régulatrices de la transcription : promoteur, amplificateur appelé « *enhancer* » en anglais), l'effet sur la transcription est différent et la méthylation peut aussi bien avoir un effet activateur que répresseur. Les enzymes impliquées dans ce processus dynamique sont les méthyl transférases et les déméthylases.

La phosphorylation des histones est une MPT qui intervient dans plusieurs processus physiologiques comme la régulation des gènes, dans le processus de réponse aux dommages de l'ADN et notamment aux cassures double-brins de l'ADN mais aussi dans la condensation de la chromatine pendant la mitose et la méiose (pour revue, (Rossetto, Avvakumov, & Côté, 2012)).

La méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN est un mécanisme épigénétique majeur qui régule la structure de la chromatine. Des ADN méthyltransférases sont responsables du transfert d'un groupement méthyl sur le carbone 5 des résidus cytosine se trouvant dans une séquences nucléotidique de type CpG ou CpHpG

(H : A, T ou C). La déméthylation implique une cascade de désamination et d'oxydation. Classiquement, la méthylation de l'ADN intervient dans l'inactivation du chromosome chez les mammifères femelles. Dans le cerveau notamment, le résidu 5-méthyl-cytosine peut être converti en 5-hydroxyméthylcytosine. Cette nouvelle marque épigénétique intéresse de plus en plus les scientifiques notamment dans le contexte de la plasticité cérébrale modifiée par l'expérience (Tognini, Napoli, & Pizzorusso, 2015).

Les variants d'histones

En dehors de la compaction de l'ADN, les histones impactent directement la structure de la chromatine afin de réguler l'accessibilité de l'ADN aux facteurs de transcription. Le remplacement des histones classiques par leurs variants participe à ce processus. Dans le cerveau, ce processus est fondamental. Par exemple, les niveaux des histones classiques H3.1 et H3.2 dans le cerveau des rongeurs diminuent à partir du 150^{ème} jour au cours du développement jusqu'à l'âge adulte au profit du variant H3.3 (pour revue, (Maze, Noh, Soshnev, & Allis, 2014)). De même, l'histone H2A.Z.2., variant de l'histone H2A.Z.2, est enrichie dans le cerveau et serait impliqué dans la médiation des processus de transcription neuronale en réponse à l'activité cellulaire ce qui est fondamental pour maintenir certains aspects du développement synaptique et de la plasticité.

Le remodelage de la chromatine

Des facteurs de remodelage de la chromatine participent à l'organisation dynamique des nucléosomes. En effet, SWI/SNF, ISWI, INO80/SWR1 et NuRD participent à l'organisation des nucléosomes en modulant le taux d'occupation et le positionnement des nucléosomes le long de l'ADN (pour revue, (Lai & Pugh, 2017)). La déplétion locale des nucléosomes permet notamment l'accès des promoteurs de gènes actifs aux facteurs de transcription.

Les chaperonnes des histones

Les chaperonnes sont des éléments importants qui assurent la disponibilité et le devenir des histones. En effet, elles assurent le repliement correct des histones, leur transport dans le noyau, les MPT, l'assemblage correct des nucléosomes (pour revue, (Hammond, Strømme, Huang, Patel, & Groth, 2017)).

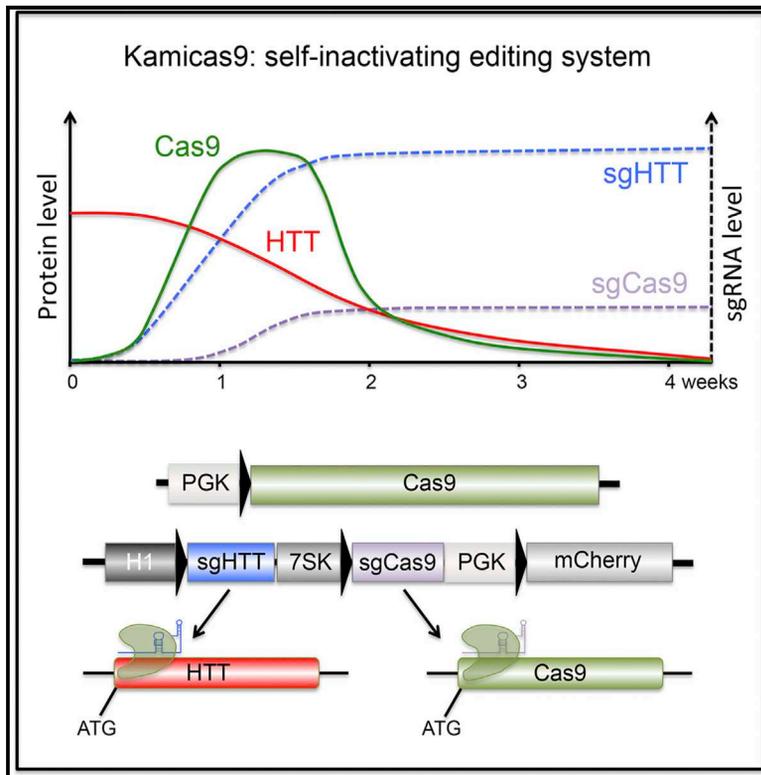
2 Article : The striatal kinase DCLK3 produces neuroprotection against mutant huntingtin

Brain. 2018 May 1;141(5):1434-1454. doi: 10.1093/brain/awy057

3 Article collaboratif n°1 : The Self-Inactivating KamiCas9 System for the Editing of CNS Disease Genes

The Self-Inactivating KamiCas9 System for the Editing of CNS Disease Genes

Graphical Abstract



Authors

Nicolas Merienne, Gabriel Vachey, Lucie de Longprez, ..., Anselme L. Perrier, Renaud du Pasquier, Nicole Déglon

Correspondence

nicole.deglon@chuv.ch

In Brief

Merienne et al. describe the KamiCas9 method, a self-inactivating system for transient genome editing with improved safety. They demonstrate the feasibility and impact in the CNS with the permanent disruption of huntingtin gene in the context of Huntington's disease.

Highlights

- KamiCas9 allows for transient nuclease expression and improved editing safety
- Highly efficient genome editing in neuronal and glial cells of the brain
- Huntington's disease pathological hallmarks improve with huntingtin disruption



The Self-Inactivating KamiCas9 System for the Editing of CNS Disease Genes

Nicolas Merienne,^{1,2,10} Gabriel Vachey,^{1,2,10} Lucie de Longprez,^{3,4} Cécile Meunier,⁵ Virginie Zimmer,^{1,2} Guillaume Perriard,^{6,7} Mathieu Canales,^{6,7} Amandine Mathias,^{6,7} Lucas Herrgott,^{1,2} Tim Beltraminelli,^{1,2} Axelle Maulet,⁸ Thomas Dequesne,^{1,2} Catherine Pythoud,^{1,2} Maria Rey,^{1,2} Luc Pellerin,⁵ Emmanuel Brouillet,^{3,4} Anselme L. Perrier,⁸ Renaud du Pasquier,^{6,7,9} and Nicole Déglon^{1,2,11,*}

¹Department of Clinical Neurosciences, Laboratory of Cellular and Molecular Neurotherapies (LCMN), Lausanne University Hospital, 1011 Lausanne, Switzerland

²Neurosciences Research Center (CRN), LCMN, Lausanne University Hospital, 1011 Lausanne, Switzerland

³CEA, DRF, Institut François Jacob, Molecular Imaging Research Center (MIRCen), F-92265 Fontenay-aux-Roses, France

⁴Neurodegenerative Diseases Laboratory, CNRS, CEA, Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay (UMR9199), F-92265 Fontenay-aux-Roses, France

⁵Department of Physiology, Laboratory of Neuroenergetics, University of Lausanne, 1011 Lausanne, Switzerland

⁶Department of Clinical Neurosciences, Laboratory of Neuro-immunology, Lausanne University Hospital, 1011 Lausanne, Switzerland

⁷Neurosciences Research Center (CRN), Laboratory of Neuro-immunology, Lausanne University Hospital, 1011 Lausanne, Switzerland

⁸Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) UMR861, I-Stem, AFM, 91100 Corbeil-Essonnes, France

⁹Service of Neurology, Department of Clinical Neurosciences, Lausanne University Hospital, 1011 Lausanne, Switzerland

¹⁰These authors contributed equally

¹¹Lead Contact

*Correspondence: nicole.deglon@chuv.ch

<http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2017.08.075>

SUMMARY

Neurodegenerative disorders are a major public health problem because of the high frequency of these diseases. Genome editing with the CRISPR/Cas9 system is making it possible to modify the sequence of genes linked to these disorders. We designed the KamiCas9 self-inactivating editing system to achieve transient expression of the Cas9 protein and high editing efficiency. In the first application, the gene responsible for Huntington's disease (HD) was targeted in adult mouse neuronal and glial cells. Mutant huntingtin (HTT) was efficiently inactivated in mouse models of HD, leading to an improvement in key markers of the disease. Sequencing of potential off-targets with the constitutive Cas9 system in differentiated human iPSC revealed a very low incidence with only one site above background level. This off-target frequency was significantly reduced with the KamiCas9 system. These results demonstrate the potential of the self-inactivating CRISPR/Cas9 editing for applications in the context of neurodegenerative diseases.

INTRODUCTION

Neurodegenerative diseases are a major public health issue and they pose a difficult challenge in medicine. They are the leading cause of age-related chronic diseases, and their prevalence is rapidly increasing with changes in the population, including greater life expectancy (Wu et al., 2016). These diseases result

from monogenic mutations or from a combination of multiple genetic and aged-related risk factors in given environmental conditions, and their underlying pathophysiological mechanisms are complex. Symptoms generally begin in adulthood and the manipulation of genes linked to these disorders in post-mitotic adult cells. It is challenging to improve our understanding of these conditions or to target the causal genes for treatment (Izpisua Belmonte et al., 2015; Yang et al., 2016).

Huntington's disease (HD) is a well-characterized pathology, which could be used as a representative neurodegenerative disorder to improve current therapeutic approaches. HD is caused by a single genetic mutation on exon 1 of the huntingtin (*HTT*) gene, conferring a selective vulnerability of striatal spiny projecting neurons (Bates et al., 2015). Currently, there is no treatment for HD. Considering that the mutation is a toxic gain-of-function, a promising approach would be to decrease the expression level of the mutant *HTT* (Ross and Tabrizi, 2011). This has been already achieved with the use of RNA silencing tools, which demonstrated that a partial mutant *HTT* knockdown is sufficient to induce long-term decreases in mutant *HTT*-positive aggregates, behavioral improvements, and reduction of neuronal dysfunction and death (Boudreau et al., 2009; Cambon et al., 2017; Drouet et al., 2009; Southwell et al., 2012). This approach is currently under evaluation in a phase I/II clinical trial with antisense oligonucleotides (Smith et al., 2016). However, RNA silencing only provides a partial and transient *HTT* suppression, and an approach ensuring a complete and permanent *HTT* disruption would be preferable. This can be achieved with genome-editing technologies, in particular the recently characterized CRISPR/Cas9 system.

The CRISPR/Cas9 system is a powerful new technology in which the Cas9 nuclease is directed to a specific genomic region with a single-guide RNA (sgRNA) (Mali et al., 2013; Shalem et al.,

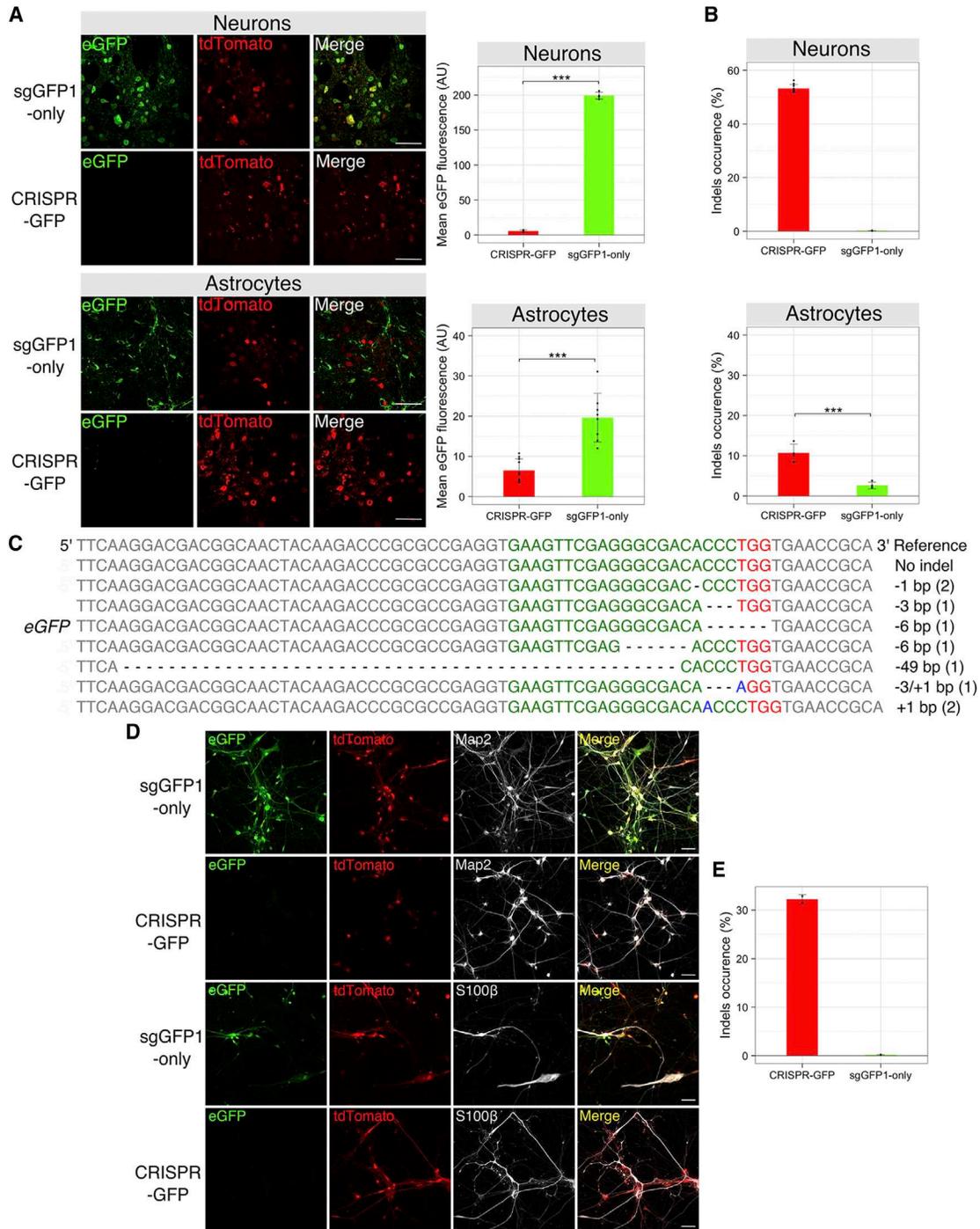


Figure 1. Evaluation of In Vivo Genome Editing in Striatal Neuronal and Glial Cells and in Human Neurons Derived from iPSCs

(A) Confocal acquisitions (left) and mean eGFP fluorescence intensity quantifications (right), 4 weeks post-infection, revealed significantly lower levels of eGFP fluorescence in mouse striatal neurons (up, CRISPR-GFP: n = 4; sgGFP1-only, n = 4) and astrocytes (down, CRISPR-GFP: n = 10; sgGFP1-only, n = 8) infected with CRISPR-GFP than in controls (sgGFP1-only).

(B) Genomic DNA from the injected area was extracted, and the eGFP cassette was amplified by PCR to check for indels. Surveyor analysis showed that eGFP was efficiently edited in both cell types (neurons, CRISPR-GFP: n = 10, sgGFP1-only, n = 8; astrocytes, CRISPR-GFP: n = 4, sgGFP1-only, n = 4).

(C) eGFP PCR products from one CRISPR-GFP sample were inserted into a plasmid for Sanger sequencing. Nine of the eGFP sequences analyzed contained indels.

(legend continued on next page)

2015) to cleave the DNA target sequence. This system has been successfully used to correct mutations in genetic diseases of peripheral organs and to target genes in the brain (Kolli et al., 2017; Long et al., 2016; Monteys et al., 2017; Nelson et al., 2016; Shin et al., 2016, 2017; Swiech et al., 2015; Tabebordbar et al., 2016). One major challenge for CNS applications is the development of a system allowing transient expression of the Cas9 nuclease in order to improve the biosafety and limit off-target events. Here, we developed the KamiCas9 self-inactivating system ensuring transient expression of the Cas9 protein with on-target performance similar to CRISPR/Cas9. We used the non-homologous end-joining (NHEJ) pathway, active in post-mitotic cells, to inactivate the gene implicated in HD and demonstrate high *HTT* editing in neurons derived from HD-induced pluripotent stem cells (iPSCs) and in the striatum of mice. *HTT* inactivation was associated with a drastic reduction of *HTT* aggregate formation and reduced neuronal dysfunctions, confirming the potential of the approach. Finally, sequencing demonstrates low off-target incidence, which is further decreased when KamiCas9 is used to target *HTT*.

RESULTS

We took advantage of the large cloning capacity of lentiviral vectors (LV) and their high transduction efficiencies, safety, and long-term expression in the CNS to optimize the CRISPR/Cas9 system delivery (Cartier et al., 2009; Jarraya et al., 2009; Naldini et al., 1996). We first assessed the system in human embryonic kidney 293T (HEK293T) cells carrying various copies of an artificial mCherry-eGFP target sequence (Figure S1). The sequence of the mCherry reporter gene is followed by a target sequence (sgTARGET) containing a stop codon and finally a GFP reporter gene (Figure S1A). In the control condition, only the mCherry reporter gene was expressed, whereas gene editing by the sgTARGET destroyed the stop codon and rescue GFP expression (Figures S1A and S1F). To characterize the kinetic and potential limiting factors, we generated TARGET-IP HEK293T cell populations with 12, 32, 52, and 91 integrated sequences in their genomes (Figures S1B and S1C) and examined the kinetics of the reaction and importance of Cas9:sgRNA ratio on indels efficiency (Figures S1D and S1E). These experiments revealed that a 1:1 ratio between Cas9:sgRNA is optimal and that the number of target sequences is affecting the kinetics of genome editing, but not the final efficiency, which reached a plateau in all conditions after 10–14 days, as expected from the biology of CRISPR/Cas9 (Figures S1D–S1F).

Based on these initial evaluations, we next assessed the editing efficiency of the enhanced green fluorescent protein (eGFP) gene in mouse primary cultures (Figure S2). Cortical neurons or astrocytes were infected with LV expressing eGFP, Cas9, and tdTomato-sgGFP1, or as negative control with LV-eGFP and LV-tdTomato-sgGFP1 (Figure S2). In the control group, a large

proportion of the cells co-expressed the GFP and tdTomato reporter genes (Figures S2E, S2G, and S2I). In contrast, the mean eGFP fluorescence intensity was reduced in CRISPR-edited cells with a large proportion of tdTomato-positive and GFP-negative cells (Figures S2D, S2F, and S2H). To exclude biases in the experimental conditions, we measured eGFP protein by western blot and showed equivalent expression levels in both groups (data not shown). Quantification of indels in cortical neuron (Figure S2B) and astrocyte cultures (Figure S2C) with the Surveyor assay (Cong et al., 2013) corroborated these results and demonstrated the high efficiency and reproducibility of GFP editing.

High *in vivo* editing is a crucial parameter for the development of CNS editing and to reach therapeutic benefits. We therefore performed a proof-of-principle GFP editing study in striatal cell-types affected in HD (Ross and Tabrizi, 2011). LV-Cas9 and LV-sgRNA were premixed in equal amounts and striatal neurons and astrocytes were transduced with vectors specifically targeting these cells. The neuronal tropism was obtained with VSV-G-pseudotyped LV and a phosphoglycerate kinase promoter driving the expression of the transgene (Dégion et al., 2000). Microscopy observations showed a large number of neurons expressing the mCherry fluorescent protein present in the vector expressing the guide RNA (Figures S3A and S3B). This result confirms the high transduction efficiency of LV in the CNS (100,000–150,000 infected cells in the striatum with a single injection of LV (Colin et al., 2009; de Almeida et al., 2002). For the glial targeting, the GfaABC1D(B)3 promoter derived from the GFAP promoter and a miR124T detargeting sequence were used (Figure S4) (Colin et al., 2009; de Leeuw et al., 2006; Merienne et al., 2013). Mosaic acquisitions and eGFP fluorescence intensity quantifications revealed a strong loss of fluorescence in the neurons (97%) or astrocytes (67%) of the CRISPR-GFP groups (Figure 1A). No alteration of the striatal markers NeuN and DARPP-32 (Bibb et al., 2000; Luthi-Carter et al., 2000; Ouimet et al., 1998; van Dellen et al., 2000) or reporter gene expression was detected, confirming the absence of impact of LVs and Cas9 expression in the brain (Figure S3A). Surveyor analysis on whole striatal tissues from these animals indicated that about 50% of the neurons and 15% of the astrocytes had undergone editing (Figure 1B). The difference between neurons and astrocytes reflects a bias due to the relative number of neuronal and glial cells (>70% neurons; unpublished data) in the striatum (Figure S3D) and additional caveats. In particular, the presence of transduced and non-transduced cells in the striatal punches (Figure S3D) and the fact that if editing frequency is sufficiently high, mutated sequences in homoduplexes are not detected by the Surveyor assay, leading to an underestimation of editing, as previously reported (Nelson et al., 2016). The Sanger sequencing around the target site confirmed this interpretation and indicated that eGFP editing in neurons occurred in 9 out of the 10 clones analyzed (Figure 1C). Finally, we tested the CRISPR/Cas9 system on co-cultured human neurons and glial

(D) Evaluation of eGFP editing in human neurons derived from induced pluripotent stem cells (iPSCs), demonstrating much lower levels of eGFP fluorescence in the CRISPR-GFP group ($n = 3$, $N = 2$) than in controls ($n = 3$, $N = 2$) in MAP2-positive (neurons) and S100 β -positive (astrocytes) cells.

(E) Surveyor analysis on the eGFP sequence confirmed the presence of indels in the CRISPR-GFP group ($n = 2$, $N = 1$). AU: arbitrary units; bp: base pair. The results are presented as mean \pm SD. *** $p < 0.001$. Scale bar, 50 μ m.

See also Figures S3–S5.

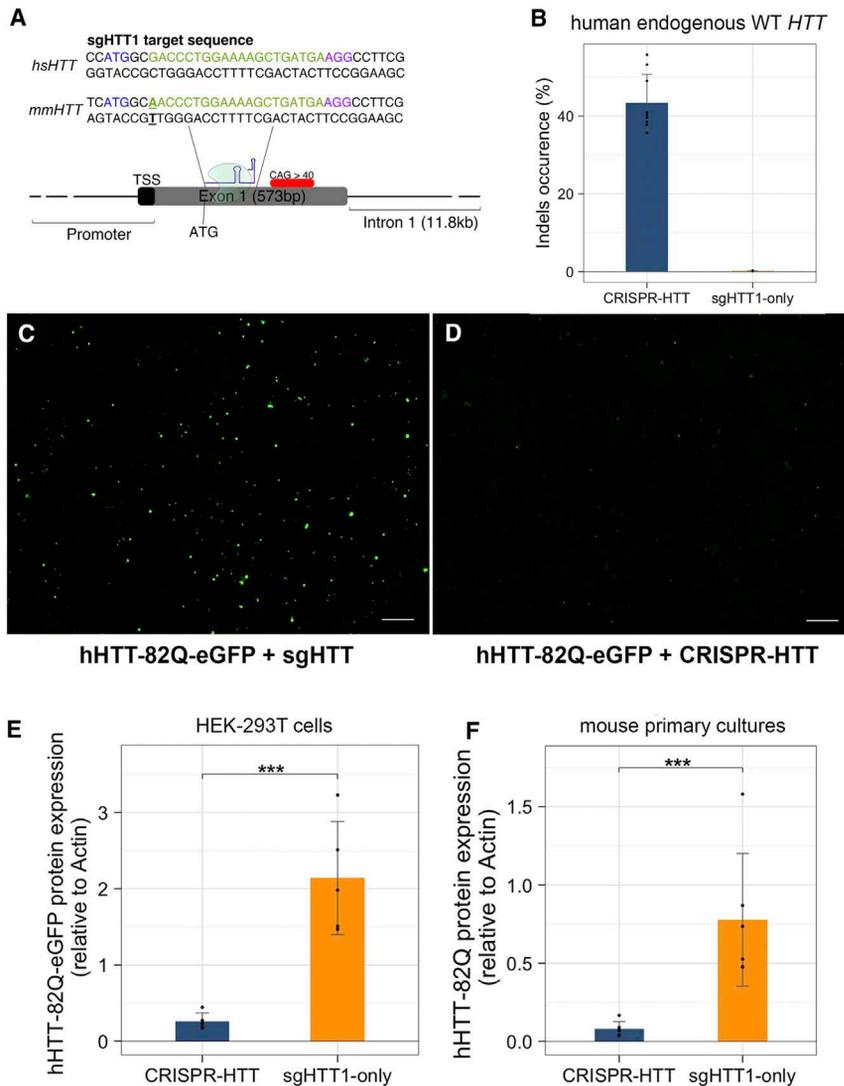


Figure 2. Human *HTT* Editing in HEK293T Cells and Primary Cultures

(A) Schematic representation of the location of the sgHTT1 target site in the human (*hHTT*) and endogenous mouse (*mmHTT*) *HTT* genes. Blue: *HTT* translation start site; green: sgHTT1 binding site; red: PAM, bold-underlined nucleotide represents mismatch between sgHTT1 and the target sequence.

(B) Efficiency of human endogenous *HTT* (*hHTT*) editing in HEK293T cells. HEK293T cells were transfected with plasmids encoding Cas9 and sgHTT1 (CRISPR-HTT, $n = 9$, $N = 2$) or sgHTT1 alone (sgHTT1-only, $n = 7$, $N = 2$). Surveyor assays showed that *hHTT* was efficiently edited in the CRISPR-HTT group 7 days post-transfection.

(C and D) Direct fluorescence acquisitions revealed the presence of a large number of eGFP-positive mutant *HTT* aggregates in the sgHTT1-only group (C) ($n = 3$, $N = 1$), and much lower levels of *HTT* aggregation in the CRISPR-HTT group (D) ($n = 3$, $N = 1$) 7 days post-transfection.

(E) HEK293T cells were transfected with plasmids encoding Cas9, sgHTT1, and a fusion of the first 171 aa of the human *HTT* with 82 CAG and eGFP (hHTT-82Q-eGFP, CRISPR-HTT, $n = 5$, $N = 2$). As negative controls, cells were transfected only with plasmids encoding sgHTT1 and hHTT-82Q-eGFP (sgHTT1-only, $n = 5$, $N = 2$). Western blot with an antibody directed against eGFP, demonstrating the significantly lower levels of hHTT-82Q-eGFP protein in the CRISPR-HTT group than in sgHTT1-only samples, 7 days post-transfection.

(F) Western blots with an antibody recognizing the human *HTT* fragment demonstrated that mutant *HTT* levels were clearly lower in the CRISPR-HTT group than in the sgHTT1-only group, 4 weeks post-infection of primary neuronal cultures. Results are expressed as the mean \pm SD. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Scale bar, 100 μ m.

cells derived from human iPSCs (Figures 1D and 1E). The iPSCs were derived from a healthy subject and characterized as previously described (Figure S5) (Boissart et al., 2013). Briefly, we demonstrated the presence of pluripotent cells in iPSCs as well as the absence of chromosomal abnormalities. The neuronal cells derived from human iPSCs expressed the MAP2 and NeuN markers, and S100 β was detected in immature glial cells and GFAP in astrocytes (Figure S5). Surveyor analysis and confocal acquisitions showed that eGFP had been edited in more than 30% of the cells, resulting in a strong loss of fluorescence in MAP2-positive neurons and S100 β -positive glial cells (Figures 1D and 1E). The LV-CRISPR/Cas9 system therefore targeted genes very efficiently in both mouse and human neuronal or glial cells.

As an application of the CRISPR/Cas9 system to neurodegenerative disorders, we targeted the gene responsible for HD [for review, see Ross and Tabrizi (2011)]. We designed an sgRNA (sgHTT1) targeting a region close to the translation start site of the human *HTT* gene, with the aim of permanently blocking

HTT expression (Figure 2A). Recently, studies demonstrated that non-allele selective *HTT* silencing in the adult brain is associated with improvements in HD pathology without deleterious effects (Boudreau et al., 2009; Drouet et al., 2009) and a phase I clinical trial is currently ongoing (Smith et al., 2016; Southwell et al., 2012). Although knockout studies showed that *HTT* is indispensable for embryonic development (Dragatsis et al., 1998; Saudou and Humbert, 2016; Zeitlin et al., 1995) and early conditional knockout leads to neuropathology (Dragatsis et al., 2000), or knockout on hemizygous background (Die-trich et al., 2017) leads to neuropathology, Wang et al. (2016) recently demonstrated that *HTT* ablation in adult neurons is non-deleterious. Furthermore long-term elimination of *HTT* in the cortex and striatum are well tolerated, supporting the design and evaluation of global *HTT* editing (mutant and wild-type alleles).

Transfection experiments in HEK293T cells showed that this sgRNA efficiently disrupted the endogenous human wild-type *HTT* gene (Figures 2A and 2B). Similarly, the sgHTT1 efficiently edited an exogenous human mutant *HTT* fragment fused to

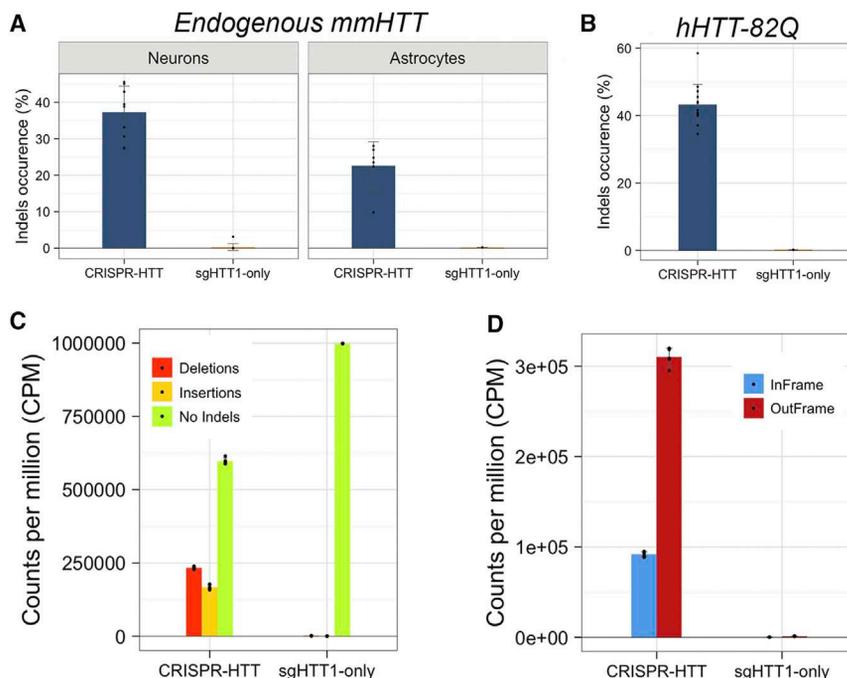


Figure 3. In Vitro *HTT* Editing in Primary Cultures of Mouse Cortical Neurons and Astrocytes

(A) Editing efficiency was evaluated for the endogenous mouse *HTT* (*mmHTT*) in primary cultures of neurons and astrocytes. Surveyor analysis revealed an efficient editing in the CRISPR-HTT group (neurons: $n = 10$, $N = 2$; astrocytes: $n = 6$, $N = 1$) compared to the controls (sgHTT1-only, neurons: $n = 11$, $N = 2$; astrocytes: $n = 3$, $N = 1$). (B) Impact of *hHTT-82Q* editing in primary cultures of cortical neurons. Cortical neuronal cultures were infected with LV encoding Cas9, sgHTT1-mCherry, and *hHTT-82Q* (CRISPR-HTT, $n = 6$, $N = 1$). Cells infected with LV-sgHTT1-mCherry and LV-*hHTT-82Q* only were used as negative controls (sgHTT1-only, $n = 6$, $N = 1$). Surveyor assay demonstrates an efficient *hHTT-82Q* editing in the CRISPR-HTT group. (C and D) The efficiency of *hHTT-82Q* editing in cultured neurons (CRISPR-HTT: $n = 5$; sgHTT1-only: $n = 5$) was evaluated by next-generation sequencing (NGS). Indels were highly frequent around the target site in the CRISPR-HTT group (C), with more than 75% of the indels detected resulting in frameshifts (D). Results are presented as mean \pm SD. *** $p < 0.001$. Scale bar, 100 μ m.

GFP (171 aa with 82 CAG repeats; *hHTT82Q-eGFP*), as indicated by the loss of GFP fluorescence (Figures 2C and 2D) and reduced GFP-HTT protein levels on western blot (Figure 2E). We previously showed that LV-mediated expression of an N-terminal fragment of mutant *HTT* in primary cultures faithfully reproduced gene expression changes seen in human HD, whereas control vectors have a minimal impact on transcriptional signature (Runne et al., 2008). Western blot analysis of samples treated with CRISPR-HTT revealed a drastic reduction of mutant *HTT-82Q* expression in primary cultures (Figure 2F). Surveyor analysis in primary cultures of cortical neurons and astrocytes indicates that endogenous mouse *HTT* gene (Figure 3A) is edited at similar efficiencies as the exogenous human *HTT-82Q* (Figure 3B), confirming the potential of sgHTT1 on diploid cells (Figure 3A). Next-generation sequencing (NGS) (MiSeq) analysis of on-target editing revealed that 40.2% of *HTT* reads contained deletions and insertions (indels) in the CRISPR-HTT group (Figure 3C; Tables S2 and S3), with 77.1% of the indels resulting in frameshifts (Figure 3D), in turn accounting for the lower level of mutant *hHTT-82Q* protein (Figure 2F).

We then used an HD model to assess the therapeutic benefits of disrupting the mutant human *HTT* gene. LV expressing the first 171 aa of the human *HTT* with 82 CAG repeats (*hHTT-82Q*) has been used to model HD in the mouse striatum (de Almeida et al., 2002). It caused a rapid accumulation of misfolded mutant *HTT* and key dysfunctions of striatal neurons related to HD, which were not observed in control groups expressing wild-type *hHTT-18Q* or *eGFP*. A large proportion of NGS reads (64%) containing indels and frameshifts were induced following NHEJ repair in 79.9% of the sequences (Figures 4D and 4E). The majority of reads containing indels displayed +1-bp insertion (>50%) and the remaining reads had mainly deletions, up to 17 bp (most often -1 and -3 bp, Tables S2 and S3). Finally,

we showed that *hHTT-82Q* editing decreased aggregation of the mutant *HTT* protein (~36 aggregates/slice in CRISPR-HTT group versus ~171 aggregates/slice in sgHTT group) (Figures 4A and 4C) and preserved neuronal functions based on DARPP-32 expression; a marker of GABAergic neurons functionality that is decreased in HD (Figure 4B). These data demonstrate that the CRISPR system strongly disrupted the expression of a gene responsible for a disease in the CNS and prevented the appearance of typical HD pathological markers.

Precision and safety are prerequisites for the use of genome-editing tools in the study of brain disorders, and particularly for potential therapeutic applications. Long-term immune or inflammatory responses due to permanent expression of the bacterial Cas9 and off-target cleavage are key parameters of genome editing that must be checked and are mostly context and gene dependent (Dow et al., 2015). Blocking Cas9 expression after *HTT* editing might significantly improve the final outcome of the approach. We therefore designed a self-inactivating system called KamiCas9. For this, an additional sgRNA, expressed under the control of the weak 7SK promoter, targeted the ATG of Cas9 (sgCas9) in order to block its translation (Figure 5A). The co-transfection of HEK293T cells with plasmids encoding *eGFP*, Cas9, and sgGFP1/sgCas9 led to efficient disruption of the Cas9 sequence (Figure S6B) and a decrease in Cas9 protein levels (Figure S6C), with no effect on *eGFP* editing efficiency (Figure S6B). We then evaluated the impact of Cas9 self-inactivation on *HTT* editing in the mouse striatum. Surveyor analysis demonstrated a very efficient disruption of Cas9 gene (Figure 5B) and no difference between the constitutive CRISPR-HTT and KamiCas9-HTT on endogenous wild-type (WT) mouse *HTT* (*mmHTT*) (Figure 5B) and exogenous mutant *hHTT* editing efficiencies (Figure 5B). A second experiment was performed with a Cas9 nuclease containing a V5 tag in order to perform a

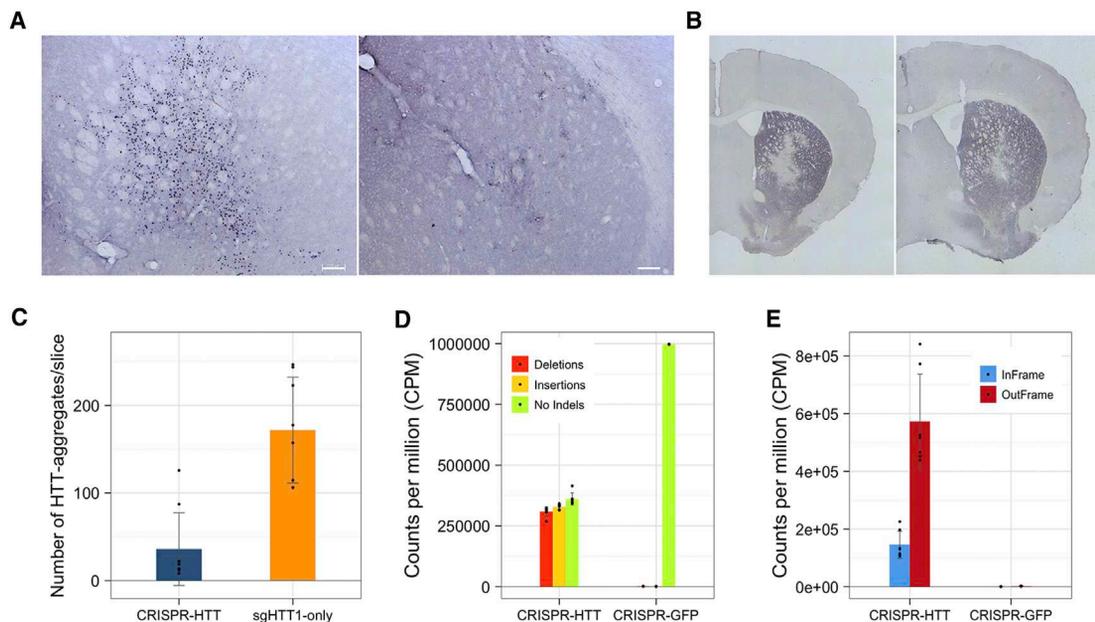


Figure 4. *HTT* Editing In Vivo

(A) Impact of mutant human *HTT* editing (hHTT-82Q) in vivo. LV encoding Cas9, sgHTT1-mCherry, and hHTT-82Q (CRISPR-HTT, $n = 10$) were co-injected in the striatum of WT mice. LV encoding Cas9, tdTomato-sgGFP1, and hHTT-82Q were used for the negative control group (CRISPR-GFP, $n = 4$). EM48 antibody staining revealed the accumulation of misfolded mutant hHTT-82Q in the control group ($n = 8$) and a drastic reduction in the CRISPR-HTT group ($n = 10$).

(B) DARPP-32 immunostaining showing the typical downregulation in the controls ($n = 10$) and a reduction of DARPP-32-negative area in the CRISPR-HTT group ($n = 10$).

(C) Quantification of *HTT* aggregates, showing lower levels of mutant *HTT* accumulation in the CRISPR-HTT group ($n = 10$) than in the negative controls ($n = 8$).

(D and E) The efficiency of hHTT-82Q editing (CRISPR-HTT: $n = 7$; sgHTT1-only: $n = 3$) was evaluated by NGS. Indels were highly frequent around the target site in the CRISPR-HTT group (D), with more than 75% of the indels detected resulting in frameshifts (E). Results are presented as mean \pm SD. *** $p < 0.001$. Scale bar, 100 μ m.

western blot analysis at 2 months (Figure 5C). A drastic reduction (>90%) of Cas9 protein was observed in KamiCas9-HTT-treated animals (Figure 5D). Finally, we tested the KamiCas9 system in 10- to 18-month-old knockin mice (Ki140CAG) (Menalled et al., 2003). Two months post-injection, indel frequencies were analyzed with the tracking of indels by decomposition (TIDE) method, which was developed for easy quantitative assessment of genome editing with sequence trace decomposition (Brinkman et al., 2014). We first validated that indel frequencies were similar with TIDE and MiSeq analysis (Figure 4; Figure S7). In the striatum of Ki140CAG mice, Cas9 editing reached 60.8% (Figure 5E). However, the percentage of indels was much lower for the *mmHTT* (2%–10%). This was associated with a slight reduction of mutant *mmHTT* aggregates (Figure 5F), but with no effect on rotarod motor behavior. The discrepancy between Cas9 and *mmHTT* editing was also observed in WT mice (Figure 5B) and is probably explained by the presence of a mismatch between the sgHTT1 and the mouse *HTT* sequence (Figure 3A), which are affecting in vivo *mmHTT* editing.

We therefore privileged the use of neurons derived from patient-specific iPSCs (HD-iPSCs with 60 CAG repeats) for the final validation and characterization of the KamiCas9-HTT system (Figure 6). To better reveal potential differences between the CRISPR and KamiCas9, we used suboptimal transduction conditions. One to 4 weeks later, DNA, RNA, and proteins were ex-

tracted from these cultures to measure the kinetics of sgRNA synthesis (Figure 6A), Cas9 and WT/mutant *HTT* indel frequencies (Figure 6B), and Cas9-V5 protein levels (Figure 6C). CRISPR-GFP and KamiCas9-GFP were used as controls. Interestingly, the level of synthesis of sgHTT1 was much higher in the CRISPR-HTT/GFP vectors than in KamiCas9-HTT/GFP, probably due to promoter interference (Figure 6A). As expected, the weak 7SK promoter was leading to very low sgCas9 synthesis in the KamiCas9 system (10 times lower than H1-sgHTT1). Despite the low level of sgCas9 in KamiCas9 vectors, Cas9 indels progressively increased over time, from 15% at 1 week to 58% at 4 weeks (Figure 6B). A corresponding reduction of Cas9-V5 protein was measured by western blot (Figure 6C). TIDE analysis of the *HTT* gene editing confirmed that KamiCas9-HTT was as efficient as the constitutive CRISPR-HTT system (Figure 6B). We also showed that human WT and mutant endogenous *HTT* were edited at similar levels (Figure 6B). Four weeks post-infection, we re-challenged HD-iPS neurons with a LV-*HTT171-82Q* and measured residual editing activity 5 days later (Figure 6B). The *hHTT171-82Q* editing efficiency was undetectable in the KamiCas9-HTT group (Figure 6B), demonstrating the functional inactivation of the nuclease with KamiCas9 vectors.

Finally, we analyzed potential off-targets. Bioinformatic analysis identified 22 potential off-target (OT) sites in the human genome for sgHTT1, and 5 sites for sgCas9 (Figure 7A; Tables S4

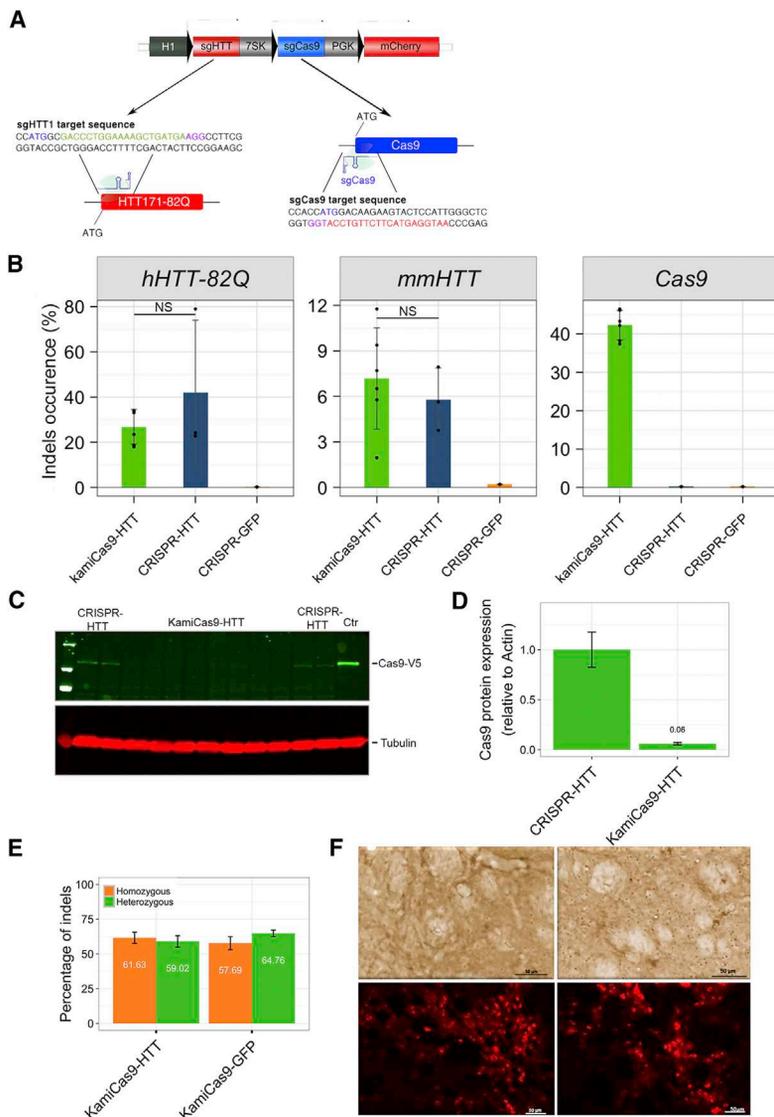


Figure 5. KamiCas9 Evaluation in WT and Ki140CAG Mice

(A) Schematic representation of the sgHTT1 and sgCas9 location in the human *HTT* and *Cas9* genes and corresponding sequences. ATG: translational start sites.

(B) Cas9 was efficiently edited in the mouse brain (KamiCas9-HTT: $n = 6$; CRISPR-HTT, $n = 3$; CRISPR-GFP, $n = 3$) with no effect on the editing efficiency for the endogenous mouse *HTT* (*mmHTT*) or *hHTT-82Q*.

(C) Cas9-V5 protein level in the striatum of C57Bl/5 mice was significantly reduced 2 months post-injection of KamiCas9-HTT compared to CRISPR-HTT-treated mice (KamiCas9-HTT: $n = 8$; CRISPR-HTT, $n = 4$). As positive control, we used a protein extract from HEK293T cells transfected with the plasmid encoding Cas9-V5 nuclease.

(D) Quantitative analysis of the western blot.

(E) Cas9 editing measured by TIDE methods 2 months post-injection in the striatum of 10- to 18-month-old heterozygous and homozygous Ki140CAG mice [heterozygous KamiCas-HTT ($n = 10$), KamiCas9-GFP ($n = 6$); homozygous KamiCas9-HTT ($n = 9$), KamiCas9-GFP ($n = 6$)].

(F) Striatal sections from KamiCas9-GFP and KamiCas9-HTT animals. The impact on HTT aggregates was assessed with the EM48 anti-HTT antibody. Cherry-positive staining showing striatal neurons transduced with LV-KamiCas9-GFP and LV-KamiCas9-HTT. Scale bar, 50 μm .

See also Figure S5.

and S5). All of these sites contain at least two mismatches with the sgRNA (Figure 7B), and a few are located within the exons or introns of known genes (Figure 7C). Deep sequencing (MiSeq; Mapq > 25; mean reads per off-target, 27,500) of neurons derived from WT-iPSCs revealed undetectable off-target gene editing for 20/21 sgHTT (no PCR product for OT5; Figure 7D) and 5/5 sgCas9 sites (Figure 7E) as indicated by the equivalent levels of indels in controls and edited samples. The background levels differ between OT sites probably due to differences in PCR amplification and sequencing fidelity. Importantly, if double-strand breaks (DSBs) occur in 2.2% of the OT1 reads in CRISPR-HTT samples, the inactivation of cas9 (KamiCas9) significantly reduced this frequency (79%; Figure 7D).

In conclusion, these collective results demonstrated the high on-target potency of KamiCas9 system in neuronal and glial cells of the mouse brain and in cultures derived from human HD-iPSCs. In addition, the molecular analyses demonstrated the improved safety profile of KamiCas9, which is essential in the

context of CNS applications and in particular slowly progressive neurodegenerative diseases such as Huntington's disease.

DISCUSSION

We developed a highly efficient editing system for CNS applications. The potency of LV-KamiCas9 was demonstrated in mouse primary neuronal/glia cultures, in the striatum of mice, and in patient-specific iPSC neuronal derivatives. We showed that the kinetics of Cas9 expression shortly followed by self-inactivation provided high on-target editing while progressively inactivating the nuclease, therefore preventing further on- and off-target activities.

Several inducible systems based on chemical, optical, and transcriptional control of Cas9 RNA and protein levels have been described (Davis et al., 2015; Dow et al., 2015; Polstein and Gersbach, 2015; Zetsche et al., 2015). However, these strategies used complex systems or non-mammalian proteins, which might also induce a long-term inflammatory response (Favre et al., 2002). Our method has the advantage of requiring only the expression of an additional sgRNA and is therefore unlikely to have any long-term effects. This lentiviral-mediated in vivo delivery also provides attractive options for spCas9 in vivo genome editing due to its large transgene capacity. Finally, LV-KamiCas9 offers spatial and temporal control of gene editing in the CNS

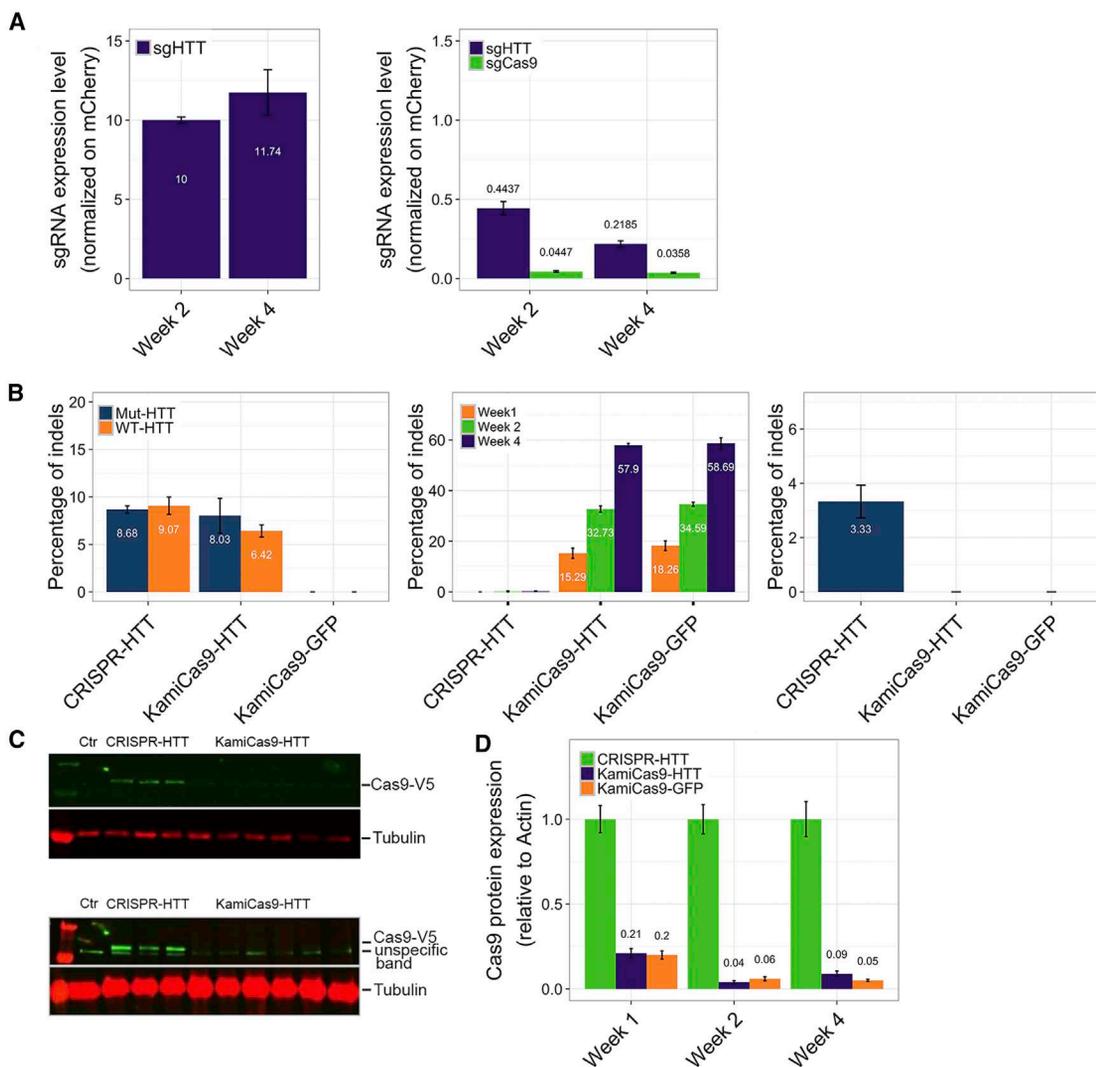


Figure 6. Kinetic of KamiCas9 Editing System in HD-iPSC-Derived Neurons

(A) Neurons derived from HD-iPSCs (60 CAG repeats) were infected with the KamiCas9-HTT and CRISPR-HTT systems. Two to 4 weeks later, the synthesis of the sgHTT1 and sgCas9 under the control of the H1 and 7SK promoters was measured by RT-qPCR. The level of sgHTT1 was higher in the CRISPR-HTT than in the KamiCas9-HTT. Similarly sgCas9 levels were ten times lower than the shHTT1 in the KamiCas9 system.

(B) Sequencing of PCR products corresponding to human WT and mutant HTT revealed similar editing efficiencies. A progressive increase in Cas9 editing was observed over time, reaching 58% at 4 weeks. At 4 weeks, we challenged the system with a LV-Htt171-82Q, and 5 days later we specifically measured the editing of the mutant HTT171-82Q. This demonstrated that Cas9 self-inactivation was sufficient to prevent detectable editing.

(C) Western blot analysis showing the decrease of Cas-V5 protein at 4 weeks in the KamiCas9 samples.

(D) Quantitative analysis of Cas9 western blot at 1, 2, and 4 weeks post-infection.

with opportunities to modulate tropism and cell-type specificities (Colin et al., 2009) as well as to integrate brain circuitry information to reach large brain areas with local intraparenchymal administrations (Hirano et al., 2013).

This KamiCas9 self-inactivating editing system was used to inactivate a prototypical disease gene of the CNS, the *HTT* gene (Kolli et al., 2017; Monteyes et al., 2017; Shin et al., 2016; Yang et al., 2017). These studies demonstrated an efficient disruption of an exogenous/endogenous WT/mutant *HTT* gene associated with a decreased *HTT* aggregation, as well as reduced neuronal dysfunction both in vitro and in vivo. In the pre-

sent study, we applied and characterized *HTT* gene editing in HD-iPSC neuronal derivatives, which closely reproduce molecular and cellular features of HD (An et al., 2014; Ross and Akimov, 2014). Experiments in this model are particularly valuable not only to assess efficacy and safety concerns but also to demonstrate the rescue of mutant *HTT* phenotype following editing. Additional studies are, however, warranted to evaluate the consequence of non-allele selective *HTT* disruption with the CRISPR/Cas9 system. Studies at the cellular level should provide data on mono- and bi-allelic editing frequencies and consequences on cellular WT/mutant *HTT* expression levels. These

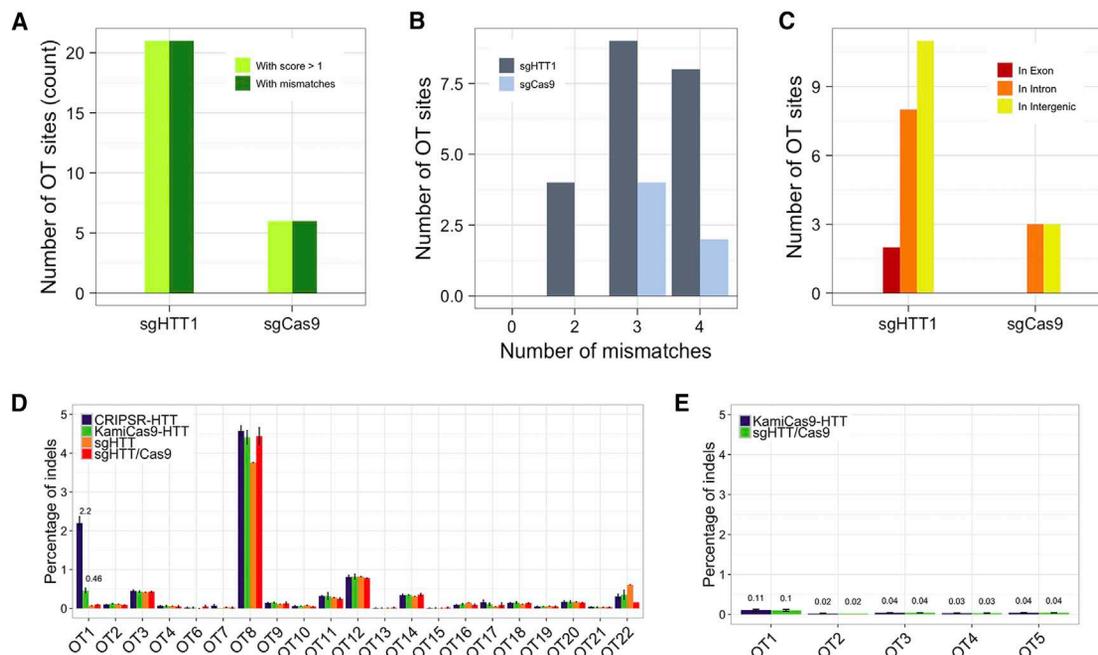


Figure 7. Off-Target Analysis

(A and B) Bioinformatic analysis revealed potential off-target sites for sgHTT1 and sgCas9 (A), with at least two mismatches between the off-target sequence and the sgRNA in each case (B).

(C) A few of these off-target sites were located in known protein-coding genes (exons or introns).

(D) sgHTT off-target analysis by NGS sequencing in neurons derived from WT-iPSCs. Differentiated neurons were infected with KamiCas9-HTT (n = 3), sgHTT/sgCas9 (n = 2), CRISPR-HTT (n = 3), and sgHTT (n = 1). Three weeks post-infection, the DNA was extracted and the PCR products of the potential off-target sites were analyzed by sequencing to determine the percentage of genome editing.

(E) The analysis of sgCas9 off-target sites revealed undetectable cleavage. OT, off-target.

HD-iPSCs will provide an opportunity to decipher the contribution of cell-type-specific *HTT* functions and cellular pathways implicated in HD in complex heterogeneous cultures. The partial knockdown of mutant *HTT* expression by RNA silencing has been shown to be sufficient to slow the progression of neuronal dysfunction and death in various animal models of HD, and a clinical trial based on this approach is currently underway (Smith et al., 2016) (Roche Isis Pharmaceuticals; <https://en.hdbuzz.net/182>). Genome editing has the advantage of being able to block *HTT* expression in a complete and permanent manner. In addition, ATG-independent *HTT* translation (RAN translation) has been observed in HD patients and can induce the accumulation of other expanded species (Bañez-Coronel et al., 2015). Frame-shifts before the CAG expansion can lead to an early STOP codon avoiding the synthesis of the CAG expanded track but can also modify the reading frame to synthesize other expanded sequences. In our study, analysis of sequencing reads demonstrated that the majority of edited *HTT* alleles have either an early STOP codon before the CAG or can induce the synthesis of an expanded alanine-containing *HTT*, which has not been associated with any sign of toxicity with classical CAG length observed in HD. The therapeutic benefits observed in our models support the absence of toxic RAN translation following *HTT* ATG editing.

LV-KamiCas9-HTT is efficiently targeting the *HTT* loci within the genome. However, cleavages at sites with sequences homologies with sgHTT1 and sgCas9 might occur, and the fre-

quency of OT activities is sgRNA sequence dependent. To test whether KamiCas9-HTT exhibits reduced off-target effects in human cells, we performed high-throughput sequencing of all OT sites with two to four predicted mismatches in the reference human genome. The sequencing data showed that sgCas9 did not yield any detectable off-target cleavages, supporting the use of this sgCas9 for all KamiCas9 applications. Twenty of the 21 OT sites were statistically indistinguishable from the background level observed in control conditions, therefore demonstrating a complete absence of off-target events for most sites. In OT1, a low editing activity was detected in CRISPR-HTT samples, but a transient expression of the Cas9 nuclease, with the KamiCas9-HTT, nearly completely abrogated this off-target activity. The use of high-fidelity Cas9 might further improve the biosafety of the system (Kleinstiver et al., 2016; Slaymaker et al., 2016).

These data highlight the considerable potential of this strategy for treating genetic disorders of the brain. The high editing efficiency achieved in this study raises the possibility of using similar experimental strategies for other monogenic brain diseases. In addition, the ability of the CRISPR/Cas9 system to target multiple genes simultaneously makes it a powerful tool for modeling complex sporadic diseases developing at the interface between genetic risk factors and a specific environment. We are confident that this study will pave the way for further improvements of CRISPR/Cas9 technology and its use in the adult brain to decipher the key mechanisms underlying neurodegenerative

diseases and for the development of therapeutic approaches based on gene editing.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Further details and an outline of resources used in this work can be found in [Supplemental Experimental Procedures](#).

Animal Experiments

Male and female 10-week-old (adult) C57BL/6 (Janvier, Le Genest-Saint-Isle, France) and BAC-GLT1-eGFP transgenic mice expressing eGFP specifically in astrocytes (kindly provided by Prof. J. Rothstein, Baltimore, MD) (Regan et al., 2007) were used for in vivo experiments. Pregnant FvB mice were used for primary culture experiments (Janvier, Le Genest-Saint-Isle, France). Mice were housed in a specific pathogen-free (SPF) facility with IVC cages GM500 (Tecniplast) or rat R.BTM.U x /R.ICV.6 cages (Innovive) and Innorack rats, simple face (catalog #RS.5.8.40) containing corn cob bedding with five mice per cage maximum. The animals were maintained in a controlled-temperature room ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) and under a 14-hr light/10-hr dark cycle. Breeding program is dependent of strains or productivity requests but are regularly trio or couple breeders. Enrichments are two pieces of wipes, one cardboard tunnel, one cardboard or polysulfone house with two entrances/exits. Food [global rodent diet XP-18, vitamin-fortified, irradiated at 25 kGy (Kliiba Nafag AG, Kaiseraugst, Switzerland; catalog #3242)] and water were provided ad libitum. All experimental procedures were performed in strict accordance with Swiss regulations concerning the care and use of laboratory animals (veterinary authorizations: 2782, 2888, and 3073). During the surgery, body temperature was controlled with a warming blanket (CMA 450 Temperature Controller; Phymep, Paris, France), and the eyes were protected with 0.2% Viscotears liquid gel (Novartis, Basel, Switzerland). Post-surgery analgesic treatment was administered for 72 hr with paracetamol (Dafalgan Upsa; 1,000 mg/750 mL) in the drinking water.

Ki140CAG Mice

In the present study, we used knockin mice expressing chimeric mouse/human exon 1 containing 140 CAG repeats inserted in the murine *HTT* gene (Ki140CAG). The Ki140CAG mice colony was maintained by breeding heterozygotes Ki140CAG males and females (Menalled et al., 2003). Mice were N3 (B6) on a 129 Sv x C57BL/6J background. The characteristics of the animals in each group are indicated in [Table S1](#). Littermates were used as controls. The environment was enriched with a piece of absorbent paper. Breeder animals also received red mouse houses. The temperature of the housed room was controlled and maintained on a 12-hr light/dark cycle. Food and water were available ad libitum. All animal studies were conducted according to the French regulation (EU Directive 2010/63/EU—French Act Rural Code R 214-87 to 131). The animal facility was approved by veterinarian inspectors (authorization no. A 92-032-02) and complies with Standards for Humane Care and Use of Laboratory Animals of the Office of Laboratory Animal Welfare (OLAW) (no. A5826-01). All procedures received approval from the ethical committee [authorization no. 2015060417243726vl (APAFIS#770)]. Genotype was determined from PCR of tail snips taken at 21 days of age.

In these studies, only animals with technical failures (for example, problems with the injection or surgery) were excluded. Animal sample size was determined based on previous studies using related experimental procedures to allow robust statistical analyzes and reproducibility (Drouet et al., 2009, 2014). No randomization was used to allocate animals to experimental groups. No specific order was used to treat the animals. Each in vivo experiment was replicated ones.

Human iPSCs

Reprogramming, Culture of iPSCs

All experiments on human samples were performed in accordance with the requirements of the Swiss ethics committee (approved protocol 107/13_3). Human iPSCs were derived from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from a healthy subject, based on previous publications (Boissart et al., 2013; Lee et al., 2015). iPSCs were routinely cultured and their quality was checked (morphology, alkaline phosphatase staining, embryonic body differentiation,

staining, and karyotyping), as previously described (Boissart et al., 2013; Lee et al., 2015). The human HD-iPSC line (60 CAG HD line) from Coriell Institute for Medical Research is cultured on L7 (Lonza) matrix in STEMPRO medium (Invitrogen) supplemented with 10 ng/mL recombinant human FGF2. Cells are fed daily and manually passaged every 5–7 days. Human striatal neuronal cultures with HD mutation were produced as previously described (Arber et al., 2015; Nicoleau et al., 2013).

Differentiation, Culture of Human Neurons and Glial Cells

iPSCs from passage 20 were used for neural stem cell (NSC) differentiation, as previously described (Boissart et al., 2013). The NSC medium was changed every 2 days and cells were passaged once per week, as previously described (Boissart et al., 2013). The NSCs were amplified, frozen, and stored in liquid nitrogen until use. NSCs between passages 9 and 12 were used for differentiation into neurons and glial cells. Briefly, the NSC medium was removed and cells were incubated in 500 μL of trypsin (Gibco, Life Technologies, Zug, Switzerland) at 37°C for 3–5 min, to detach them from the plate. Trypsin activity was inhibited by the direct addition of 10% FBS to the plate, and the detached cells were transferred to a Falcon tube containing 4.5 mL of N2B27 medium (N2B27: 1:1 Neurobasal:DMEM-F12-Glutamax, 2% B27, 1% N2, 0.1% gentamicin; Gibco, Life Technologies, Zug, Switzerland). Cells were centrifuged at $300 \times g$ for 5 min at room temperature. The supernatant was removed, and the cells were resuspended in 1 mL of N2B27. NSCs were counted in a hemocytometer. For differentiation into a coculture of neuronal/glial cells, we plated NSCs at a density of 50,000 NSCs/cm² in 500 μL of medium in the wells of a 24-well plate, each well containing a glass coverslip coated with 1/6 poly-ornithine (Sigma-Aldrich, Buchs, Switzerland) for 24 hr and then with 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ laminin (Sigma-Aldrich, Buchs, Switzerland) for 24 hr. The appropriate number of NSCs were thus transferred to a neuronal culture medium consisting of Neurobasal (Gibco, Life Technologies, Zug, Switzerland), 2% B27 (Gibco, Life Technologies, Zug, Switzerland), 1% Glutamax (Gibco, Life Technologies, Zug, Switzerland), 0.1% gentamicin (Gibco, Life Technologies, Zug, Switzerland), 20 ng/mL BDNF (Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach, Germany), 25 ng/mL activin A (R&D Systems Europe, Bio-technie AG, Zug, Switzerland), and 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ laminin (Sigma-Aldrich, Buchs, Switzerland). The medium was completely replaced every 3 days, and cultures were maintained for up to 6 weeks.

Culture of Human HD-NSCs

Human HD-NSCs were maintained as immature and cultured as previously described. The NSC medium, composed of N2B27 medium with 20 ng/mL BDNF (Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach, Germany), 10 ng/mL epidermal growth factor (EGF) (REF), and 10 ng/mL basic fibroblast growth factor (bFGF) (REF), was changed every 2 days. Cells were passaged once per week, at a density of 100,000 NSCs/cm² in 500 μL of medium in the wells of a six-well plate, coated with 1/6 poly-ornithine (Sigma-Aldrich, Buchs, Switzerland) for 24 hr and then with 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ laminin (Sigma-Aldrich, Buchs, Switzerland) for 24 hr.

Statistical Methods

For the statistical analyses, normality of the distribution and equality of the variances were assessed to determine the type of statistical tests. For two-groups comparison, Student's *t* test was performed with Excel software. For comparisons larger than two groups, ANOVA and post hoc analyses were performed with the Statistica software. Predictive bioinformatic analyses to detect potential off-target sites in the human genome were performed with the CRISPRseek package with R software. For all experiments, groups of samples were used for statistical analyzes. Statistical tests were defined as significant if the probability of null hypothesis acceptance was below 5%. No specific method was used for sample randomization, sample size estimation, or inclusion/exclusion of data. Results are presented as the mean \pm SD. **p* < 0.05, ***p* < 0.01, and ****p* < 0.001.

ACCESSION NUMBERS

The accession number for the RNA-seq data reported in this study is NCBI BioProject: PRJNA395854.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes Supplemental Experimental Procedures, seven figures, and five tables and can be found with this article online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2017.08.075>.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

N.D., N.M., G.V., and A.P. conceived the experiments. N.M. and G.V. performed the experiments. L.d.L., E.B., C.M., L.H., T.B., A.P., and T.D. participated in some of the experiments. N.M., G.V., C.M., V.Z., G.P., A. Maulet, and M.C. performed routine cultures of iPSCs and NSCs. N.M., A. Maulet, and C.M. optimized and cultured human neurons. N.M., G.V., and C.M. developed the bioinformatics pipeline and performed the on- and off-target analysis by NGS. M.R., C.P., and A. Mathias provided technical support for cell cultures and viral vector production. N.D., N.M., and G.V. wrote the article. R.d.P. and L.P. provided expertise and feedback. All authors edited the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Dr. Jean-Yves Chatton and the Cellular Imaging Facility (CIF) (University of Lausanne) for valuable advice concerning microscopy. We thank Dr. Keith Harshman and the Lausanne Genomic Technologies Facility (University of Lausanne) for NGS. We thank Dr. S. Zeitlin, Dr. M. Levine, and Dr. S. Humbert for their help in getting the breeders for starting our Ki140CAG mouse colony. We thank Prof. Micah Murray for the language and grammar corrections. This work was supported by grants from the Swiss National Science Foundation (31003A-165834), Association Française contre les Myopathies (AFM-Téléthon), the Agence Nationale pour la Recherche, Neuratriss (Grant Q5 "Investment for the Future"; ANR-11-INBS-0011), Laboratoire d'Excellence Revive (Investissement d'Avenir; ANR-10-LABX-73), the French National Health Institute (INSERM), the Novartis Foundation, and the EU Joint Programme—Neurodegenerative Disease Research (JPND) Project (Grant Agreement No. 643417). This specific part of the project is supported through the following organizations under the aegis of JPND (<http://www.neurodegenerationresearch.eu/>) (France, French National Research Agency [ANR], Switzerland, State Secretariat for Education, Research, and Innovation [SERI], and the Swiss National Science Foundation FN 31ND30-166947/1). N.M. and N.D. are co-inventors on a patent application filed by Lausanne University Hospital and relating to CRISPR (WO 2016/020399 A1, PCT/EP2015/067986). The plasmid containing the GfaABC1D promoter is available under a material transfer agreement (MTA) from Dr. Brenner (Birmingham, AL). L.d.L. is recipient of a PhD fellowship from the Fondation pour la Recherche Médicale.

Received: August 16, 2016

Revised: July 14, 2017

Accepted: August 23, 2017

Published: September 19, 2017

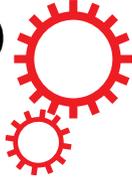
REFERENCES

- An, M.C., O'Brien, R.N., Zhang, N., Patra, B.N., De La Cruz, M., Ray, A., and Ellerby, L.M. (2014). Polyglutamine disease modeling: epitope based screen for homologous recombination using CRISPR/Cas9 system. *PLoS Curr.* 6, ecurents.hd.0242d2e7ad72225efa72f6964589369a.
- Arber, C., Precious, S.V., Cambray, S., Risner-Janiczek, J.R., Kelly, C., Noakes, Z., Fjodorova, M., Heuer, A., Ungless, M.A., Rodriguez, T.A., et al. (2015). Activin A directs striatal projection neuron differentiation of human pluripotent stem cells. *Development* 142, 1375–1386.
- Bañez-Coronel, M., Ayhan, F., Tarabochia, A.D., Zu, T., Perez, B.A., Tusi, S.K., Pletnikova, O., Borchelt, D.R., Ross, C.A., Margolis, R.L., et al. (2015). RAN translation in huntington disease. *Neuron* 88, 667–677.
- Bates, G.P., Dorsey, R., Gusella, J.F., Hayden, M.R., Kay, C., Leavitt, B.R., Nance, M., Ross, C.A., Scahill, R.I., Wetzel, R., et al. (2015). Huntington disease. *Nat. Rev. Dis. Primers* 1, 15005.
- Bibb, J.A., Yan, Z., Svenningsson, P., Snyder, G.L., Pieribone, V.A., Horiuchi, A., Nairn, A.C., Messer, A., and Greengard, P. (2000). Severe deficiencies in dopamine signaling in presymptomatic Huntington's disease mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 6809–6814.
- Boissart, C., Poulet, A., Georges, P., Darville, H., Julita, E., Delorme, R., Bourgeron, T., Peschanski, M., and Benchoua, A. (2013). Differentiation from human pluripotent stem cells of cortical neurons of the superficial layers amenable to psychiatric disease modeling and high-throughput drug screening. *Transl. Psychiatry* 3, e294.
- Boudreau, R.L., McBride, J.L., Martins, I., Shen, S., Xing, Y., Carter, B.J., and Davidson, B.L. (2009). Nonallele-specific silencing of mutant and wild-type huntingtin demonstrates therapeutic efficacy in Huntington's disease mice. *Mol. Ther.* 17, 1053–1063.
- Brinkman, E.K., Chen, T., Amendola, M., and van Steensel, B. (2014). Easy quantitative assessment of genome editing by sequence trace decomposition. *Nucleic Acids Res.* 42, e168.
- Cambon, K., Zimmer, V., Martineau, S., Gaillard, M.C., Jarrige, M., Bugi, A., Miniarikova, J., Rey, M., Hassig, R., Dufour, N., et al. (2017). Preclinical evaluation of a lentiviral vector for Huntingtin silencing. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 5, 259–276.
- Cartier, N., Hacein-Bey-Abina, S., Bartholomae, C.C., Veres, G., Schmidt, M., Kutschera, I., Vidaud, M., Abel, U., Dal-Cortivo, L., Caccavelli, L., et al. (2009). Hematopoietic stem cell gene therapy with a lentiviral vector in X-linked adrenoleukodystrophy. *Science* 326, 818–823.
- Colin, A., Faideau, M., Dufour, N., Auregan, G., Hassig, R., Andrieu, T., Brouillet, E., Hantraye, P., Bonvento, G., and Déglon, N. (2009). Engineered lentiviral vector targeting astrocytes in vivo. *Glia* 57, 667–679.
- Cong, L., Ran, F.A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P.D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L.A., and Zhang, F. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 339, 819–823.
- Davis, K.M., Pattanayak, V., Thompson, D.B., Zuris, J.A., and Liu, D.R. (2015). Small molecule-triggered Cas9 protein with improved genome-editing specificity. *Nat. Chem. Biol.* 11, 316–318.
- de Almeida, L.P., Ross, C.A., Zala, D., Aebischer, P., and Déglon, N. (2002). Lentiviral-mediated delivery of mutant huntingtin in the striatum of rats induces a selective neuropathology modulated by polyglutamine repeat size, huntingtin expression levels, and protein length. *J. Neurosci.* 22, 3473–3483.
- de Leeuw, B., Su, M., ter Horst, M., Iwata, S., Rodijk, M., Hoebe, R.C., Messing, A., Smitt, P.S., and Brenner, M. (2006). Increased glia-specific transgene expression with glial fibrillary acidic protein promoters containing multiple enhancer elements. *J. Neurosci. Res.* 83, 744–753.
- Déglon, N., Tseng, J.L., Bensadoun, J.C., Zurn, A.D., Arsenijevic, Y., Pereira de Almeida, L., Zufferey, R., Trono, D., and Aebischer, P. (2000). Self-inactivating lentiviral vectors with enhanced transgene expression as potential gene transfer system in Parkinson's disease. *Hum. Gene Ther.* 11, 179–190.
- Dietrich, P., Johnson, I.M., Alli, S., and Dragatsis, I. (2017). Elimination of huntingtin in the adult mouse leads to progressive behavioral deficits, bilateral thalamic calcification, and altered brain iron homeostasis. *PLoS Genet.* 13, e1006846.
- Dow, L.E., Fisher, J., O'Rourke, K.P., Muley, A., Kastenhuber, E.R., Livshits, G., Tschaharganeh, D.F., Succi, N.D., and Lowe, S.W. (2015). Inducible in vivo genome editing with CRISPR-Cas9. *Nat. Biotechnol.* 33, 390–394.
- Dragatsis, I., Efstratiadis, A., and Zeitlin, S. (1998). Mouse mutant embryos lacking huntingtin are rescued from lethality by wild-type extraembryonic tissues. *Development* 125, 1529–1539.
- 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.
- Drouet, V., Perrin, V., Hassig, R., Dufour, N., Auregan, G., Alves, S., Bonvento, G., Brouillet, E., Luthi-Carter, R., Hantraye, P., and Déglon, N. (2009). Sustained effects of nonallele-specific Huntingtin silencing. *Ann. Neurol.* 65, 276–285.
- Drouet, V., Ruiz, M., Zala, D., Feyeux, M., Auregan, G., Cambon, K., Troquier, L., Carpentier, J., Aubert, S., Merienne, N., et al. (2014). Allele-specific silencing of mutant huntingtin in rodent brain and human stem cells. *PLoS One* 9, e99341.

- Favre, D., Blouin, V., Provost, N., Spisek, R., Porrot, F., Bohl, D., Marmé, F., Chérel, Y., Salvetti, A., Hurtrel, B., et al. (2002). Lack of an immune response against the tetracycline-dependent transactivator correlates with long-term doxycycline-regulated transgene expression in nonhuman primates after intramuscular injection of recombinant adeno-associated virus. *J. Virol.* *76*, 11605–11611.
- Hirano, M., Kato, S., Kobayashi, K., Okada, T., Yaginuma, H., and Kobayashi, K. (2013). Highly efficient retrograde gene transfer into motor neurons by a lentiviral vector pseudotyped with fusion glycoprotein. *PLoS One* *8*, e75896.
- Izpisua Belmonte, J.C., Callaway, E.M., Caddick, S.J., Churchland, P., Feng, G., Homanics, G.E., Lee, K.F., Leopold, D.A., Miller, C.T., Mitchell, J.F., et al. (2015). Brains, genes, and primates. *Neuron* *86*, 617–631.
- Jarraya, B., Boulet, S., Ralph, G.S., Jan, C., Bonvento, G., Azzouz, M., Miskin, J.E., Shin, M., Delzescaux, T., Drouot, X., et al. (2009). Dopamine gene therapy for Parkinson's disease in a nonhuman primate without associated dyskinesia. *Sci. Transl. Med.* *1*, 2ra4.
- Kleinstiver, B.P., Pattanayak, V., Prew, M.S., Tsai, S.Q., Nguyen, N.T., Zheng, Z., and Joung, J.K. (2016). High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature* *529*, 490–495.
- Kolli, N., Lu, M., Maiti, P., Rossignol, J., and Dunbar, G.L. (2017). CRISPR-Cas9 mediated gene-silencing of the mutant huntingtin gene in an in vitro model of Huntington's disease. *Int. J. Mol. Sci.* *18*, 754.
- Lee, H.K., Morin, P., Wells, J., Hanlon, E.B., and Xia, W. (2015). Induced pluripotent stem cells (iPSCs) derived from frontotemporal dementia patient's peripheral blood mononuclear cells. *Stem Cell Res.* *15*, 325–327.
- Long, C., Amoasii, L., Mireault, A.A., McAnally, J.R., Li, H., Sanchez-Ortiz, E., Bhattacharyya, S., Shelton, J.M., Bassel-Duby, R., and Olson, E.N. (2016). Postnatal genome editing partially restores dystrophin expression in a mouse model of muscular dystrophy. *Science* *351*, 400–403.
- Luthi-Carter, R., Strand, A., Peters, N.L., Solano, S.M., Hollingsworth, Z.R., Menon, A.S., Frey, A.S., Spektor, B.S., Penney, E.B., Schilling, G., et al. (2000). Decreased expression of striatal signaling genes in a mouse model of Huntington's disease. *Hum. Mol. Genet.* *9*, 1259–1271.
- Mali, P., Yang, L., Esvelt, K.M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J.E., Norville, J.E., and Church, G.M. (2013). RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* *339*, 823–826.
- Menalled, L.B., Sison, J.D., Dragatsis, I., Zeitlin, S., and Chesselet, M.F. (2003). Time course of early motor and neuropathological anomalies in a knock-in mouse model of Huntington's disease with 140 CAG repeats. *J. Comp. Neurol.* *465*, 11–26.
- Merienne, N., Le Douce, J., Faivre, E., Déglon, N., and Bonvento, G. (2013). Efficient gene delivery and selective transduction of astrocytes in the mammalian brain using viral vectors. *Front. Cell. Neurosci.* *7*, 106.
- Monteys, A.M., Ebanks, S.A., Keiser, M.S., and Davidson, B.L. (2017). CRISPR/Cas9 editing of the mutant Huntingtin allele in vitro and in vivo. *Mol. Ther.* *25*, 12–23.
- Naldini, L., Blömer, U., Gally, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F.H., Verma, I.M., and Trono, D. (1996). In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* *272*, 263–267.
- Nelson, C.E., Hakim, C.H., Ousterout, D.G., Thakore, P.I., Moreb, E.A., Castellanos Rivera, R.M., Madhavan, S., Pan, X., Ran, F.A., Yan, W.X., et al. (2016). In vivo genome editing improves muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Science* *351*, 403–407.
- Nicoleau, C., Varela, C., Bonnefond, C., Maury, Y., Bugi, A., Aubry, L., Viegas, P., Bourgois-Rocha, F., Peschanski, M., and Perrier, A.L. (2013). Embryonic stem cells neural differentiation qualifies the role of Wnt/beta-Catenin signals in human telencephalic specification and regionalization. *Stem Cells* *31*, 1763–1774.
- Quimet, C.C., Langley-Gullion, K.C., and Greengard, P. (1998). Quantitative immunocytochemistry of DARPP-32-expressing neurons in the rat caudate-putamen. *Brain Res.* *808*, 8–12.
- Polstein, L.R., and Gersbach, C.A. (2015). A light-inducible CRISPR-Cas9 system for control of endogenous gene activation. *Nat. Chem. Biol.* *11*, 198–200.
- Regan, M.R., Huang, Y.H., Kim, Y.S., Dykes-Hoberg, M.I., Jin, L., Watkins, A.M., Bergles, D.E., and Rothstein, J.D. (2007). Variations in promoter activity reveal a differential expression and physiology of glutamate transporters by glia in the developing and mature CNS. *J. Neurosci.* *27*, 6607–6619.
- Ross, C.A., and Akimov, S.S. (2014). Human-induced pluripotent stem cells: potential for neurodegenerative diseases. *Hum. Mol. Genet.* *23* (R1), R17–R26.
- Ross, C.A., and Tabrizi, S.J. (2011). Huntington's disease: from molecular pathogenesis to clinical treatment. *Lancet Neurol.* *10*, 83–98.
- Runne, H., Régulier, E., Kuhn, A., Zala, D., Gokce, O., Perrin, V., Sick, B., Aebischer, P., Déglon, N., and Luthi-Carter, R. (2008). Dysregulation of gene expression in primary neuron models of Huntington's disease shows that polyglutamine-related effects on the striatal transcriptome may not be dependent on brain circuitry. *J. Neurosci.* *28*, 9723–9731.
- Saudou, F., and Humbert, S. (2016). The biology of Huntingtin. *Neuron* *89*, 910–926.
- Shalem, O., Sanjana, N.E., and Zhang, F. (2015). High-throughput functional genomics using CRISPR-Cas9. *Nat. Rev. Genet.* *16*, 299–311.
- Shin, J.W., Kim, K.H., Chao, M.J., Atwal, R.S., Gillis, T., MacDonald, M.E., Gusella, J.F., and Lee, J.M. (2016). Permanent inactivation of Huntington's disease mutation by personalized allele-specific CRISPR/Cas9. *Hum. Mol. Genet.* *25*, 4566–4576.
- Shin, A., Shin, B., Shin, J.W., Kim, K.H., Atwal, R.S., Hope, J.M., Gillis, T., Leszyk, J.D., Shaffer, S.A., Lee, R., et al. (2017). Novel allele-specific quantification methods reveal no effects of adult onset CAG repeats on HTT mRNA and protein levels. *Hum. Mol. Genet.* *26*, 1258–1267.
- Slaymaker, I.M., Gao, L., Zetsche, B., Scott, D.A., Yan, W.X., and Zhang, F. (2016). Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science* *351*, 84–88.
- Smith, A., Zanardi, T., Norris, D., Swayze, E., Baumann, T., Bowyer, K., Hung, G., and Mendoza, J. (2016). Antisense oligonucleotides enter clinical trials. *HD Insights* *13*, 10–15.
- Southwell, A.L., Skotte, N.H., Bennett, C.F., and Hayden, M.R. (2012). Antisense oligonucleotide therapeutics for inherited neurodegenerative diseases. *Trends Mol. Med.* *18*, 634–643.
- Swiech, L., Heidenreich, M., Banerjee, A., Habib, N., Li, Y., Trombetta, J., Sur, M., and Zhang, F. (2015). In vivo interrogation of gene function in the mammalian brain using CRISPR-Cas9. *Nat. Biotechnol.* *33*, 102–106.
- Tabebordbar, M., Zhu, K., Cheng, J.K.W., Chew, W.L., Widrick, J.J., Yan, W.X., Maesner, C., Wu, E.Y., Xiao, R., Ran, F.A., et al. (2016). In vivo gene editing in dystrophic mouse muscle and muscle stem cells. *Science* *351*, 407–411.
- van Dellen, A., Welch, J., Dixon, R.M., Cordery, P., York, D., Styles, P., Blake-more, C., and Hannan, A.J. (2000). N-Acetylaspartate and DARPP-32 levels decrease in the corpus striatum of Huntington's disease mice. *Neuroreport* *11*, 3751–3757.
- Wang, G., Liu, X., Gaertig, M.A., Li, S., and Li, X.J. (2016). Ablation of huntingtin in adult neurons is nondeleterious but its depletion in young mice causes acute pancreatitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *113*, 3359–3364.
- Wu, Y.T., Fratiglioni, L., Matthews, F.E., Lobo, A., Breteler, M.M., Skoog, I., and Brayne, C. (2016). Dementia in western Europe: epidemiological evidence and implications for policy making. *Lancet Neurol.* *15*, 116–124.
- Yang, W., Tu, Z., Sun, Q., and Li, X.J. (2016). CRISPR/Cas9: implications for modeling and therapy of neurodegenerative diseases. *Front. Mol. Neurosci.* *9*, 30.
- Yang, S., Chang, R., Yang, H., Zhao, T., Hong, Y., Kong, H.E., Sun, X., Qin, Z., Jin, P., Li, S., and Li, X.J. (2017). CRISPR/Cas9-mediated gene editing ameliorates neurotoxicity in mouse model of Huntington's disease. *J. Clin. Invest.* *127*, 2719–2724.
- Zeitlin, S., Liu, J.P., Chapman, D.L., Papaioannou, V.E., and Efstratiadis, A. (1995). Increased apoptosis and early embryonic lethality in mice nullizygous for the Huntington's disease gene homologue. *Nat. Genet.* *11*, 155–163.
- Zetsche, B., Volz, S.E., and Zhang, F. (2015). A split-Cas9 architecture for inducible genome editing and transcription modulation. *Nat. Biotechnol.* *33*, 139–142.

4 Article collaboratif n°2 : Altered enhancer transcription underlies Huntington's disease striatal transcriptional signature

SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

Altered enhancer transcription underlies Huntington's disease striatal transcriptional signature

Stéphanie Le Gras^{1,*}, Céline Keime^{1,*}, Anne Anthony^{2,3,*}, Caroline Lotz^{2,3},
Lucie De Longprez^{4,5}, Emmanuel Brouillet^{4,5}, Jean-Christophe Cassel^{2,3},
Anne-Laurence Boutillier^{2,3} & Karine Merienne^{2,3}

Received: 02 August 2016
Accepted: 16 January 2017
Published: 22 February 2017

Epigenetic and transcriptional alterations are both implicated in Huntington's disease (HD), a progressive neurodegenerative disease resulting in degeneration of striatal neurons in the brain. However, how impaired epigenetic regulation leads to transcriptional dysregulation in HD is unclear. Here, we investigated enhancer RNAs (eRNAs), a class of long non-coding RNAs transcribed from active enhancers. We found that eRNAs are expressed from many enhancers of mouse striatum and showed that a subset of those eRNAs are deregulated in HD vs control mouse striatum. Enhancer regions producing eRNAs decreased in HD mouse striatum were associated with genes involved in striatal neuron identity. Consistently, they were enriched in striatal super-enhancers. Moreover, decreased eRNA expression in HD mouse striatum correlated with down-regulation of associated genes. Additionally, a significant number of RNA Polymerase II (RNAPII) binding sites were lost within enhancers associated with decreased eRNAs in HD vs control mouse striatum. Together, this indicates that loss of RNAPII at HD mouse enhancers contributes to reduced transcription of eRNAs, resulting in down-regulation of target genes. Thus, our data support the view that eRNA dysregulation in HD striatum is a key mechanism leading to altered transcription of striatal neuron identity genes, through reduced recruitment of RNAPII at super-enhancers.

Huntington's disease (HD), a progressive neurodegenerative disease affecting primarily medium spiny neurons of the striatum, leads to cognitive, motor and mood impairments. As for several neurodegenerative diseases, including Alzheimer's and Parkinson's diseases, neuronal dysfunction in HD correlates with epigenetic changes, particularly changes in histone modifications^{1–7}. However, the mechanisms underlying epigenetic alterations in HD striatal neurons and their consequences on HD pathogenesis remain unclear.

Transcriptional dysregulation in HD is tissue-dependent and most extensive in the striatum^{8–10}. Specifically, HD striatum displays a “neuronal” transcriptional signature^{1,11}, characterized by down-regulation of many genes implicated in biological processes linked to neuronal activity, such as neuronal transmission and excitability, synaptic plasticity and learning^{2,4,11}. Noticeably, down-regulated genes in HD striatum are enriched in striatal markers, *i.e.* genes essential to the function and identity of striatal neurons^{2,10,12,13}. Typically, these genes, which are highly expressed in the striatum, comprise neuronal receptors, ion channels and signaling factors (*e.g.* DRD1, DRD2, KCNJ4, RGS9, DARPP32) required for proper regulation of striatal neuron activity. It is considered that transcriptional down-regulation underlies dysfunction of striatal neurons, preceding neuronal death, and may thus be a key mechanism of HD striatal pathogenesis^{1,8,14}.

Using genome-wide scale approaches, we previously showed that the enhancer mark H3K27 acetylation (H3K27ac) was selectively decreased at super-enhancers, a category of broad enhancers regulating cell

¹GenomeEast Platform, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), CNRS/INSERM/University of Strasbourg—UMR 7104, 1 rue Laurent Fries, 67404 Illkirch, France. ²University of Strasbourg, Laboratory of Cognitive and Adaptive Neurosciences (LNCA), 12 rue Goethe, 67000 Strasbourg, France. ³CNRS, LNCA UMR 7364, 12 rue Goethe, 67000 Strasbourg, France. ⁴Commissariat à l'Énergie Atomique (CEA), Département de Recherches Fondamentales (DRF), Institut d'Imagerie Biomédicale (I2BM), Molecular Imaging Research Center (MIRCen), F-92260 Fontenay-aux-Roses, France. ⁵Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, UMR 9199, Neurodegenerative Diseases Laboratory, F-92260 Fontenay-aux-Roses, France. *These authors contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to K.M. (email: karine.merienne@unistra.fr)

type-specific identity genes, and this event correlated with decreased expression of super-enhancer target genes². This suggests that altered super-enhancer activity contributes to repression of neuronal genes in HD mouse striatum and to the establishment of HD “neuronal” transcriptional signature.

Regulation of enhancer activity involves enhancer transcription, *i.e.* transcription of long non-coding RNAs, called enhancer RNAs (eRNAs)^{15,16}. eRNAs, which are transcribed from active, tissue-specific enhancers, are generally positively correlated with transcription of their target genes^{15–19}. Recent studies provide evidence for a causative role for eRNAs in regulating target genes transcription¹⁸. Specifically, eRNAs precede and activate transcription of target genes, influencing chromatin looping between enhancer and promoter, and modulating RNA polymerase II (RNAPII) dynamics^{18,20,21}.

Here we show that dysregulation of enhancer transcription is extensive in HD mouse striatum. Our data further indicate that eRNA dysregulation in HD mouse striatum results from altered recruitment of RNAPII at super-enhancers and underlies down-regulation of striatal marker genes. Thus, we provide new insights into the epigenetic mechanism underlying repression of striatum-specific identity genes.

Results

Differential expression of eRNAs in the striatum of HD R6/1 mice. To explore the hypothesis that alteration of eRNA transcription might be a component of HD pathogenesis, we assessed eRNAs at genome-wide scale, analyzing non-coding RNAs from RNA sequencing (RNAseq) data previously generated in the striatum of control and HD R6/1 transgenic mice². A strand-specific total RNA sequencing protocol was used to generate sequencing reads, thereby allowing analysis of long non-coding RNAs (see Methods). To identify eRNAs, *i.e.* non-coding RNAs synthesized from enhancers, we first excluded signals within genic regions, defined as the interval starting 3 kb upstream of the transcription start site and ending 10 kb downstream of the transcription termination site, since they might result from polymerase read-through of genic transcripts (ref. 19 and Methods). Second, we filtered RNA signals resulting from enhancer regions using H3K27ac ChIP-seq data, generated from the striatum of control (WT) and HD R6/1 mice². As a result, a total of 6068 eRNAs were selected based on H3K27ac occupancy (Fig. 1A). Analysis of differentially expressed eRNAs between R6/1 and WT striata was performed, as well as eRNA annotation, which provided gene-eRNA associations (see Methods). 677 and 335 eRNAs were found decreased and increased, respectively (Fig. 1B and Table S1). Noticeably, down-regulated eRNAs were globally expressed at higher levels than up-regulated eRNAs in WT mice (Fig. 1C). Decreased expression of selective eRNAs, including eRNAs in neighborhood of *Rgs4*, *Rgs9*, *Slc24a4*, *Chn1*, *Gpr6*, *Ajap1*, *Bcr* and *Asphd2* genes, was confirmed by q-RT-PCR (Fig. 1D,E and S1A). Expression of *Hps1*-associated eRNA, which was unchanged between R6/1 and WT, was used as a negative control (Fig. 1D,E and S1A). mRNAs transcribed from *Rgs4*, *Rgs9*, *Slc24a4*, *Chn1*, *Gpr6*, *Ajap1*, *Bcr* and *Asphd2* were also decreased, in contrast to *Hps1* mRNA (Fig. S1B), suggesting a link between eRNA and mRNA deregulation in R6/1 mouse striatum. To evaluate the degree of conservation of the mechanism, we analyzed another HD mouse model widely used in the field, the Q140 knockin model, expressing full-length mutant Htt. These mice display progressive transcriptional dysregulation, particularly in the striatum¹⁰. *Rgs4*, *Rgs9*, *Slc24a4*, *Chn1*, *Gpr6*, *Ajap1*, *Bcr* and *Asphd2* mRNAs were also decreased in the striatum of 12 month-old Q140 mice (ref. 10 and S1B). eRNAs associated with these genes were significantly decreased or showed a tendency to the decrease, except *Slc24a4*-associated eRNA (Fig. S1C), suggesting that eRNA dysregulation in HD striatum is a general mechanism.

Target genes of decreased eRNAs in R6/1 striatum are enriched in neuronal function genes. We investigated whether down-regulated eRNAs in R6/1 striatum were enriched in genes implicated in specific functions. Gene ontology analysis (GO) using GREAT²² showed that enhancer regions involved in decreased eRNAs in R6/1 striatum were strongly associated with genes enriched in biological processes linked to neuronal activity, including neuronal transmission, synaptic plasticity and learning and memory (Fig. 2A). In contrast, regions involved in increased eRNAs were close to genes enriched in biological processes related to stem cell proliferation (Fig. 2A). Thus, down- and up-regulated eRNAs in R6/1 striatum associate with genes that display neuronal and developmental signatures, respectively.

Target genes of decreased eRNAs in R6/1 striatum are enriched in down-regulated genes. Down-regulated genes in R6/1 striatum also present a strong neuronal signature². Since eRNAs positively regulate their target genes, this suggests that decreased eRNAs might modulate expression of genes down-regulated in R6/1 striatum. Integrated analysis showed that target genes of enhancers associated with decreased eRNAs in R6/1 striatum were enriched in down-regulated genes (Fig. 2B). Moreover, levels of eRNAs in the neighborhood of decreased mRNA in R6/1 striatum were globally reduced (Fig. 2C). As expected, the subset of down-regulated genes associated with decreased eRNAs in R6/1 striatum displayed a clear neuronal signature (Fig. 2D). Interestingly, they were enriched in genes controlling neuronal excitability, including genes coding for voltage-gated potassium channels such as *Knca4*, *Kcnab1* and *Kcnj4* (Fig. 2E). In contrast, target genes of increased eRNAs were not enriched in up-regulated genes in R6/1 striatum (Fig. 2B). However, eRNAs associated with up-regulated genes in R6/1 vs WT striatum were globally increased (Fig. 2C), and these genes included developmental genes such as *Onecut1* and *Onecut2*, expressed in neural stem cells (Fig. 2E and ref. 23). Together, these results suggest that eRNA down-regulation has a broader influence on gene expression than eRNA up-regulation in R6/1 striatum, with biological impact of decreased eRNAs in R6/1 striatum affecting neuronal activity, including neuronal excitability, and that of increased eRNAs influencing neuronal fate. These two effects of eRNA dysregulation might synergistically contribute to loss of neuronal differentiated state of HD striatal neurons.

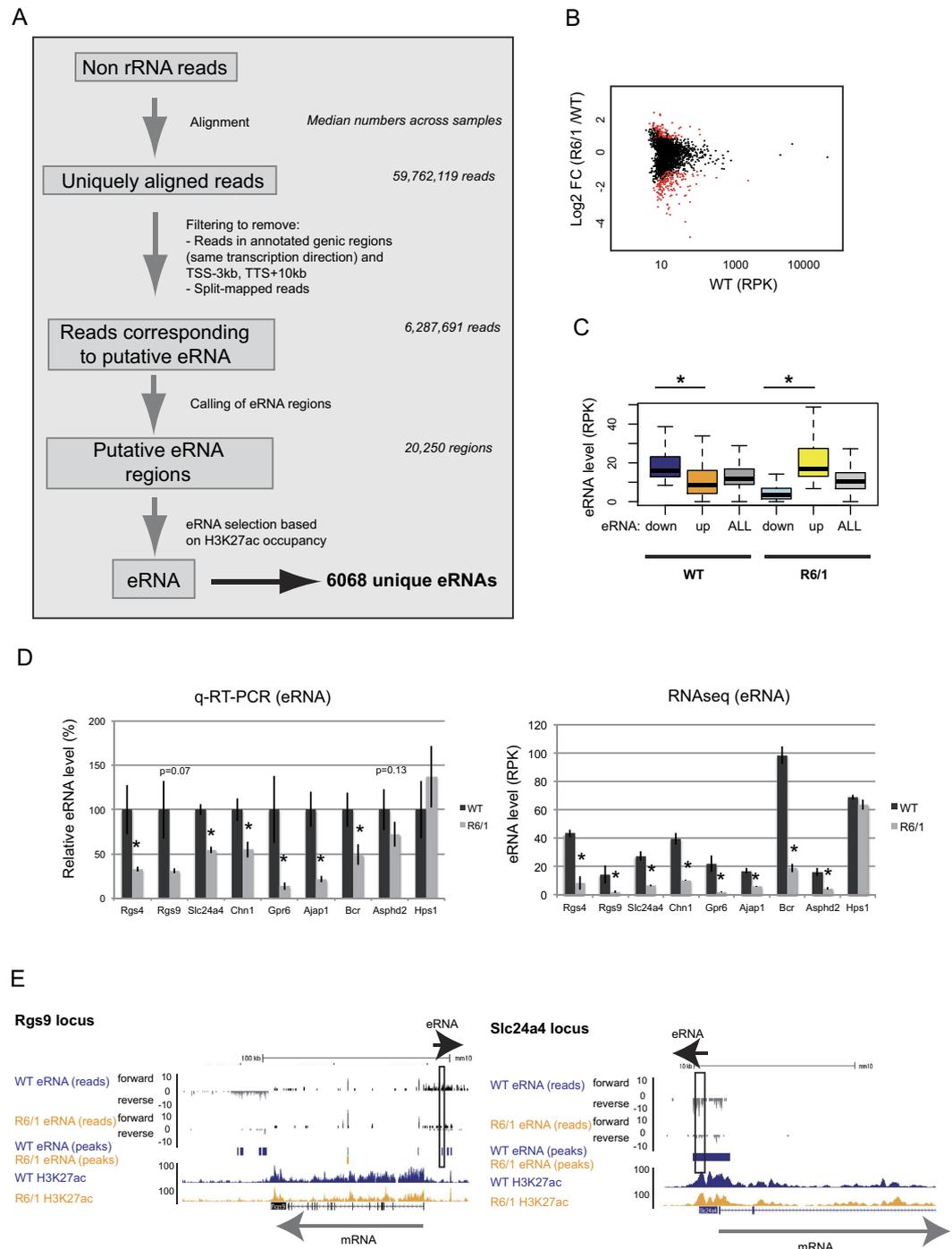


Figure 1. Identification, validation and global features of eRNAs in WT and HD R6/1 mouse striatum. (A) Workflow showing the sequential steps to identify eRNAs using RNAseq and H3K27ac ChIPseq data generated in striatum of WT and R6/1 mice. 6068 unique eRNAs were identified. (B) Scatter plot analysis of eRNAs, showing in red up- and down-regulated eRNAs in R6/1 vs WT mouse striatum. (C) Boxplot representation showing that WT levels of down-regulated and up-regulated eRNAs in R6/1 vs WT striatum are high and low, respectively. The situation is opposite when considering R6/1 samples. * $P < 0.05$ (Wilcoxon test). (D) (Left) Validation of eRNAs associated with *Rgs4*, *Rgs9*, *Slc24a4*, *Chn1*, *Gpr6*, *Ajap1*, *Bcr*, *Asphd2* and *Hps1* using q-RT-PCR. Error bars, sem; * $P < 0.05$ (Student's t-test). (Right) Analysis of RNAseq data showing that eRNA retrieved from regions tested by q-RT-PCR (at *Rgs4*, *Rgs9*, *Slc24a4*, *Chn1*, *Gpr6*, *Ajap1*, *Bcr* and *Asphd2* loci) are decreased, while eRNA associated with *Hps1* is unchanged. Error bars, sem; * $P < 0.05$ (Adjusted p-values, see methods). (E) Genome browser representation showing *Rgs9* and *Slc24a4* loci, including eRNA reads (before H3K27ac filtering), eRNA peaks (after H3K27ac filtering) and H3K27ac signals in WT and R6/1 striatum. Black boxes delimitate eRNA regions that were validated using q-RT-PCR. Black and grey arrows show the direction of expression of eRNA and mRNA, respectively (*Rgs4* and *Hps1* loci are shown in Fig. S1).

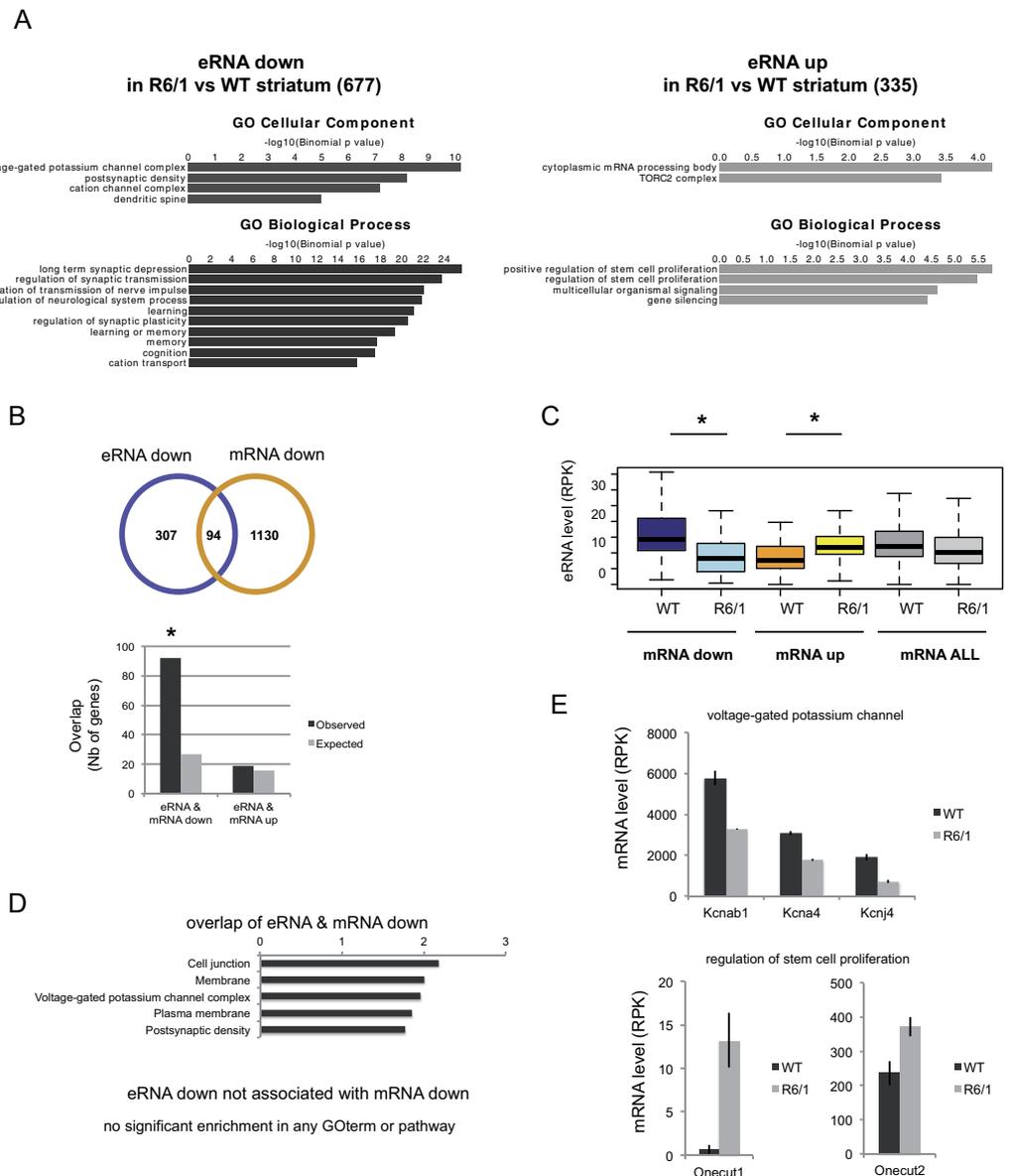


Figure 2. Target genes of decreased eRNAs in R6/1 striatum are involved in neuronal activity and are enriched in down-regulated genes. (A) Functional enrichment analysis of down- and up-regulated eRNAs in R6/1 vs WT striatum showing that down-regulated eRNAs (i.e. 677 down eRNAs) are strongly enriched in cellular components and biological processes linked to neuronal function, and thus display a clear neuronal signature. In contrast, up-regulated eRNAs (i.e. 335 up eRNAs) present stem cell proliferation and gene silencing signatures. (B) (Up) Overlap between target genes of decreased eRNAs and down-regulated genes in R6/1 vs WT striatum. (Down) Target genes of decreased eRNAs in R6/1 vs WT striatum are significantly enriched in down-regulated genes, whereas target genes of increased eRNAs in R6/1 vs WT striatum are not enriched in up-regulated genes. Observed numbers are compared to expected numbers; $*P < 10^{-2}$; Chi-square test. (C) Boxplot representation showing eRNA levels associated with down-regulated, up-regulated or all genes in R6/1 and WT striatum. $*P < 0.05$ (Wilcoxon test). (D) Functional enrichment analysis of eRNAs that were both decreased in R6/1 vs WT striatum and associated with down-regulated target gene. Decreased eRNAs associated with down-regulated genes in R6/1 vs WT striatum display a neuronal signature, noticeably a voltage-gated potassium channel signature, whereas decreased eRNAs that do not associate with down-regulated genes do not present any specific functional signature. (E) Target genes of decreased and increased eRNAs contributing, respectively, to voltage-gated potassium channel (e.g. *Kcnab1*, *Kcna4*, *Kcnj4*) and stem cell (e.g. *Onecut1* and *Onecut2*) signatures. mRNA levels calculated from RNAseq data are shown. Error bars, sem; (Adjusted p-values < 0.05 , see methods).

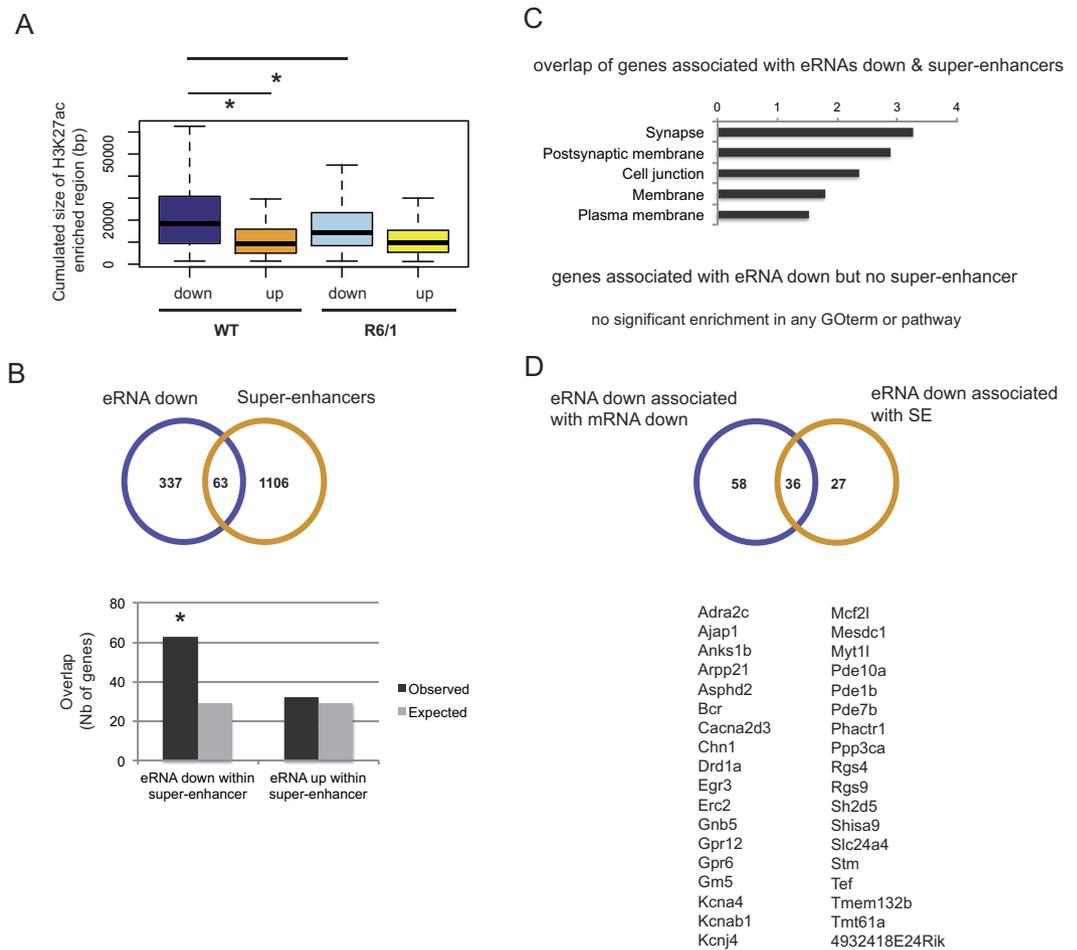


Figure 3. Enhancers leading to decreased eRNAs are enriched in super-enhancers in R6/1 striatum.

(A) Enhancer size of decreased eRNAs (down) in R6/1 vs WT striatum is broad and reduced in R6/1 striatum, compared to enhancer size of increased eRNAs (up). $*P < 0.05$ (Wilcoxon test). (B) (Up) Overlap of target genes of decreased eRNAs and genes regulated by a super-enhancer. (Down) Decreased eRNAs are enriched in eRNAs produced from super-enhancers, in contrast to increased eRNAs. Observed numbers are compared to expected numbers; $*P < 10^{-2}$; Chi-square test. (C) Functional enrichment analysis of decreased eRNAs in R6/1 striatum that are produced from a super-enhancer. Target genes of these decreased eRNAs display a neuronal signature, in contrast to target genes of decreased eRNAs not produced from a super-enhancer, which do not display any functional signature. (D) (Up) Overlap of target genes of decreased eRNAs that are both down-regulated in R6/1 striatum and regulated by a super-enhancer (SE). (Down) Gene names of this sub-list are presented.

Altered transcribed enhancers in R6/1 striatum are enriched in super-enhancers. Target genes of super-enhancers, a category of broad enhancers regulating cell type-specific identity genes, are preferentially down-regulated in R6/1 striatum². We therefore hypothesized that decreased eRNAs in R6/1 striatum were transcribed from super-enhancers. Integrated analysis of eRNA and H3K27ac ChIP-seq data on R6/1 and WT striatum supported this hypothesis, since H3K27ac-enriched regions associated with decreased eRNAs were broader in comparison with those associated with increased eRNAs (Fig. 3A). Consistently, enhancers associated with down-regulated eRNAs in R6/1 striatum were enriched in super-enhancers, in contrast to up-regulated eRNAs (Fig. 3B). In addition, decreased eRNAs produced from super-enhancers displayed a strong neuronal signature, whereas those produced from typical enhancers did not present any specific functional signature (Fig. 3C). This shows that neuronal signature of down-regulated eRNAs is essentially contributed by transcribed super-enhancers. We also crossed the list of decreased eRNA-associated genes regulated by a super-enhancer with the list of decreased eRNA-associated genes down-regulated in R6/1 striatum. Both lists were largely overlapping (Fig. 3D), showing that most down-regulated target genes associating with reduced eRNAs in R6/1 vs WT striatum are under the control of a super-enhancer. Genes within the resulting sub-list (36 genes) contained striatal markers (e.g. *Drd1*, *Rgs9*), including striatal voltage-gated potassium channels (e.g. *Kcnj4*/*Kir2.3*, ref. 24) (Fig. 3D). Finally, the size of H3K27ac enriched regions at enhancers associated with decreased eRNAs in R6/1 striatum were reduced in R6/1 when compared to WT mice (Fig. 3A), suggesting a link between reduction of H3K27ac-enriched regions and eRNA transcription in R6/1 striatum. Together, these data indicate that altered super-enhancer transcription in HD mouse striatum contributes to down-regulation of striatal identity genes.

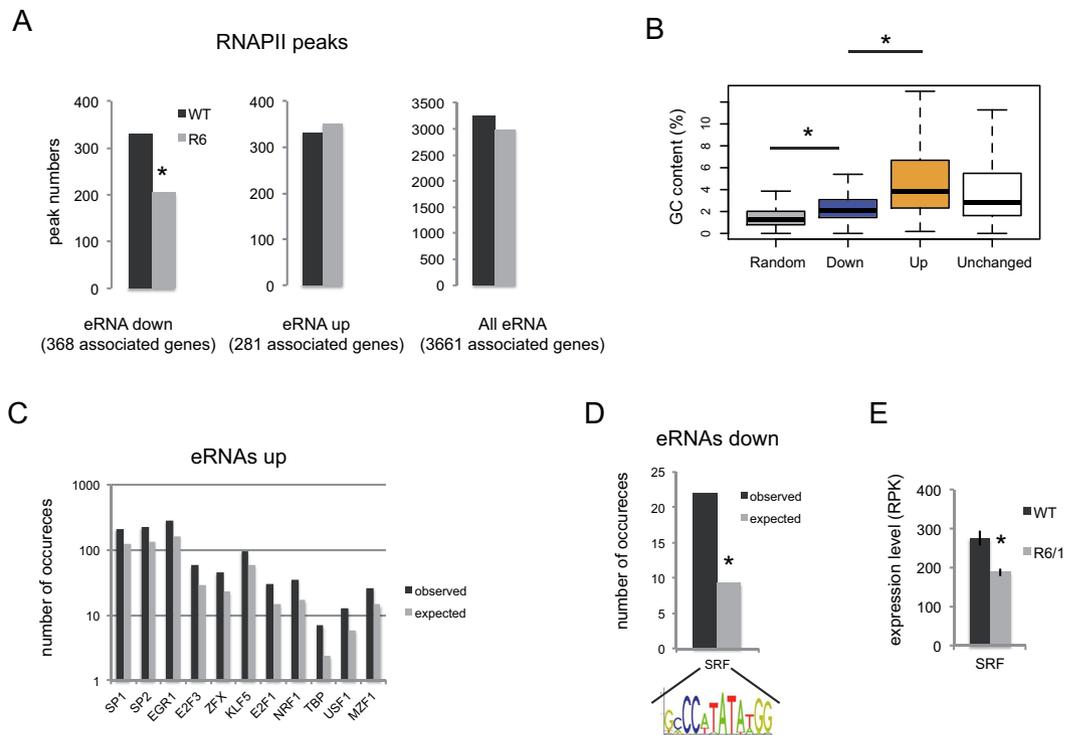


Figure 4. Enhancers leading to decreased eRNAs in R6/1 vs WT striatum present reduced RNAPII signals in R6/1 striatum and are enriched in SRF binding sites. (A) Graphs showing the numbers of RNAPII peaks in R6/1 and WT striatum found at enhancers leading to decreased and increased eRNAs in R6/1 vs WT striatum. RNAPII peak numbers, when considering all eRNAs, are also shown (B) GC content at transcribed enhancers is elevated, as compared to randomly chosen genomic sequences (Random), but less so at enhancers leading to decreased eRNAs (Down) in R6/1 striatum, when compared to enhancers leading to increased eRNAs (Up) or unchanged eRNAs (Unchanged) in R6/1 vs WT striatum. (C) DNA motif analysis showing that increased eRNAs in R6/1 vs WT striatum are enriched in several DNA motifs. Observed numbers of occurrences are compared to expected numbers. Only significantly enriched DNA motifs are shown (see methods). (D) DNA motif analysis showing that decreased eRNAs in R6/1 vs WT striatum are only enriched in the SRF DNA motif. Observed numbers of occurrences are compared to expected numbers. (E) Expression level of SRF in R6/1 vs WT striatum is shown (RNAseq data).

RNAPII binding sites are lost at enhancers associated with decreased eRNAs in R6/1 striatum. RNAPII is enriched at start sites of transcribed enhancers^{16,19,25}. To investigate whether RNAPII signal varied between WT and R6/1 samples, we integrated RNAPII ChIPseq data previously generated² to the analysis, filtering eRNAs containing RNAPII peaks. Out of 6068 eRNAs, 3248 were retrieved in WT mice following this filtering. A similar number (2990) were identified from R6/1 mice (Fig. 4A). Thus, a substantial proportion ($\approx 1/2$) of eRNAs were associated with a RNAPII peak and the numbers of eRNAs with RNAPII peaks were similar between WT and R6/1 samples, though a slight decrease (8%) was observed in R6/1 vs WT striatum. 331 eRNAs with RNAPII peaks were decreased in R6/1 striatum when compared to WT. Out of these 331 eRNAs, 127 lost RNAPII peaks in the R6/1 condition, which corresponded to a 38% loss. Thus, RNAPII peaks were dramatically reduced at R6/1 enhancers associated with decreased eRNAs (Fig. 4A), suggesting that loss of RNAPII contributes to decreased transcription of eRNA in HD mouse striatum. In contrast, 351 eRNAs were found increased in R6/1 vs WT striatum, of which only 18 gained RNAPII peaks in R6/1 mice (e.g. 5%; Fig. 4A), suggesting that RNAPII gain may not be a major mechanism governing eRNA upregulation in R6/1 striatum.

Enhancers associated with deregulated eRNAs in R6/1 striatum are enriched in selective DNA motifs. We then asked whether deregulated eRNAs in R6/1 striatum were enriched in binding sites for transcriptional regulators. Remarkably, transcribed enhancer sequences, whether they led to deregulated eRNAs or not, were enriched in GC content (Fig. 4B). This was particularly true for up-regulated eRNAs (Fig. 4B), which were also enriched in GC-rich DNA motifs (Fig. 4C and S1D). Within the list of DNA binding sites enriched in up-regulated eRNAs, none were recognized by transcriptional activators substantially up-regulated or transcriptional repressors down-regulated in the striatum of R6/1 mice². However, *Klf5* and *Usf1* were slightly but significantly up-regulated in R6/1 striatum (adjusted p-value is 0.03 in both cases, ref. 2). *Usf1* acts as a chromatin insulator element, promoting gene activation through inhibition of polycomb complex activity²⁶, whereas *Klf5* is a developmental transcription factor involved in maintenance of embryonic stem cells undifferentiated state^{27,28}.

These DNA motif signatures are consistent with the functional signature of up-regulated eRNAs in R6/1 striatum, characterized by biological processes linked to both gene silencing and regulation of stem cell proliferation (Fig. 2A).

In contrast to increased eRNAs in R6/1 striatum, decreased eRNAs were exclusively enriched in a DNA motif recognized by SRF (Fig. 4D), a transcription factor that recruits RNAPII to transcription sites. Additionally, *Srf* expression, which is substantial in mouse striatum, is significantly decreased in HD mouse striatum (Fig. 4E). Since SRF is a key player of neuronal plasticity²⁹, reduced *Srf* expression in HD striatum might contribute to decreased transcription at striatal enhancers, through impaired recruitment of RNAPII, which might in turn lead to down-regulation of striatal enhancer target genes.

Discussion

In this study, we have investigated enhancer transcription in normal and Huntington's disease mouse striatum. We show that eRNAs are widely expressed from striatal enhancers and many eRNAs are decreased in R6/1 vs WT mouse striatum. These decreased eRNAs in R6/1 striatum display a strong neuronal signature: their target genes are highly enriched in biological processes linked to synaptic plasticity, neuronal transmission and learning. This result is consistent with the fact that decreased eRNAs in R6/1 striatum are preferentially expressed from super-enhancers, which control genes that define cell type-specific identity and function. Our data also show that transcribed enhancers resulting in decreased eRNAs in R6/1 striatum are selectively enriched in a DNA motif recognized by SRF, a transcription factor altered in R6/1 striatum, display loss of RNAPII signals, and associate with genes that are down-regulated in R6/1 striatum. Together, these data indicate that repression of neuronal genes in HD striatum involves an epigenetic mechanism, eRNA dysregulation, originating from altered recruitment of RNAPII at super-enhancers, possibly due to reduced SRF levels.

Down-regulated genes in HD mouse striatum are preferentially regulated by super-enhancers². As a result, they display a strong neuronal signature^{2,4,9,10}. In this study, we showed that transcription at substantial numbers of super-enhancers was decreased in R6/1 striatum (Fig. 3). Target genes of super-enhancers showing decreased eRNAs were down-regulated in R6/1 striatum (Fig. 2). Since enhancer transcription is a marker of enhancer activity¹⁶ and eRNAs positively regulate transcription of their target genes¹⁸, our results uncover that altered super-enhancer activity broadly contributes to down-regulation of markers of striatal identity in HD mice.

In contrast, increased (super-) enhancer activity had no broad impact on gene up-regulation in HD striatum, since up-regulated eRNAs in R6/1 striatum poorly overlapped with super-enhancers and their target genes were not enriched in up-regulated genes (Fig. 2B). However, our results showed that up-regulation of the developmental genes *Onecut1* and *Onecut2*, expressed in neural stem cells²³, correlated with augmented transcription of associated eRNAs (Fig. 2E). This suggests that selected increased eRNAs contribute to striatal neuron dedifferentiation. Thus, increased and decreased transcription at enhancers might both participate to loss of differentiated state of striatal neurons in response to the HD mutation, through re-activation of genes expressed in immature neurons and repression of genes defining striatal neuron identity, respectively.

Using a cellular model of inflammation, Hah *et al.* reported extensive transcription within super-enhancers¹⁹. They also showed that super-enhancer transcription was required for the regulation of target genes involved in innate immunity. Our results showed that neuronal super-enhancer transcription was also extensive, which suggests that super-enhancer transcription is a general mechanism critical to the regulation of genes that determine cell type-specific identity and function.

We analyzed eRNA transcription in basal conditions – as opposed to stimulus-induced conditions – and found that many eRNAs (6068) were transcribed from mouse striatal enhancers. This result is consistent with previous study, which identified 8990 and 7779 eRNAs in mouse cortex and cerebellum, respectively³⁰. Thus, many enhancers are constitutively active in a mouse brain tissue and our results indicate that repression of neuronal genes in HD striatum predominantly results from altered activity of constitutively active enhancers.

Using primary cortical cultures, Kim *et al.* previously identified neuronal stimulus-responsive enhancers using a genome-wide approach¹⁶. The epigenetic signature of these activity-regulated enhancers was characterized by increased H3K27ac signals and augmented eRNA transcription^{16,17}. Our results showing that reduced eRNAs transcription correlates with decreased H3K27ac signals in R6/1 striatum (Fig. 3A) further support the idea of an interaction between mechanisms regulating enhancer transcription and H3K27 acetylation.

The transcription factor FOS was enriched at neuronal stimulus-responsive enhancers¹⁷. However, it is not likely to be the case for constitutively active enhancers, since basal expression of *Fos* is low in neurons. Remarkably, enhancers that associated with reduced eRNA transcription in HD mouse striatum were enriched in a DNA motif recognized by another transcription factor, SRF (Fig. 4D). SRF is a key regulator of synaptic plasticity and this function of SRF includes mechanisms that modulate constitutively expressed genes³¹. Particularly, basal gene expression changes resulting from inactivation of the *Srf* gene in the adult forebrain accounted for altered synaptic plasticity, specifically long term depression (LTD)³¹. Noticeably, it has been reported that synaptic plasticity, including LTD, is impaired in HD mice³². Moreover, *Srf* transcription is reduced in R6/1 striatum (Fig. 4E). Whether altered SRF regulation in HD mouse striatum affects constitutively active enhancers, including super-enhancers, thereby contributing to altered expression of synaptic plasticity genes, is an intriguing hypothesis. This possibility would be consistent with functional enrichment analysis showing that down-regulated eRNAs in R6/1 striatum were enriched in GO terms such as “regulation of synaptic plasticity”, “long term depression” (LTD) and “learning” (Fig. 2A).

Voltage-gated potassium channels were enriched in the subsets of down-regulated genes associated with reduced enhancer transcription (Fig. 2D). Specific regulation of potassium currents is required to unique electrophysiological properties of striatal neurons, including maintenance of the hyperpolarized state^{24,33,34}. Decreased expression of voltage-gated potassium channels in HD mice, which results in altered excitability properties of striatal neurons, due to depolarized resting state membrane potentials, was suggested to partially account for

preferential vulnerability of striatal medium spiny neurons in HD²⁴. Our data showing that altered transcribed enhancers in HD mouse striatum display a voltage-gated potassium channel signature might indicate that eRNA dysregulation underlies increased striatal vulnerability in HD.

We showed that transcribed enhancers display high GC content (Fig. 4B), which suggests that enhancers are subject to regulation by DNA methylation. Strikingly, decreased eRNAs in R6/1 vs WT striatum were less GC-rich, in comparison with up-regulated eRNAs or with unchanged eRNAs. This is consistent with results showing that super-enhancers are hypo-methylated, which might facilitate a chromatin state permissive to transcription^{35,36}.

In conclusion, we propose that targeting striatal enhancers in an attempt to improve enhancer transcription might prevent repression of neuronal genes in HD. The development of therapeutic strategies permitting to target enhancers may thus represent a future challenge.

Materials and Methods

Animals. Hemizygous R6/1 (≈ 150 CAGs)³⁷ and Q140 knockin mice from the Jackson Laboratory were maintained on mixed CBAx C57BL/6 and C57BL/6 genetic backgrounds, respectively. The experimental protocol followed the European directive (Directive 2010/63/UE) and received French governmental authorizations. Mice were housed in a temperature-controlled room maintained on a 12 hours light/dark cycle. Food and water were available ad libitum. All animal studies were conducted according to the French regulation (EU Directive 2010/63/EU – French Act Rural Code R 214-87 to 131). The animal facility was approved by veterinarian inspectors: authorizations n° E67-482-13 for Laboratory of Cognitive and Adaptive Neurosciences (i.e. LNCA) and n° A 92-032-02 for Commissariat à l’Energie Atomique (i.e. CEA) and complies with Standards for Humane Care and Use of Laboratory Animals of the Office of Laboratory Animal Welfare (OLAW). All procedures received approval from French Ministry of Higher Education and Research (authorizations n° 2015042011568820v3/APAFIS#504 for R6/1 line/LNCA and n° 2015060417243726v1/APAFIS#770 for Q140 line/CEA). People involved in animal care, killing and tissue preparation have official expertise. R6/1 and Q140 mice were killed at 30 weeks and 12 months, respectively, and their striata were rapidly dissected, snap frozen and stored at -80°C . The methods regarding animal use were carried out in accordance with the relevant guidelines and regulations.

RNA extraction and qRT-PCR. Each sample was prepared from single striatum of R6/1 and WT littermate mice (for R6/1 vs WT comparisons) or from single striatum of Q140 and WT littermate mice (for Q140 vs WT comparisons). Biological replicates (4 to 6) were performed for each group. Tissues were finely cut with a razor blade and total RNA was extracted using TRIzol reagent (Invitrogen). An additional DNase treatment (Euromedex) was added before RNA purification by phenol/chloroform extraction and ethanol precipitation. cDNA synthesis was performed either on 0.5 μg of total RNA (iScript Reverse transcription Supermix for RT-qPCR kit; Bio-Rad) or on 2 μg of total RNA for strand-specific reverse transcription (SuperScript II Reverse Transcriptase; Invitrogen or High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit; Appliedbiosystems). Gene-specific primers are available upon request. qRT-PCR analysis was performed on a Bio-Rad iCycler System (CFX) using SsoAdvanced SYBR Green Supermix (Bio-Rad). qRT-PCR conditions were 30 s at 95°C , followed by 45 cycles of 5 s at 95°C and 20 s at 63°C . RT controls were performed by the omission of RNA template or RT enzyme. A specific standard curve was performed in parallel for each gene, and each sample was quantified in duplicate. Data were analyzed by gene regression using iCycler software and normalized to *Gapdh* or *36B4* levels.

ChIP-seq. ChIP-seq data was previously generated²: ChIP-seq reads were aligned to the mouse reference genome (GRCm38/mm10) using Bowtie v0.12.8 using the following parameters -m 1 -strata -best. Only uniquely aligned reads have been retained for further analyses. Peak calling was performed using either MACS v1.4.2 or SICER v1.1³⁸. MACS was used to detect peaks into RNAPII data using default parameters except for -g mm. SICER was used to detect islands into H3K27ac data using the script SICER.sh with the following parameters: Species: mm10, Threshold for redundancy allowed for chip reads: 1, Threshold for redundancy allowed for control reads: 1, Window size: 200 bps, Effective genome size as a fraction of the reference genome of mm10: 0.77, Gap size: 600 bps, Evalue for identification of candidate islands that exhibit clustering: 1000, False discovery rate controlling significance: 10^{-2} . Fragment size was set according to the value assessed by Homer v4.7.2 makeTagDirectory. Peaks/Islands were annotated using Homer v4.7.2 with annotations extracted from Ensembl v78.

RNAseq. RNA-seq data was previously generated²: RNAseq reads were aligned onto mouse rRNA sequences using bowtie³⁹ release 0.12.7. Reads that do not map to rRNA sequences were mapped onto the mouse reference genome (GRCm38/mm10) using Tophat2 release 2.0.10⁴⁰. Only uniquely aligned reads have been retained for further analyses.

Gene expression was quantified using HTSeq⁴¹ release 0.5.4p3 and gene annotations from Ensembl release 78. Read counts were normalized across libraries with the method proposed by Anders *et al.*⁴². Comparison between R6/1 and WT samples was performed using the method proposed by Love *et al.*⁴³, implemented in the DESeq2 Bioconductor library (release 1.0.19). Adjustment for multiple testing was performed using a method previously described⁴⁴.

eRNA identification. In order to identify reads from putative eRNA, we removed split-mapped reads and reads that overlap (≥ 1 bp on the opposite strand) genes annotated by Ensembl (release 78) as: IG_C_gene, IGD_gene, IG_J_gene, IG_LV_gene, IG_V_pseudogene, Mt_rRNA, Mt_tRNA, polymorphic_pseudogene, protein_coding, pseudogene, rRNA, TR_V_gene and TR_V_pseudogene. We extended the region corresponding to those genes to 3 kb upstream of the transcription start site and 10 kb downstream of the transcript end site, in order to minimize signal from polymerase read-through from genic transcripts (as previously described ref. 19). IntersectBed from BEDTools release 2.21.0 was used for this purpose⁴⁵. This overlap was performed on the

opposite strand as the library preparation protocol we used to construct these RNAseq libraries leads to sequence the strand generated during first strand cDNA synthesis.

On those filtered RNAseq reads, we then detected the location of putative eRNA as genomic regions enriched in RNAseq reads. We thus used a method used for ChIP-seq peak detection: we used MACS v1.4.2⁴⁶ with the following parameters `-keep-dup = all -nomodel -nolambda -p 1e-4 -g mm`. The parameter `-shiftsize` was set according to the value assessed by Homer v4.7.2⁴⁷ `makeTagDirectory`.

Motif analysis. Motifs searching of known motifs (Jaspar 2014 motif database) was made using FIMO⁴⁸ within sequences of up and down eRNA. FIMO results were then processed by a custom Perl script that computed the number of occurrence of each motif. To assess the enrichment of motifs within the regions of interest, the same analysis was done *n* times (*n* = 100) on randomly selected eRNA regions. We chose to use randomly selected eRNA regions as controls to compute an expected distribution of motif occurrence and to correct for the nucleotide composition bias that could occur specifically in eRNA sequences. Region size distribution of the randomly selected eRNA was the same as for the up and down eRNA of interest. The significance of the motif occurrence was estimated through the computation of a Z-score.

The Z-score was computed this way:

$$z = (x - \mu) / \sigma$$

where:

- *x* is the observed value (number of motif occurrence)
- μ is the mean of the number of occurrences (computed on randomly selected data)
- σ is the standard deviation of the number of occurrences of motifs (computed on randomly selected data)

From the Z-scores, P values for each motif were computed. The P values were corrected for multi-testing using a method previously described⁴⁴. Statistical analysis was done with custom R scripts.

Gene ontology (GO) analysis. Functional enrichments analyses were performed using the tools DAVID and/or GREAT^{22,49}. For analyses with GREAT, defaults setting were used. Whole Mouse genome was used as background. Top-enriched terms are shown (*P* values < 0.05 were considered).

Integrated analyses. GalaxEast (galaxeast.fr) was used to integrate data relative to eRNA, mRNA, H3K27ac (including super-enhancers) and RNAPII signals.

Data access. RNA-seq and ChIP-seq data used for eRNA analysis are accessible through GEO (accession number GSE59572).

References

1. Seredenina, T. & Luthi-Carter, R. What have we learned from gene expression profiles in Huntington's disease? *Neurobiol Dis* **45**, 83–98, doi: 10.1016/j.nbd.2011.07.001 (2012).
2. Achour, M. *et al.* Neuronal identity genes regulated by super-enhancers are preferentially down-regulated in the striatum of Huntington's disease mice. *Hum Mol Genet* **24**, 3481–3496, doi: 10.1093/hmg/ddv099 (2015).
3. Valor, L. M., Guiretti, D., Lopez-Atalaya, J. P. & Barco, A. Genomic landscape of transcriptional and epigenetic dysregulation in early onset polyglutamine disease. *J Neurosci* **33**, 10471–10482, doi: 10.1523/JNEUROSCI.0670-13.2013 (2013).
4. Vashishtha, M. *et al.* Targeting H3K4 trimethylation in Huntington disease. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**, E3027–3036, doi: 10.1073/pnas.1311323110 (2013).
5. Seong, I. S. *et al.* Huntingtin facilitates polycomb repressive complex 2. *Hum Mol Genet* **19**, 573–583, doi: 10.1093/hmg/ddp524 (2010).
6. Biagioli, M. *et al.* Htt CAG repeat expansion confers pleiotropic gains of mutant huntingtin function in chromatin regulation. *Hum Mol Genet*, doi: 10.1093/hmg/ddv006 (2015).
7. Bai, G. *et al.* Epigenetic dysregulation of hairy and enhancer of split 4 (HES4) is associated with striatal degeneration in postmortem Huntington brains. *Hum Mol Genet* **24**, 1441–1456, doi: 10.1093/hmg/ddu561 (2015).
8. Hodges, A. *et al.* Regional and cellular gene expression changes in human Huntington's disease brain. *Hum Mol Genet* **15**, 965–977, doi: 10.1093/hmg/ddl013 (2006).
9. Kuhn, A. *et al.* Mutant huntingtin's effects on striatal gene expression in mice recapitulate changes observed in human Huntington's disease brain and do not differ with mutant huntingtin length or wild-type huntingtin dosage. *Hum Mol Genet* **16**, 1845–1861, doi: 10.1093/hmg/ddm133 (2007).
10. Langfelder, P. *et al.* Integrated genomics and proteomics define huntingtin CAG length-dependent networks in mice. *Nat Neurosci* **19**, 623–633, doi: 10.1038/nn.4256 (2016).
11. Kuhn, A. *et al.* Mutant huntingtin's effects on striatal gene expression in mice recapitulate changes observed in human Huntington's disease brain and do not differ with mutant huntingtin length or wild-type huntingtin dosage. *Hum Mol Genet* **16**, 1845–1861 (2007).
12. Francelle, L., Galvan, L. & Brouillet, E. Possible involvement of self-defense mechanisms in the preferential vulnerability of the striatum in Huntington's disease. *Front Cell Neurosci* **8**, 295, doi: 10.3389/fncel.2014.00295 (2014).
13. Luthi-Carter, R. *et al.* Decreased expression of striatal signaling genes in a mouse model of Huntington's disease. *Hum. Mol. Genet.* **9**, 1259–1271 (2000).
14. Valor, L. M. Transcription, epigenetics and ameliorative strategies in Huntington's Disease: a genome-wide perspective. *Mol Neurobiol* **51**, 406–423, doi: 10.1007/s12035-014-8715-8 (2015).
15. Wu, H. *et al.* Tissue-specific RNA expression marks distant-acting developmental enhancers. *PLoS Genet* **10**, e1004610, doi: 10.1371/journal.pgen.1004610 (2014).
16. Kim, T. K. *et al.* Widespread transcription at neuronal activity-regulated enhancers. *Nature* **465**, 182–187, doi: 10.1038/nature09033 (2010).
17. Malik, A. N. *et al.* Genome-wide identification and characterization of functional neuronal activity-dependent enhancers. *Nat Neurosci* **17**, 1330–1339, doi: 10.1038/nn.3808 (2014).

18. Arner, E. *et al.* Transcribed enhancers lead waves of coordinated transcription in transitioning mammalian cells. *Science* **347**, 1010–1014, doi: 10.1126/science.1259418 (2015).
19. Hah, N. *et al.* Inflammation-sensitive super enhancers form domains of coordinately regulated enhancer RNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* **112**, E297–302, doi: 10.1073/pnas.1424028112 (2015).
20. Schaukowitz, K. *et al.* Enhancer RNA Facilitates NELF Release from Immediate Early Genes. *Mol Cell* **56**, 29–42, doi: 10.1016/j.molcel.2014.08.023 (2014).
21. Pnueli, L., Rudnizky, S., Yosefzon, Y. & Melamed, P. RNA transcribed from a distal enhancer is required for activating the chromatin at the promoter of the gonadotropin alpha-subunit gene. *Proc Natl Acad Sci USA* **112**, 4369–4374, doi: 10.1073/pnas.1414841112 (2015).
22. McLean, C. Y. *et al.* GREAT improves functional interpretation of cis-regulatory regions. *Nature biotechnology* **28**, 495–501, doi: 10.1038/nbt.1630 (2010).
23. Yuan, J., Lei, Z. N., Wang, X., Deng, Y. J. & Chen, D. B. Interaction between Oc-1 and Lmx1a promotes ventral midbrain dopamine neural stem cells differentiation into dopamine neurons. *Brain Res* **1608**, 40–50, doi: 10.1016/j.brainres.2015.02.046 (2015).
24. Ariano, M. A. *et al.* Striatal potassium channel dysfunction in Huntington's disease transgenic mice. *J Neurophysiol* **93**, 2565–2574, doi: 10.1152/jn.00791.2004 (2005).
25. De Santa, F. *et al.* A large fraction of extragenic RNA pol II transcription sites overlap enhancers. *PLoS Biol* **8**, e1000384, doi: 10.1371/journal.pbio.1000384 (2010).
26. Barkess, G. & West, A. G. Chromatin insulator elements: establishing barriers to set heterochromatin boundaries. *Epigenomics* **4**, 67–80, doi: 10.2217/epi.11.112 (2012).
27. Bourillot, P. Y. & Savatier, P. Kruppel-like transcription factors and control of pluripotency. *BMC Biol* **8**, 125, doi: 10.1186/1741-7007-8-125 (2010).
28. Parisi, S. *et al.* Direct targets of Klf5 transcription factor contribute to the maintenance of mouse embryonic stem cell undifferentiated state. *BMC Biol* **8**, 128, doi: 10.1186/1741-7007-8-128 (2010).
29. Ramanan, N. *et al.* SRF mediates activity-induced gene expression and synaptic plasticity but not neuronal viability. *Nat Neurosci* **8**, 759–767, doi: 10.1038/nn1462 (2005).
30. Cheng, J. H., Pan, D. Z., Tsai, Z. T. & Tsai, H. K. Genome-wide analysis of enhancer RNA in gene regulation across 12 mouse tissues. *Sci Rep* **5**, 12648, doi: 10.1038/srep12648 (2015).
31. Etkin, A. *et al.* A role in learning for SRF: deletion in the adult forebrain disrupts LTD and the formation of an immediate memory of a novel context. *Neuron* **50**, 127–143, doi: 10.1016/j.neuron.2006.03.013 (2006).
32. Cummings, D. M. *et al.* Aberrant cortical synaptic plasticity and dopaminergic dysfunction in a mouse model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet* **15**, 2856–2868, doi: 10.1093/hmg/ddl224 (2006).
33. Bargas, J., Galarraga, E. & Aceves, J. Electrotonic properties of neostriatal neurons are modulated by extracellular potassium. *Exp Brain Res* **72**, 390–398 (1988).
34. Mermelstein, P. G., Song, W. J., Tkatch, T., Yan, Z. & Surmeier, D. J. Inwardly rectifying potassium (IRK) currents are correlated with IRK subunit expression in rat nucleus accumbens medium spiny neurons. *J Neurosci* **18**, 6650–6661 (1998).
35. Guo, J. U. *et al.* Neuronal activity modifies the DNA methylation landscape in the adult brain. *Nat Neurosci* **14**, 1345–1351, doi: 10.1038/nn.2900 (2011).
36. Liu, H. *et al.* Systematic identification and annotation of human methylation marks based on bisulfite sequencing methylomes reveals distinct roles of cell type-specific hypomethylation in the regulation of cell identity genes. *Nucleic Acids Res* **44**, 75–94, doi: 10.1093/nar/gkv1332 (2016).
37. Mangiarini, L. *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* **87**, 493–506 (1996).
38. Zang, C. *et al.* A clustering approach for identification of enriched domains from histone modification ChIP-Seq data. *Bioinformatics* **25**, 1952–1958, doi: 10.1093/bioinformatics/btp340 (2009).
39. Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M. & Salzberg, S. L. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol* **10**, R25, doi: 10.1186/gb-2009-10-3-r25 (2009).
40. Kim, D. *et al.* TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol* **14**, R36, doi: 10.1186/gb-2013-14-4-r36 (2013).
41. Anders, S. *et al.* Count-based differential expression analysis of RNA sequencing data using R and Bioconductor. *Nat Protoc* **8**, 1765–1786, doi: 10.1038/nprot.2013.099 (2013).
42. Anders, S. & Huber, W. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol* **11**, R106, doi: 10.1186/gb-2010-11-10-r106 (2010).
43. Love, M. I., Huber, W. & Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* **15**, 550–571, doi: 10.1101/002832 (2014).
44. Benjamini, Y. & Hochberg, Y. Controlling the False Discovery Rate - a Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J Roy Stat Soc B Met* **57**, 289–300 (1995).
45. Quinlan, A. R. & Hall, I. M. BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics* **26**, 841–842, doi: 10.1093/bioinformatics/btq033 (2010).
46. Zhang, Y. *et al.* Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS). *Genome Biol* **9**, R137, doi: 10.1186/gb-2008-9-9-r137 (2008).
47. Heinz, S. *et al.* Simple combinations of lineage-determining transcription factors prime cis-regulatory elements required for macrophage and B cell identities. *Mol Cell* **38**, 576–589, doi: 10.1016/j.molcel.2010.05.004 (2010).
48. Grant, C. E., Bailey, T. L. & Noble, W. S. FIMO: scanning for occurrences of a given motif. *Bioinformatics* **27**, 1017–1018, doi: 10.1093/bioinformatics/btr064 (2011).
49. Huang da, W., Sherman, B. T. & Lempicki, R. A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* **4**, 44–57, doi: 10.1038/nprot.2008.211 (2009).

Acknowledgements

We thank Ms Carole Strittmater for animal housing and genotyping. This work was supported by funds from Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Agence Nationale de la Recherche (ANR-2011-JSV6-003-01 to KM), and European Huntington's Disease Network (EHDN). A.A. is a post-doctoral fellow supported by EHDN. Sequencing was performed by the GenomEast Platform, a member of the 'France Génomique' consortium (ANR-10-INBS-0009).

Author Contributions

S.L.G., C.K. and K.M. designed the analysis. K.M. supervised the study. S.L.G., C.K. and K.M. performed the analysis with contribution from A.A., J.C.C. and A.L.B., A.A. and C.L. performed the experiments. L.D.L. and E.B. provided mouse tissues. The manuscript was written by S.L.G., C.K. and K.M. with contribution from A.A., C.L., L.D.L., E.B., A.L.B. and J.C.C.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <http://www.nature.com/srep>

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

How to cite this article: Le Gras, S. *et al.* Altered enhancer transcription underlies Huntington's disease striatal transcriptional signature. *Sci. Rep.* 7, 42875; doi: 10.1038/srep42875 (2017).

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

© The Author(s) 2017

5 Article collaboratif n°3 : In vivo imaging of brain glutamate defects in a knock-in mouse model of Huntington's disease

Neuroimage. 2016 Oct 1;139:53-64. doi: 10.1016/j.neuroimage.2016.06.023

Titre : Etude du rôle de la protéine kinase DCLK3 dans les mécanismes de neurodégénérescence dans la maladie de Huntington

Mots clés : DCLK3, Maladie de Huntington, Striatum, Neuroprotection

Résumé : DCLK3 (Doublecortin-like kinase 3) est une protéine kinase neuronale enrichie dans le striatum et dans le gyrus denté. L'expression de DCLK3 est nettement diminuée dans le cerveau des patients atteints de la maladie de Huntington (MH). Cependant, son rôle reste pour l'instant inconnu. Le laboratoire avait précédemment montré que DCLK3 pouvait jouer un rôle neuroprotecteur, en particulier dans différents modèles de la MH. En effet, la surexpression de *Dclk3* dans le striatum produit un effet neuroprotecteur contre la toxicité de l'huntingtine mutée (Httm) et améliore les déficits moteurs dans les modèles murins de la MH (knock-in avec 140 répétitions de CAG). Nos résultats récents ont aussi montré que DCLK3 était localisée dans les noyaux des neurones et pourrait réguler la transcription par un mécanisme épigénétique. Le but de la présente étude a été de mieux comprendre le rôle de DCLK3 dans le cerveau. Pour cela, nous avons produit des souris avec des sites LoxP dans le gène *Dclk3* (*Dclk3^{flox/flox}*). Nous avons d'abord croisé ces souris avec les souris CMV-cre pour obtenir des souris constitutivement déficientes en *Dclk3* et ceci dans l'ensemble de l'organisme.

Nos études comportementales portant sur la mémoire, l'anxiété et les performances motrices, n'ont révélé aucun déficit majeur dans le phénotype. En accord avec cette observation, l'analyse structurale des cerveaux des souris KO *Dck3* par histologie et IRM n'a pas révélé d'atteinte notable par rapport aux animaux témoins. Cependant, le profil des métabolites des mâles à 6 mois était légèrement mais significativement perturbé. Nous avons également croisé les souris *Dclk3^{flox/flox}* avec des souris *Rgs9-cre* pour avoir une délétion de *Dclk3* uniquement dans le striatum. Aucun déficit moteur n'a été observé dans ces souris. De manière intéressante, l'injection d'AAV-cre dans l'hippocampe des souris adultes *Dclk3^{flox/flox}* tend à créer des déficits de mémoire au test de la piscine de Morris. L'ensemble de nos résultats indique un rôle de DCLK3 dans la plasticité synaptique dans l'hippocampe et suggère que la perte de DCLK3 dans la MH contribuerait aux aspects cognitifs de la maladie. Ainsi, à terme, la signalisation impliquant DCLK3 pourrait constituer une cible thérapeutique intéressante pour améliorer certains processus neurodégénératifs.

Title : The role of the kinase DCLK3 in mechanisms of neurodegeneration in Huntington's disease

Keywords : DCLK3, Huntington's disease, Striatum, Neuroprotection

Abstract: DCLK3 (Doublecortin-like kinase 3) is a neuronal kinase enriched in the striatum and in the dentate gyrus of the hippocampus. DCLK3 expression is markedly reduced in the brain of Huntington's disease (HD) patients. However, its role remains unknown. The laboratory previously showed that DCLK3 could play a neuroprotective role, specifically in different HD models. The overexpression of *Dclk3* in the striatum produces neuroprotection against mutant huntingtin (mHtt) toxicity and ameliorates motor deficits in rodent models of HD (knock-in mice with 140 CAG repeats). Our recent results indicate that DCLK3 is localized in the nucleus of neurons and may play a role in transcription through epigenetic mechanisms. Here, we aim at investigating further the role of DCLK3 in the brain. To do so, we generated mice with loxP sites in the *Dclk3* gene (*DCLK3^{flox/flox}*). We first crossed them with CMV-Cre mice to obtain constitutive knockout *Dclk3* mice in the whole body.

Our behavioral study on memory, anxiety and motor phenotype show no obvious deficit. Likewise, structural analysis in the brain of *Dclk3* KO mice in histology and MRI did not highlight any deficit compared to control mice. However the metabolite profile in males at 6 months was slightly but significantly disturbed. *Dclk3^{flox/flox}* mice were also crossed with *Rgs9-cre* mice to have *Dclk3* deletion in the striatum only. No motor deficits were observed in these mice. Interestingly, the injection of AAV-Cre in the hippocampus of adult *Dclk3^{flox/flox}* mice tends to produce memory deficits in the water-maze test. These results indicate a potential role of DCLK3 in synaptic plasticity in the hippocampus and suggest that the loss of this protein in HD could contribute to cognitive aspects of the disease. In long term, the signaling involving DCLK3 may constitute an interesting therapeutic target to improve certain neurodegenerative processes.

