



HAL
open science

Rôle de la huntingtine dans le muscle

Brice Poreau

► **To cite this version:**

Brice Poreau. Rôle de la huntingtine dans le muscle. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Grenoble Alpes, 2017. Français. NNT : 2017GREAV077 . tel-02314260

HAL Id: tel-02314260

<https://theses.hal.science/tel-02314260>

Submitted on 12 Oct 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.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE LA COMMUNAUTE UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Biologie cellulaire**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Brice POREAU

Thèse co-dirigée par **Isabelle MARTY** et **Julien FAURE**, et co-encadrée par **Frédéric SAUDOU**

préparée au sein de l'équipe « **Myologie cellulaire et pathologies** », **Grenoble Institut des Neurosciences, INSERM U1216** dans l'**École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

Rôle de la huntingtine dans le muscle

Thèse soutenue publiquement le **11 octobre 2017**, devant le jury composé de :

Pr Alain BUISSON

Professeur des Universités, Université de Grenoble, Président

Pr Alexandra DURR

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier, Université de Paris, Rapporteur

Dr Vincent JACQUEMOND

Directeur de Recherche, Université de Lyon, Rapporteur

Dr Christophe LAMAZE

Directeur de Recherche, Université de Paris, Examineur

Dr Isabelle MARTY

Directeur de Recherche, Université de Grenoble, Directeur de thèse

Pr Frédéric SAUDOU

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier, Université de Grenoble, Invité

Dr Julien FAURE

Maître de conférence des Universités – Praticien Hospitalier, Université de Grenoble, Invité



Rôle de la huntingtine dans le muscle

Brice POREAU

Créer, c'est aussi donner une forme à son destin

Albert Camus

Remerciements

Je remercie tout d'abord le Professeur Alain Buisson pour avoir accepté d'être président de mon jury de thèse.

Je remercie le Pr Alexandra Dürr et le Dr Vincent Jacquemond pour avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteurs.

Je remercie le Dr Christophe Lamaze pour avoir accepté d'être membre examinateur de mon jury.

Je remercie le Professeur Frédéric Saudou pour avoir accepté que je puisse traiter ce sujet très original et pour son soutien tout au long de ces trois années de thèse.

Je remercie le Dr Julien Fauré, non seulement pour m'avoir encadré pendant la thèse, mais aussi pour tout ce que j'ai pu apprendre tant en recherche qu'au niveau hospitalier.

Je remercie tout particulièrement le Dr Isabelle Marty. Encadrer un *thésard* déjà titulaire de deux doctorats, voire plus, n'est certainement pas chose aisée. Merci de cette chance que tu m'as donnée. Cette expérience et cette formation obtenues au cours de ces années sont uniques et fondamentales pour moi. Merci pour ta bienveillance et ton humanisme. Parce que la recherche, comme la médecine, est avant tout faite par des femmes et des hommes, sans qui rien n'aurait de sens. Et c'est bien ce sens, le *Sein* d'Heidegger, que j'ai retrouvé durant ces années.

Merci à toute l'équipe d'Isabelle. Travailler dans ces conditions fut un réel plaisir et a été clairement un facteur permettant d'aller au bout.

Merci à tous les anciens doctorants et docteurs, et les nouveaux.

Tout d'abord, merci beaucoup Muriel pour les discussions que nous avons eues. Te voilà nouvellement docteur, et de nouvelles pages à écrire. Tu restes un exemple de jeune chercheur compétente et motivée. J'espère que nos chemins se croiseront à nouveau.

Alexis, ah ! Alexis, mon camarade de bureau pendant deux ans. Te voilà donc en post-doc dans le beau pays des caribous. Etre à ton contact a été très motivant dans cette expérience de recherche comme dans la vie extra-laboratoire. Je te souhaite le meilleur. A bientôt, peut-être...

Perrine, nouvelle camarade de bureau. Merci beaucoup pour ton soutien cette dernière année. Il me fut indispensable. Je te souhaite le meilleur dans ta vie professionnelle comme personnelle.

Merci Caroline, je te souhaite également le meilleur dans ta vie professionnelle comme personnelle. Concilier hôpital et recherche est difficile, mais vraiment bénéfique.

Merci Diane pour ton aide technique et ton soutien. J'espère que nous réussirons à poursuivre de nombreuses collaborations tant à l'hôpital qu'en recherche.

Merci à tous les autres membres de l'équipe, les titulaires !!!

Merci Julie. Tu es notre guide et notre soutien moral. Je te souhaite le meilleur pour la suite.

Merci Anne pour ton aide et ton soutien moral. Les michoko sont la clé du succès.

Merci Laurent pour ton aide technique, et ton immense soutien culinaire.

Merci Nathalie et John pour votre aide et votre soutien.

Merci Klaus pour ton aide et ton soutien depuis le début de mon parcours de médecin spécialiste et de chercheur. J'espère que notre collaboration se poursuivra encore quelques décennies.

Merci au Dr Sandrine Humbert pour son expertise, son aide et son soutien.

Je remercie également tous les membres des équipes de Sandrine et Frédéric pour leur aide technique.

Je remercie les membres des plateformes techniques notamment du PIC-GIN. Une pensée toute particulière à Didier.

Je remercie les chercheurs de l'Institut des Neurosciences qui m'ont aidé techniquement notamment dans la mise en place des modèles animaux.

Je remercie les Neurodocs, pour la bonne ambiance lors des manifestations que nous avons organisées.

Je remercie aussi les membres des services hospitaliers de génétique clinique, génétique chromosomique, génétique moléculaire et de fœtopathologie, en particulier le Professeur Pierre-Simon Jouk, le Dr Florence Amblard, le Dr Julien Fauré et le Dr Hervé Sartelet, pour leur soutien dans mon parcours de médecin généticien et de chercheur.

Enfin, rien n'aurait de sens sans ma famille. Merci à tous, famille, amis, pour votre soutien.

A Marine,

A Albane,

A Gabrielle...

ma vie

Résumé

La maladie de Huntington (MH) est une pathologie génétique multisystémique neurodégénérative rare caractérisée par des atteintes motrices, cognitives et psychiatriques. Elle est due à une augmentation de la répétition de triplet CAG dans l'exon 1 du gène *HTT*, dont la taille normale est de 6 à 35 répétitions. Cette expansion de triplets conduit à la présence d'une répétition de glutamine de taille anormale dans l'extrémité N-terminale de la protéine huntingtine (HTT). Les conséquences de la mutation sont d'une part la diminution de l'expression de la protéine non mutée et d'autre part l'expression d'une protéine mutée. L'une des fonctions de la HTT est le transport intracellulaire de vésicules le long des microtubules dans les neurones. Par ailleurs, une pathologie similaire appelée « Huntington disease like 2 » est due à une perte de fonction de la junctophilin-3 ayant pour rôle l'établissement de points de contact entre la membrane plasmique et le reticulum endoplasmique au niveau neuronal. Les présents travaux visent à découvrir les mécanismes au sein desquels la HTT est impliquée dans un modèle différent de la cellule neuronale : la cellule musculaire. En effet, les points de contact nommés triades sont le cœur du couplage excitation-contraction. Les travaux ont permis de montrer, après avoir créé des modèles cellulaires et animaux avec baisse d'expression de la protéine, un défaut de la fonction musculaire au niveau cellulaire comme au niveau physiologique. Les relâchements calciques sont altérés. La force est diminuée. De plus, ces altérations de fonctionnement sont corrélées à une baisse d'expression des principaux récepteurs de la triade. Enfin, une fraction exogène de la partie N-terminale de la protéine non mutée restaure les défauts calciques observés. La huntingtine a donc un rôle prépondérant dans la fonction princeps du muscle : la contraction.

Abstract

Huntington Disease (HD) is a rare multisystemic neurodegenerative genetic disorder, which combines psychiatric, cognitive and motor alterations. It is caused by an increase in CAG repeats in the huntingtin gene, resulting in an expansion of polyglutamine stretch in the protein. This induces a loss of the huntingtin protein (HTT) normal function associated with production of a mutant protein. HTT is an ubiquitous microtubules associated protein, with numerous functions among which vesicles and organelles traffic along microtubules. Along this line, one of its functions could be the traffic of reticulum vesicles to form contact point with the plasma membrane in neurons. Moreover, a phenocopy named “Huntington’s disease like 2” is due to junctophilin-3 loss of function. Junctophilin 3 is involved in the establishment of contact points between endoplasmic reticulum and plasma membrane in neurons. These studies are dedicated to the validation of the hypothesis of the role of HTT in contact points between endoplasmic reticulum and plasma membrane in another model, in which contacts between reticulum and plasma membrane are of major importance: the skeletal muscle cell. Indeed, the contact points between sarcoplasmic reticulum and plasma membrane (T-Tubule), called the triads, are the basis of excitation-contraction coupling in muscle. In these studies, we developed cellular and animals models with a loss of expression of HTT in skeletal muscle specifically. Theses studies show that calcium release is altered at the cellular level and muscle force is altered at animal model level. Theses alterations are correlated with loss of expression of the main receptors of the triad. Finally, fragment of the normal protein can restore calcium defects. Theses studies emphasize the role of huntingtin in skeletal muscle.

Abréviations

Ac : anticorps	MetOH : méthanol
ADN : DNA : acide désoxyribonucléique	MH : maladie de Huntington
ADP : adenosine diphosphate	MOI : multiplicity of infection
ARN : RNA : acide ribonucléique	MTs : MT : microtubules
APP : amyloid precursor protein	min : minute(s)
ATP : adenosine triphosphate	N : newton
BDNF : brain derived neurotrophic factor	NADH : nicotinamide adénine dinucléotide
Ca²⁺ : calcium	PBS : phosphate buffer saline
CaCl₂ : chlorure de calcium	PBSTw : PBS 0.1% Tween20
CHAPS : 3-[(3-Cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propanesulfonate	PCR : réaction en chaîne par polymérase
CmC : 4-chloro-m cresol	pH : potentiel hydrométrique
Couplage-EC : couplage excitation-contraction	Pi : phosphate inorganique
CRC : complexe de relâchement du calcium	PS : pénicilline-streptomycine
Cter : C-terminal	RE : reticulum endoplasmique
Ctrl : contrôle	ROI : region of interest
DHPR : récepteur des dihydropyridines	Rs : coefficient de corrélation de Spearman
DMSO : diméthylsulfoxyde	RS : reticulum sarcoplasmique
DMEM : dulbecco's modified eagle medium	RT : température ambiante
EDTA : acide éthylène diamine tétracétique	RyR11 : isoforme squelettique du récepteur de la ryanodine
EDL : extensor digitorum longus	SERCA : sarco endoplasmic reticulum calcium ATPase
FDB : flexor digitorum brevis	SDS : sodium dodécyl sulfate
GAPDH : glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	SDS PAGE : électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS
GFP : protéine fluorescente verte	s.e.m : standard error of the mean
HRP : horseradish peroxydase	SNC : système nerveux central
HDL 2 : Huntington's disease like 2	siRNA : small interfering RNA
IF : immunofluorescence	SOCE : store operated calcium channel
IRM : imagerie par résonance magnétique	tampon RIPA : radio immuno precipitation assay buffer
jNM : jonction neuromusculaire	TA : tibialis anterior
kDa : kilo Dalton	Tubules-T : tubules transverses
KO : knocked-out	UHDRS : unified Huntington's disease rating scale
	U.I : unité infectieuse
	VICR : voltage induced calcium release
	WB : Western blot
	WT : wild type

Table des matières

<i>Introduction</i>	p. 19
<i>Chapitre I : La maladie de Huntington : une pathologie multi-systémique</i>	p. 20
1.1 La maladie de Huntington : une histoire	p. 20
1.2 Une maladie rare	p. 23
1.3 La maladie de Huntington : approche clinique	p. 24
1.4 Etudes anatomiques et d'imagerie	p. 26
1.5 Management de la maladie de Huntington	p. 29
1.6 Les signes extra-SNC	p. 30
<i>Chapitre II : Comprendre la maladie de Huntington : le rôle de la huntingtine</i>	p. 32
2.1 Aspects moléculaires de la maladie de Huntington et corrélation génotype-phénotype	p. 32
2.2 La Huntingtine : une protéine	p. 34
2.3 Les modèles murins transgéniques de la MH	p. 35
2.4 La protéine mutée	p. 38
2.5 La protéine non mutée	p. 43
2.6 La maladie de Huntington-like 2	p. 51
<i>Chapitre III : Le muscle : structure et fonction</i>	p. 53
3.1 Le muscle : un tissu primordial	p. 53
3.2 Structure du muscle	p. 55
3.3 Types de fibres	p. 58
3.4 Du système nerveux central au muscle	p. 59
3.5 Couplage excitation contraction	p. 61
3.6 La triade	p. 62
3.7 Les protéines de la triade	p. 63

3.8 La contraction	p. 70
3.9 Cellules satellites, prolifération, différenciation et régénération	p. 72
3.10 Le trafic musculaire intracellulaire	p. 75
<i>Chapitre IV : Les signes musculaires de la maladie de Huntington</i>	p. 78
4.1 Des anomalies multiples et sévères	p. 78
4.2 Baisse de force et atrophie musculaire	p. 79
4.3 Anomalies du relâchement calcique	p. 81
4.4 Anomalies mitochondriales	p. 83
4.5 Dérégulation transcriptionnelle	p. 84
4.6 Dégénérescence cellulaire	p. 85
4.7 Défauts de la jonction neuromusculaire	p. 86
<i>Objectifs de thèse</i>	p. 88
<i>Matériels et méthodes</i>	p. 91
<i>Chapitre I : Les cellules</i>	p. 92
1.1 Culture primaire de cellules satellites	p. 92
1.2 Myotubes humains immortalisés	p. 92
1.3 Fibres musculaires murines dissociées	p. 93
1.4 Cellules HEK	p. 93
<i>Chapitre II : Biochimie</i>	p. 94
2.1 Lysats cellulaires	p. 94
2.2 Homogénats de muscle et d'encéphale	p. 94
2.3 Dosage des protéines par la méthode de Folin Lowry	p. 95
2.4 Western-blot	p. 95
<i>Chapitre III : Anticorps</i>	p. 96
3.1 Anticorps primaires	p. 96
3.2 Anticorps secondaires	p. 97

3.3 Marquage immunofluorescent	p. 97
<i>Chapitre IV : Les virus</i>	p. 98
4.1 Les adeno-associated virus	p. 98
4.2 Les adénovirus	p. 98
4.3 Les lentivirus	p. 99
<i>Chapitre V : Imagerie</i>	p. 102
5.1 Imagerie confocale avec cellules vivantes	p. 102
5.2 Etude du trafic avec cellules vivantes	p. 102
<i>Chapitre VI : modèles animaux</i>	p. 104
6.1 Modèle murin avec extinction de la huntingtine dans le muscle	p. 104
6.2 Modèle murin Q140	p. 106
<i>Résultats et discussion</i>	p. 107
<i>Chapitre I : La huntingtine s'exprime dans le muscle</i>	p. 108
1.1 Expression de la huntingtine dans des homogénats de muscle	p. 108
1.3 Expression de la huntingtine dans des homogénats de muscles différents	p. 110
1.4 Expression de la huntingtine au cours de la différenciation des myotubes	p. 111
1.5 Localisation de la huntingtine	p. 112
1.6 Discussion	p. 113
<i>Chapitre II : sans huntingtine, les cellules musculaires sont altérées</i>	p. 115
2.1 Modèle murin de myotubes avec forte diminution de l'expression de la huntingtine	p. 115
2.2 Modèle de myotubes humains avec forte diminution de l'expression de la HTT	p. 117
2.3 Modèle murin de myotubes avec forte diminution de l'expression de la huntingtine (HTT fl/fl et adénovirus Cre)	p. 120
2.4 Imagerie calcique sur les cellules du modèle murin Q140 de la MH	p. 123
2.5 Expression du récepteur de la ryanodine avec forte baisse de l'expression de la HTT	p. 125
2.6 Discussion	p. 126

<i>Chapitre III : sans huntingtine, le muscle est altéré</i>	p. 130
3.1 Création d'une lignée avec baisse d'expression de la HTT	p. 130
3.2 Analyse de force et du poids	p. 131
3.3 Analyse histologique	p. 134
3.4 Protéine de la triade dans les modèles murins in vivo	p. 137
3.5 Discussion	p. 139
<i>IV : Perspectives</i>	p. 142
4.1 Expression d'un fragment N-terminal de la huntingtine dans le muscle	p. 143
4.2 Expression d'un fragment C-terminal de la huntingtine dans le muscle	p. 145
4.3 Rôle de la huntingtine dans le trafic d'une protéine de la triade : la triadine	p. 146
4.4 Discussion	p. 147
<i>Conclusion générale</i>	p. 149
<i>Bibliographie</i>	p. 153
<i>Annexe</i>	p. 185

Introduction

Chapitre I : la maladie de Huntington : une pathologie multi-systémique

1.1 La maladie de Huntington : une histoire

C'est en 1872, dans une revue médicale américaine, *The Medical and Surgical Reporter* que George Huntington (1850-1916), médecin alors âgé de 22 ans (Figure 1), publie une observation intitulée *On Chorea* (Wexler et al., 2016).

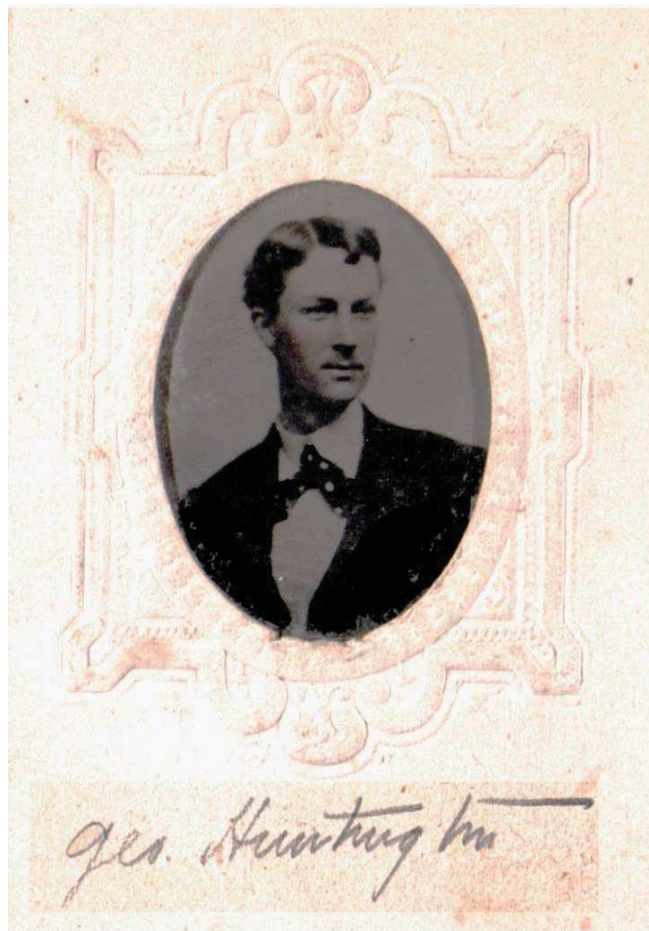


Figure 1 : George Huntington. Extrait de Wexler et al., 2016.

Il décrit ainsi une forme de chorée qui a trois particularités. Les chorées sont des mouvements involontaires et sont décrites depuis des siècles. Au Moyen-Age, elles sont considérées comme une hérésie (Babonneix, 1925 ; Grandmougin et al., 1997 ; Martin, 1923). Cependant,

Huntington va apporter une description précise du cas familial qu'il rapporte. Tout d'abord, cette chorée est héréditaire : il retrouve une sémiologie identique au sein de deux générations. Or, les chorées précédemment décrites sont sporadiques, elles sont rarement observées au sein de la même famille (Grandmougin et al. ,1997). Ensuite, elle peut conduire au suicide, ce qui est également un élément marquant, les patients atteints d'autres formes de chorée n'allant pas jusqu'à cette extrémité. Enfin, les signes cliniques permettant de diagnostiquer précisément la pathologie apparaissent systématiquement à l'âge adulte alors même que rien ne s'est déclaré dans l'enfance (Huntington, 1872). La chorée, associée à ces trois points, apparition tardive des signes cliniques, suicide, caractère héréditaire, singularise, pour Huntington, cette forme de chorée. Le caractère héréditaire, s'il est relevé, n'est cependant pas aussi évident pour l'époque. En effet, la biologie expérimentale n'en est qu'à ses balbutiements (Poreau, 2016a). Il faut attendre la fin du dix-neuvième siècle et le début du vingtième siècle afin de voir émerger les différents caractères de transmission (Pichot, 1999). Si des analyses rétrospectives de cas montrent qu'il ne s'agit pas néanmoins de la première famille décrite avec ce type de chorée, (Orberck, 1959 ; Lanska, 2000), Huntington va expliciter clairement ses arguments. Il veut montrer qu'il s'agit d'une nouvelle nosologie : une catégorie à part de chorée. Tous les praticiens n'ont pas admis immédiatement l'existence de cette entité à part. Jean-Martin Charcot (1825-1893), l'un des neurologues les plus renommés de son temps, donne quelques observations complètes lors de ses cours du mardi de la Salpêtrière. Il se refuse néanmoins à considérer la chorée de Huntington comme une entité à part entière, notamment du fait de sa caractéristique d'apparition tardive de la symptomatologie. Il décrit néanmoins dans l'exemple ci-dessous (figure 2) une famille avec atteinte de plusieurs générations. Il y a un doute concernant les parents, ils sont décédés précocement sans pour autant qu'une clinique spécifique ait été décrite. La symptomatologie associe chorée (mouvements involontaires), mais aussi atteintes psychiatriques, et potentiellement mort précoce (notamment chez les parents, dont la causes de décès n'est pas connue mais est prématurée).

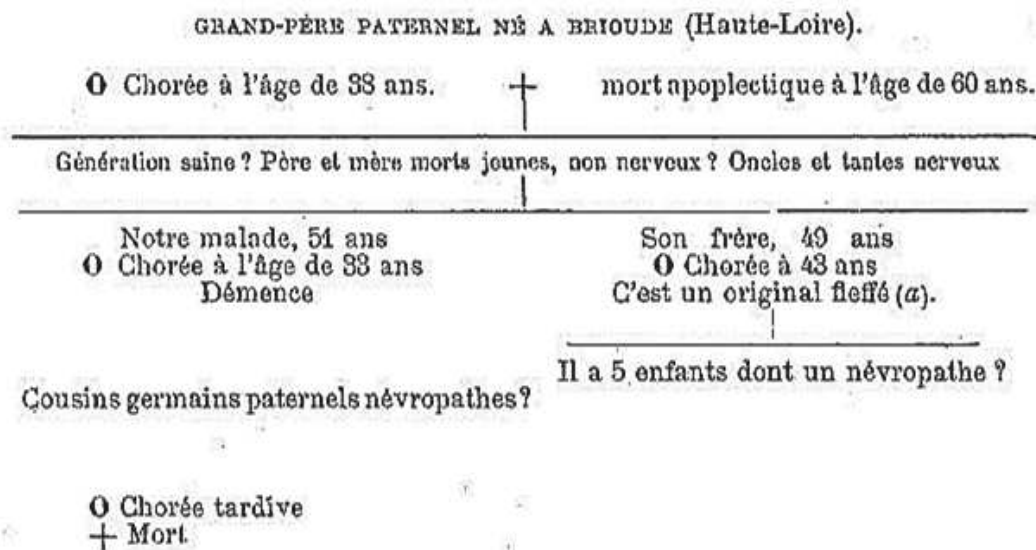


Figure 2 : exemple de famille avec chorée, description historique du dix-neuvième siècle. Arbre généalogique adapté de Charcot, 1887.

Charcot la considère alors dans le grand groupe de la forme dite « vulgaire », c'est-à-dire commune, n'ayant pas nécessairement une étiologie qui lui est propre (Charcot, 1887). Au début du vingtième siècle, le caractère génétique et de transmission autosomique dominant de la maladie de Huntington (MH) est une hypothèse prégnante par les observations, corrélées de plus à une analyse morphologique de l'encéphale présentant une atrophie striatale (Alzheimer, 1911 ; Davenport & Muncey, 1916). Julia Bell (1879-1979), généticienne britannique, confirme le mode héréditaire autosomique dominant de la maladie de Huntington dans les familles qu'elle suit (Bell, 1934). Elle mentionne la possibilité de conseil génétique dans le cadre de familles prédisposées à cette pathologie. Durant les années 1960 et 1970, la clinique, l'anatomopathologie et la génétique sont précisées. Des traitements, en particulier antichoréiques, sont testés sans toutefois faire preuve d'efficacité (Heathfield, 1973). Durant les années 1980 puis 1990, les avancées étiologiques sont considérables. Des travaux sont menés afin de comprendre également les mécanismes en jeu. En parallèle, les études phénotypiques sont élargies à l'ensemble des organes, montrant ainsi le caractère systémique de la MH. La maladie de Huntington est actuellement caractérisée comme une maladie rare autosomique dominante neurodégénérative, multisystémique et incurable (Roos, 2010). L'étiologie moléculaire est découverte en 1993 : il s'agit d'une répétition anormale de triplets CAG au niveau du gène de la huntingtine (*HTT*) (Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993).

L'histoire de la MH est singulière. Cette histoire, qui a près de 150 ans, est probablement un facteur explicatif du fait du nombre important d'études menées sur cette maladie rare.

En effet, cette maladie est tout d'abord une maladie rare, nous allons voir ce point plus en détail.

1.2 Une maladie rare

Une maladie est définie comme rare si moins d'une personne sur 2000 est atteinte (Orphanet). La prévalence estimée de la MH est entre 1/10 000 et 1/20 000 (Roos, 2010). La MH est présente sur tous les continents (Heathfield, 1973). Cependant, les études relatives à la prévalence montrent des disparités selon les régions (Evans et al., 2013 ; Hayden et al, 1980 ; Hoppit et al., 2011 ; Lekoubou et al., 2014 ; Pringheim et al., 2012 ; Rawlins et al., 2016). Par exemple, selon une méta-analyse, en Asie, la prévalence est estimée à 0,42 pour 1 000 000 alors qu'elle est de 9,71 pour 100 000 personnes lorsque sont prises en compte les études en Australie, en Europe de l'Ouest au Royaume-Uni et en Amérique du nord (Rawlins et al., 2016). La prévalence est également très faible en Afrique. Seuls 19 cas ont été recensés dans une étude bibliométrique récente (Lekoubou et al., 2014). Les publications de ces cas proviennent d'études d'Afrique du Sud et avant l'Apartheid (Haydn et al., 1980). Les méthodologies employées d'une part et les résultats disponibles d'autre part montrent que de nouvelles études de prévalence sont nécessaires en Afrique. En effet, les pays africains, comme nombre de pays d'Asie n'ont pas de registres précis comme il en existe au Royaume – Uni par exemple, il y a donc un réel manque d'informations. De nouvelles études montrent cependant que la prévalence s'approcherait de celle de l'Europe de l'Ouest (Baine et al., 2016), les maladies neurodégénératives restant un sujet prégnant en Afrique (Lekoubou et al., 2014 ; Poreau, 2016b).

La MH est donc une maladie rare, dont la prévalence permet d'estimer le nombre de patients en France entre 3250 et 6000 et entre 20 000 et 40 000 personnes en Europe de l'Ouest.

Ces estimations montrent la nécessité d'avancer sur le diagnostic de la MH dans l'ensemble des pays. Pour cela, il faut donc détecter les signes cliniques pour permettre le diagnostic.

1.3 La maladie de Huntington : approche clinique

Afin de préciser les enjeux d'une telle pathologie, il est nécessaire de revoir quels sont les signes cliniques. Initialement, c'est une triade clinique qui est décrite : la maladie de Huntington associe des troubles moteurs, des troubles psychiatriques et des troubles cognitifs (Roos, 2010).

Les troubles moteurs concernent à la fois les mouvements volontaires et la présence de mouvements involontaires : la chorée, caractéristique de la pathologie (Warby et al., [2014]). Les mouvements involontaires sont des mouvements non répétitifs, non périodiques, qui n'ont pas de patterns précis et affectent les membres, la face ou encore le tronc. Ces mouvements sont présents uniquement à l'état d'éveil. Le patient ne peut stopper ces mouvements. De plus, la fréquence de ces mouvements est amplifiée par différents facteurs dont le stress. Plus de 90% des patients atteints de la maladie de Huntington ont ce symptôme. Peu d'études ont été développées pour caractériser et différencier les mouvements involontaires des patients atteints de la maladie de Huntington, de ceux des patients atteints d'autres formes de chorée. Au niveau de la face par exemple, il apparaît difficile de différencier les mouvements par rapport aux blépharospasmes, dyskinésies tardives ou encore les spasmes hémifaciaux (Fekete et al., 2014 ; Jankovic et al., 2009 ; Yalho et al., 2011).

Associés à ces mouvements involontaires, les patients développent également des difficultés à initier les mouvements (dyskinésie : hypokinésie ou akinésie), et une rigidité amenant à une lenteur des mouvements (bradykinésie) (Roos, 2010 ; Van Vugt et al., 2004). Une dystonie est également décrite : un trouble du tonus musculaire.

Les mouvements volontaires sont également atteints chez les patients qui décrivent des maladresses répétées dans la vie quotidienne. Le contrôle des mouvements fins est affecté, comme l'écriture par exemple. La démarche est également affectée.

Des troubles oculomoteurs sont également présents et sont majorés avec le temps (Blekher et al., 2004 ; Blekher et al., 2006 ; Golding et al., 2006 ; Hicks et al., 2008 ; Miranda et al., 2016). Par ailleurs, la dysarthrie est fréquente. La dysphagie est présente dans les derniers stades de la maladie (Roos, 2010 ; Warby et al., [2014]).

Aux troubles moteurs, s'ajoute une atteinte cognitive pouvant aller jusqu'à la démence (Dumas et al., 2013 ; Hoth et al., 2010 ; Larsen et al., 2016 ; Nehl et al., 2004 ; Paulsen, 2011). Les atteintes cognitives apparaissent plus précocement que les troubles moteurs (Eddy et al., 2015 ; Unmack Larsen et al., 2015). Les premières manifestations concernent les

fonctions exécutives : en particulier l'attention, la planification (Thompson et al., 2010) et la mémoire (Montoya et al., 2006a). Il devient difficile pour les patients d'effectuer des tâches complexes. Il devient également difficile d'effectuer plusieurs tâches en même temps. Plus précisément, la notion du temps n'est plus adaptée (Rowe et al., 2010). Par ailleurs, la vitesse de traitement des données est allongée (Stout et al., 2011). Un autre type d'atteinte cognitive concerne la reconnaissance des affects : les patients vont avoir de plus en plus de mal à reconnaître les émotions des personnes avec qui ils communiquent, et plus spécifiquement le dégoût et la colère (Calder et al., 2010). Enfin, la communication devient également difficile (Hartelius et al., 2010 ; Solomon et al., 2007) : en effet, la communication verbale demande alors une attention accrue et une concentration plus importante pour les patients, ce qui les handicape.

Le troisième type d'atteinte concerne les atteintes psychiatriques. La dépression, l'irritabilité, les troubles obsessionnels compulsifs et l'apathie sont plus importants dans les cohortes de patients atteints de la maladie de Huntington que dans la population générale (Baudic et al., 2006 ; Paulsen et al., 2005 ; Tabrizi et al., 2013 ; van Duin et al., 2007 ; van Duin et al., 2014). L'idéation suicidaire est également élevée : 9.9 % des patients porteurs de MH ont une idéation suicidaire dans une cohorte européenne (Hubers et al., 2013). Le risque de suicide est augmenté par rapport à la population générale, même s'il n'est pas la première cause de mortalité des patients atteints de MH (Sorensen et al., 1992).

Les troubles moteurs, cognitifs et psychiatriques permettent ainsi de réaliser le diagnostic clinique de la maladie de Huntington. A cet effet, une échelle comprenant les éléments cliniques a été élaborée à la fin des années 1990 et permet de sélectionner les items présents chez le patient : unified HD rating scale (UHDRS, 1996). Cette échelle comprend un item de troubles moteurs, réparti en sous-items comprenant notamment la poursuite oculaire, la dystonie, la démarche, la pronation, la supination, la rétropulsion ; un item sur le comportement ; des items sur la vie quotidienne. Nous voyons lors de cette première description clinique, que la triade se focalise sur l'aspect neurologique. Les études anatomiques et des études en imagerie sont venues compléter l'aspect clinique neurologique.

1.4 Etudes anatomiques et d'imagerie

La triade clinique précédemment décrite est à mettre en lien avec les aspects neuroanatomiques : d'une part la neuropathologie et d'autre part les résultats obtenus avec les techniques d'imagerie.

Les premières études de neuropathologie sur des encéphales de patients décédés ont montré une atrophie cérébrale et plus particulier une atrophie striatale. Cette zone est donc à mettre en lien avec la chorée et les autres atteintes décrites, notamment cognitives (Montoya et al., 2006b) et psychiatriques. Le striatum est un ganglion de la base composé notamment du putamen et du noyau caudé (Figure 3A).

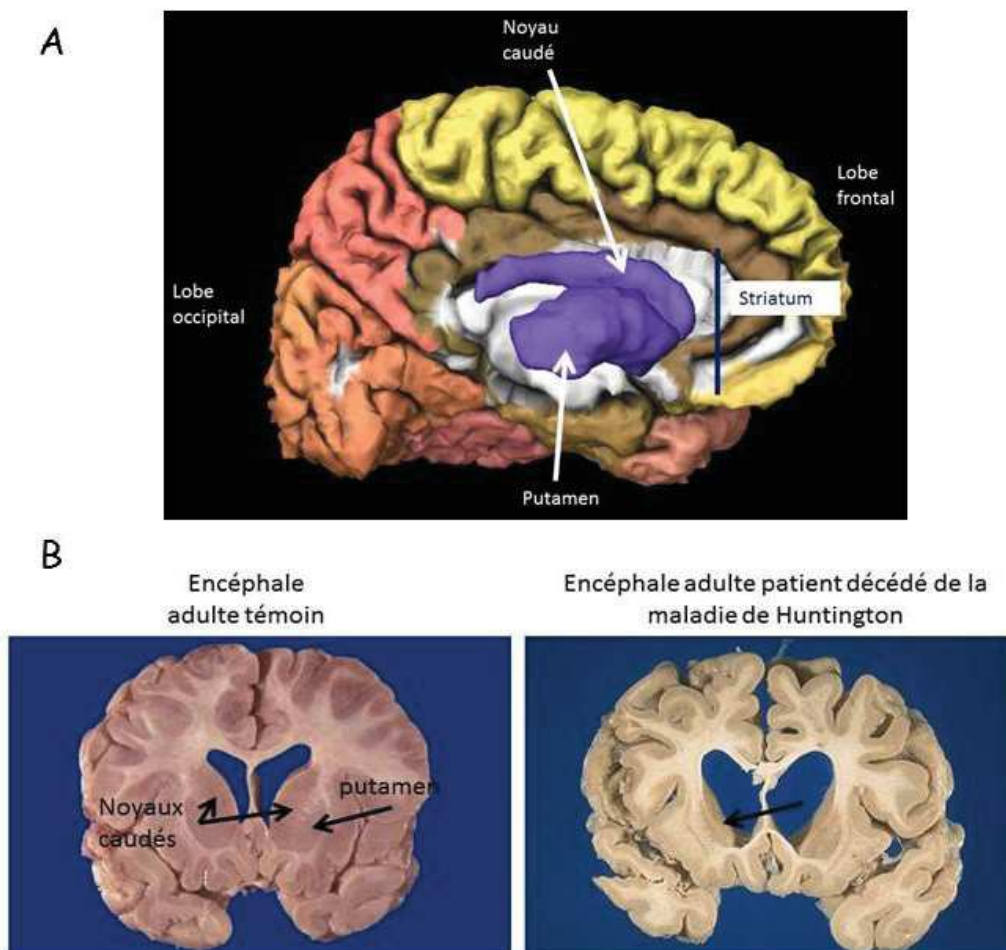


Figure 3 : A : Vue sagittale en 3D de l'hémisphère gauche de l'encéphale et de la partie droite du striatum composée du noyau caudé et du putamen. Figure réalisée avec Allen Humain Brain Atlas.

B : coupes axiales d'encéphales. A gauche, coupe de témoin avec noyaux caudés et putamen de taille adulte. A droite, encéphale de patient décédé de la maladie de Huntington. L'atrophie du striatum est majeure. Figure réalisée avec les données du site [HTTP://library.med.utah.edu/WebPath](http://library.med.utah.edu/WebPath).

La Figure 3B montre l'atrophie majeure observée chez un patient décédé de la MH.

L'analyse anatomopathologique montre également une atrophie de la totalité de l'encéphale. De plus, il est observé un élargissement marqué des espaces péri-cérébraux, les ventricules latéraux apparaissent dilatés, la substance grise apparaît proportionnellement moins importante (Figure 3B).

La neuro-imagerie est également un outil de choix dans l'analyse de la clinique des patients atteints de la maladie de Huntington, qu'ils développent des manifestations ou non. Ainsi, l'imagerie par résonance magnétique (IRM) peut par exemple explorer les structures cérébrales ou étudier les fonctions (IRM fonctionnelle, IRMf). Le premier point a permis de corréler les études anatomopathologiques effectuées sur des pièces d'autopsie de patients décédés de la maladie de Huntington (Figures 4 et 5). Les études d'imagerie fonctionnelle permettent tout d'abord de comparer in vivo l'atrophie observée dans les études post-mortem. Elles permettent ensuite de prendre en compte les changements lors de tâches effectuées par le patient, et donc d'évaluer le retentissement fonctionnel de la pathologie.

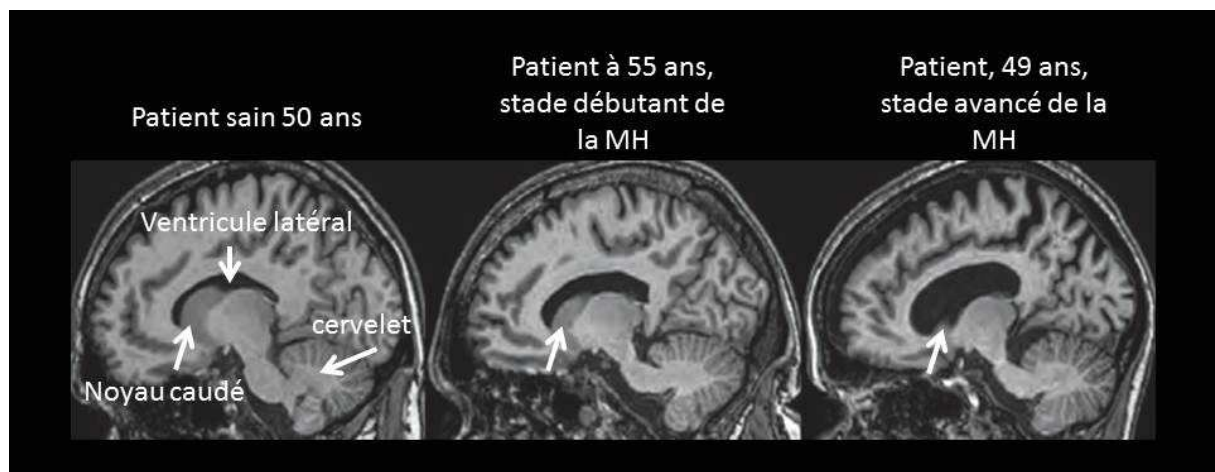


Figure 4 : coupe sagittale d'IRM, séquence T1. A gauche, témoin, homme de 50 ans, sain. A noter les structures présentes : le noyau caudé (l'un des composants du striatum), le ventricule latéral et le cervelet ; au centre, patient au stade débutant de la maladie, homme âgé de 55 ans. A droite, homme de 49 ans avec manifestations importantes de la maladie de Huntington. La flèche blanche montre l'emplacement du noyau caudé au centre et à droite. En sus de la sévère atrophie du noyau caudé, l'ensemble du volume est diminué chez le patient à un stade avancé de la maladie : les espaces péri-cérébraux sont beaucoup plus visibles. Adapté de (Tabrizi et al., 2009)

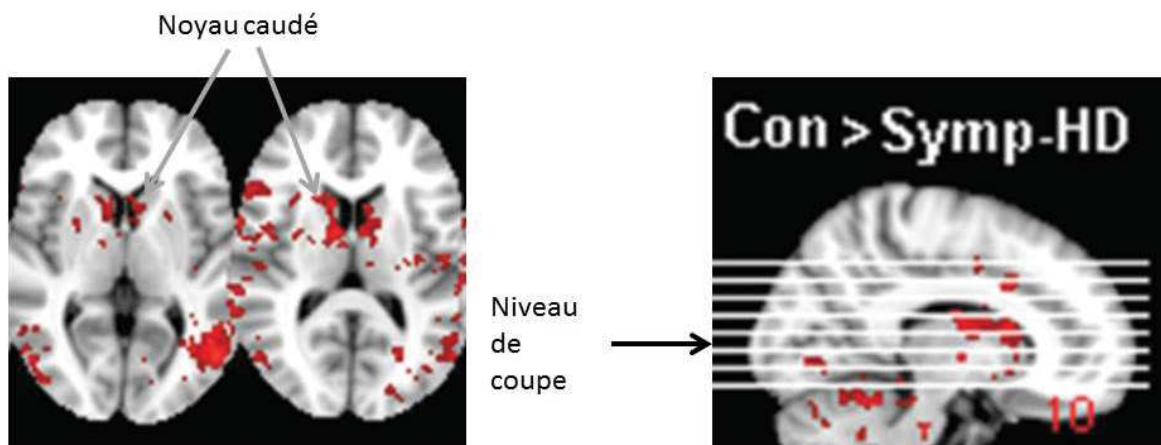


Figure 5 : coupes axiales en IRMf. Il s'agit de la soustraction d'une analyse d'activation (BOLD) suite à un exercice de mémorisation entre des témoins et un groupe de patients atteints de maladie de Huntington avec manifestations cliniques. A gauche, deux coupes axiales avec présence de voxels rouges au niveau notamment du noyau caudé : il s'agit de zones activées lors de l'exercice chez les témoins mais qui ne le sont plus chez les patients. A droite, il s'agit d'une coupe transversale afin de montrer le niveau des deux précédentes coupes. Illustration adaptée de (Georgiou-Karistianis et al., 2014).

Certaines zones apparaissent beaucoup moins activées lors de tâches répétitives simples : le noyau caudé au niveau du striatum, mais également les lobes temporaux (figure 6). La corrélation anatomique et fonctionnelle est réalisable *in vivo*. Elle montre que le striatum est le siège de défauts, ce qui est en accord avec les précédentes études anatomiques post-mortem et *in vivo*. Elle montre également l'implication d'autres zones de l'encéphale. Ces analyses sont néanmoins complexes, les difficultés d'interprétation proviennent de l'hétérogénéité des cohortes d'une part et de la méthodologie analytique d'autre part. De plus, la résolution anatomique des études fonctionnelles est moindre que celle des études d'IRM non fonctionnelles.

Les investigations d'imagerie de la maladie de Huntington se poursuivent également par les analyses de tomographie à émission de positrons (TEP), réalisées avec différents traceurs. Ces études permettent ainsi une corrélation entre l'anatomie et différentes voies biologiques comme le système dopaminergique, le métabolisme et l'inflammation (Wilson et al., 2017).

Les premiers signes cliniques identifiés de la MH sont exclusivement liés au système nerveux central. Les études anatomopathologiques et d'imagerie ont donc été orientées selon cette caractérisation phénotypique. Cependant, la MH n'est pas exclusivement une maladie touchant le système nerveux central. En effet, la MH est une maladie multisystémique.

1.5 Management de la maladie de Huntington

Aucun traitement n'existe actuellement pour les patients atteints de la maladie de Huntington. Les patients décèdent de la pathologie. Auparavant, qu'ils développent ou non des manifestations cliniques, le fait d'être porteur de la mutation induit une discrimination sociale relevée dans plusieurs pays : que ce soit au niveau de l'emploi, de l'obtention de prêts ou encore des primes d'assurances, celles-ci étant primordiales dans certains pays n'ayant pas de régime de sécurité sociale (Billings et al., 1992 ; Bombard et al., 2009 ; Goh et al., 2013 ; Harper et al., 2004 ; Oster et al., 2008 ; Penziner et al., 2008) .

Les signes cliniques apparaissent à l'âge adulte, alors même que l'anomalie génétique est présente dès la conception. Aucune explication physiopathologique ne permet actuellement de comprendre pourquoi les signes cliniques apparaissent à l'âge adulte, entre 35 et 50 ans. Cette maladie est donc à ce jour incurable et elle est mortelle. La principale étiologie de mortalité est la pneumonie. Les défauts de déglutition répétés engendrent des infections pulmonaires qui deviennent difficiles puis impossibles à traiter. L'insuffisance cardiaque est également l'une des causes principales de décès (Hart et al., 2011 ; Heemskerk et al., 2012 ; Wendt et al., 1960 ; Edmonds, 1966 ; Haines et al., 1986, Lanska et al., 1988a ; Lanska et al., 1988b ; Sorensen et al., 1992 ; Nobrega et al., 2008 ; Marik et al., 2003 ; Mehanna et al., 2010). Le suicide est augmenté par rapport à la population générale, mais il ne s'agit pas de la cause principale de décès (Sorensen et al., 1992).

Le traitement est donc symptomatique (Roos, 2010). Il concerne les troubles moteurs et en particulier la chorée. Il concerne également la dépression.

1141 essais cliniques sont actuellement référencés (www.clinicaltrials.gov), dont 1018 essais ayant pour objectif de traiter une partie de la symptomatologie. Les essais cliniques ont pour objectif dans la majorité des cas de tester les drogues qui ont eu un effet sur les modèles animaux. Cependant, nombre d'études reviennent négatives, comme la publication très récente d'une étude de l'absence d'effet de la cystéamine, un agent anti-oxydant (Verny et al., 2017). Ainsi, comprendre les effets de la mutation génique est indispensable pour tenter une approche thérapeutique raisonnée.

1.6 Les signes extra SNC

Durant la dernière décennie, les signes et atteintes cliniques et biologiques ont été démontrés dans des organes différents du système nerveux central (Figure 6).

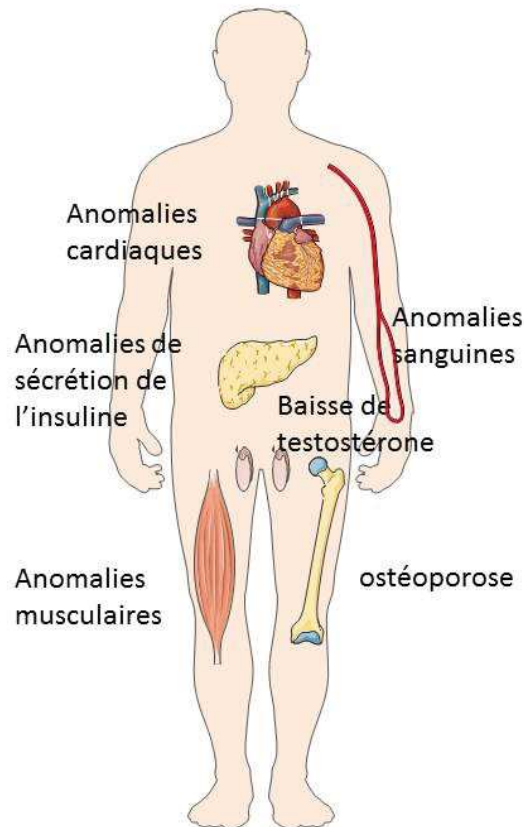


Figure 6 : Atteinte multisystémique de la maladie de Huntington. Ces atteintes ont été retrouvées chez l'homme : atteintes cardiaques, pancréatique (anomalie de sécrétion de l'insuline), ostéoporose, baisse de concentration de testostérone, et anomalies musculaires.

Les patients développent une insuffisance cardiaque, pouvant amener au décès. Ces atteintes sont également liées au système nerveux autonome (Andrich et al., 2002 ; Aziz et al., 2010 ; Bar et al., 2008; Kobal et al., 2010 ; Schroeder et al., 2016 ; Wood et al., 2012 ; Zielonka et al., 2014). Le mécanisme entre l'insuffisance cardiaque et la mutation n'est pas encore résolu. En effet, les études sur un modèle murin de la pathologie, exprimant la partie N-terminale (exon 1) avec une répétition importante de triplets (modèle murin R6/2) montrent une atrophie du myocarde, une altération de la forme des mitochondries et une altération fonctionnelle des cardiomyocytes (Mihm et al., 2007). Une dérégulation transcriptionnelle est aussi retrouvée

(Mielcarek et al., 2014a). Associée à l'insuffisance cardiaque, d'autres atteintes ont été retrouvées.

Il y a également une diminution de concentration de testostérone dans le plasma (Markianos et al., 2005 ; Van Raamsdonk et al., 2005).

Pour autant, cela n'affecte pas la fertilité des patients masculins (van der Burg et al., 2009). Une ostéoporose est par ailleurs potentiellement évoquée dans deux études (Bonelli et al., 2002 ; Otti et al., 2007). Toutefois, les résultats doivent être confirmés sur des cohortes plus importantes (van der Burg et al., 2009).

Au niveau des plaquettes, des lymphocytes et des polynucléaires neutrophiles, une concentration plus importante en récepteur A_{2A} a été retrouvée chez les patients atteints de MH (Varani et al., 2003 ; Varani et al., 2007). Des défauts pancréatiques sont aussi observés (Andreasson et al., 2002 ; Lalic et al., 2008). En effet, l'insuline est augmentée (résultat statistiquement significatif) dans une cohorte comprenant 29 patients. Au niveau hépatique, en condition de privation énergétique, une stéatose hépatique se développe dans un modèle murin de la pathologie : N171-87Q (modèle murin avec 171 premiers acides aminés de la huntingtine et 87 répétitions de triplets CAG) (Chaturvedi et al., 2010). Dans cette étude, sur ce modèle animal, il n'y a pas d'altération hépatique (histologie des hépatocytes) en condition basale.

Associées à ces atteintes multisystémiques observées chez l'homme et chez les modèles murins de la pathologie, des atteintes musculaires, importantes par les enjeux pour les patients d'une part, et importantes par les études menées d'autre part, sont également décrites. Nous verrons plus en détail les études qui ont été effectuées sur le muscle.

La MH est donc une pathologie multisystémique dont l'étiologie génique est connue depuis les années 1990. Quel est le gène en cause et quelles sont les conséquences au niveau protéique ?

Chapitre II : Comprendre la maladie de Huntington : le rôle de la huntingtine

2.1 Aspects moléculaires de la maladie de Huntington et corrélation génotype-phénotype

La maladie de Huntington est due à une mutation identifiée au début des années 1990, dans le gène de la huntingtine : il s'agit d'une répétition de triplets CAG au-delà de 35 (Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993). Cette mutation induit une pathologie autosomique dominante. Un seul allèle muté suffit pour que la personne soit atteinte de la maladie de Huntington. Cette anomalie moléculaire a cependant deux particularités importantes pour le conseil génétique d'une part et pour l'évolution et la sévérité de la pathologie chez un sujet porteur d'autre part. Concernant le premier point, cette anomalie génétique, répétition de triplets CAG, n'est pas stable. Ceci signifie qu'à chaque génération, il peut y avoir une augmentation du nombre de triplets, en particulier pour les sujets ayant un nombre proche de 35 répétitions. Il existe alors une zone dite de prémutation entre 27 et 35 répétitions (Warby et al., [2014]). Les sujets porteurs d'un nombre intermédiaire de répétitions (entre 27 et 35) n'ont pas de signes de la pathologie dans la très grande majorité des cas (Figure 7). Des modifications du comportement ont cependant été décrites (Apolinario et al., 2017) sans conséquences sur la qualité de vie ni sur la survie. Concernant la seconde particularité, le nombre de triplets est corrélé avec une sévérité et une apparition plus précoce de signes chez le patient. Plus le nombre de répétitions est important, plus la maladie est sévère : c'est-à-dire une précocité et une multiplicité des signes cliniques (Duyao et al., 1993). Cependant, il n'existe pas de corrélation absolue. Il n'est donc pas possible de prédire avec certitude l'âge à partir duquel les symptômes vont apparaître, ni la nature de la symptomatologie, même si le nombre exact de triplets est connu.

Ces deux particularités ont amené à des études nombreuses afin de détecter une symptomatologie plus précoce, certains signes apparaissant plus tôt au cours de la maladie, et pourraient donc être prédictifs d'une atteinte future.

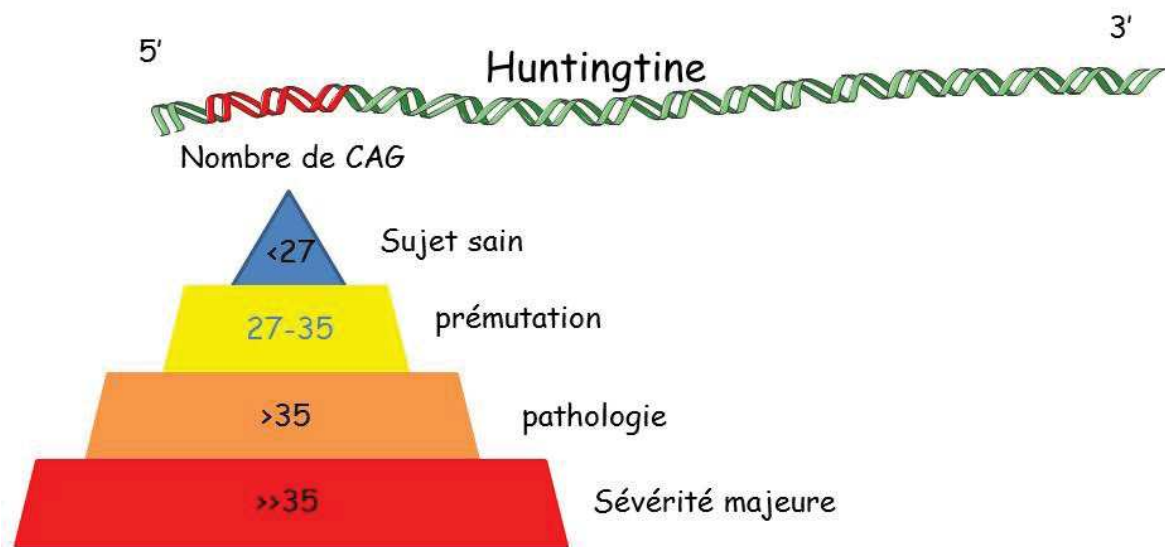


Figure 7 : L'étiologie moléculaire de la maladie de Huntington réside en une répétition anormalement élevée de triplets CAG. Il existe une zone de prémutation : le sujet ne sera pas atteint, mais les générations futures peuvent l'être. Par ailleurs, plus le nombre de triplets est important, plus la symptomatologie est précoce et sévère.

Pour chaque signe clinique étudié précédemment, la précocité et la sévérité sont corrélées au nombre de répétitions de triplets. Ainsi, une corrélation est établie entre le nombre de répétitions et la rapidité de perte de poids (Aziz et al., 2008). Du point de vue plus spécifique des atteintes musculaires, l'atrophie musculaire est plus sévère si le nombre de triplets CAG est plus important (Trejo et al., 2004). La corrélation est également retrouvée au niveau de la faiblesse musculaire dans l'étude de Busse et al. pour certains paramètres, l'extension et l'abduction de la hanche sont diminuées si le nombre de triplets CAG est plus important (coefficient r_s entre -0,62 et -0,74, Busse et al., 2008). Si la sévérité est corrélée au nombre de répétitions, l'âge d'apparition des symptômes également.

Il existe une forme dite juvénile de la MH (Duyao et al., 1993 ; Myers et al., 2004 ; Rasmussen et al., 2000), dont le nombre de répétitions de triplets est important (estimation de 60 répétitions, mais le nombre peut être inférieur (Ribaï et al., 2007)), et dont la symptomatologie apparaît beaucoup plus précocement (avant l'âge de 20 ans) (Myers et al., 2004 ; Rasmussen et al., 2000). Le nombre de cas est estimé entre 5 % et 10 % du nombre de patients atteints de MH (Duyao et al., 1993 ; Myers et al., 2004). Les signes plus précoces psychiatriques et cognitifs ont notamment pu retarder le délai de diagnostic, les troubles moteurs n'étant apparus qu'ultérieurement (Biglan et al. 2007 ; Ribaï et al., 2007). Les

troubles psychiatriques décrits sont notamment la dépression et l'anxiété, associés à des troubles du sommeil, des difficultés des performances académiques (Quigley, 2017).

Si un nombre élevé de répétitions de triplets CAG est corrélé à une précocité et une sévérité de la symptomatologie, la question de l'apparition des signes à l'âge adulte reste entière (Roos, 2010). En effet, il n'a pas, à ce jour, été découvert le ou les mécanismes permettant de comprendre cette apparition des signes à l'âge adulte. L'identification de signes précurseurs de la maladie, afin d'une part de permettre un diagnostic le plus précoce possible, et d'autre part, pour tenter de découvrir les mécanismes explicatifs en jeu est primordiale. L'étude PREDICT-HD a pour objectif de détecter les signes précoces de la maladie. Les études cliniques sont menées dans de nombreux pays depuis 2001 (Paulsen et al., 2008 ; Paulsen et al., 2014). Des études connexes (TRACK-HD et TRACK-On-HD) ont en plus l'objectif de déterminer des mesures fiables de paramètres qui peuvent ainsi être pris en compte dans les essais cliniques (Tabrizi et al., 2013). Il s'agit de savoir quel paramètre peut être amélioré lorsqu'un traitement est donné. Ainsi, différents signes cliniques pouvant être spécifiquement observés précèdent l'apparition des signes moteurs signant la MH. Les signes musculaires ne font, selon les études menées à ce jour, pas partie des signes précoces (van der Burg et al., 2009 ; Zielonka et al., 2014b).

2.2 La Huntingtine : une protéine

Comme la maladie de Huntington est autosomique dominante, au niveau protéique, deux conséquences apparaissent : la première est l'expression d'une protéine mutée, comprenant en particulier une répétition d'acide aminé glutamine (Q), ou chaîne polyQ, la seconde est une diminution de l'expression de la protéine non mutée, puisqu'un seul allèle est non muté (figure 8).

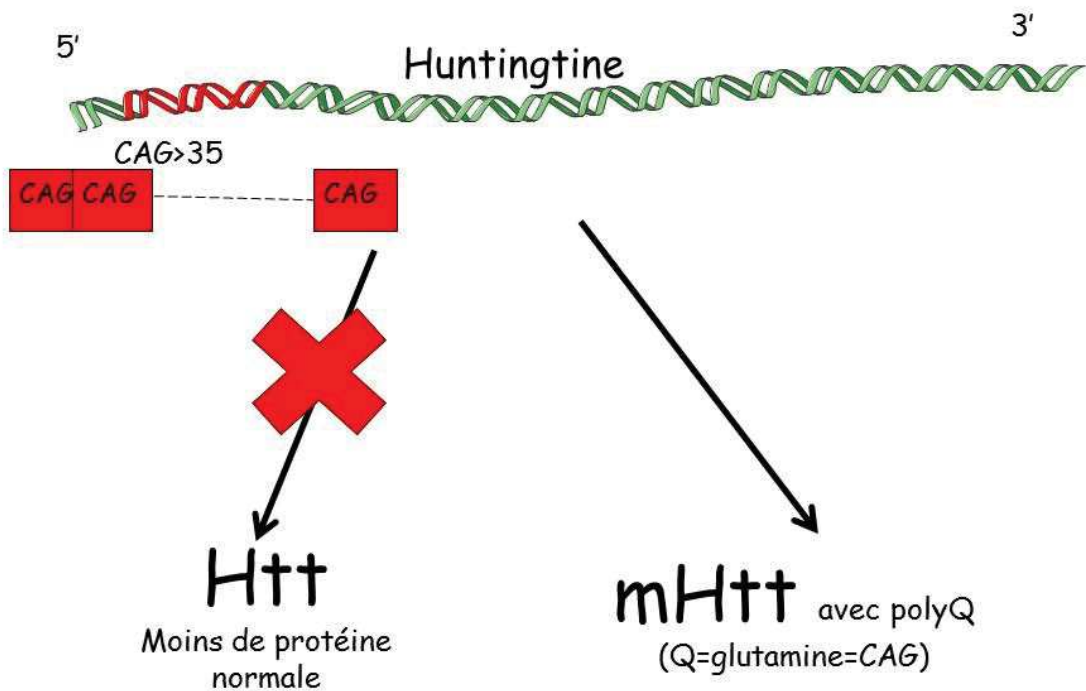


Figure 8 : Deux conséquences apparaissent suite à l'anomalie génique : d'une part une diminution de l'expression de la protéine non mutée et d'autre part l'expression d'une protéine mutée.

Afin de comprendre les conséquences de cette mutation et notamment les conséquences de l'expression de la protéine mutée, des modèles animaux ont été créés.

2.3 Les modèles murins transgéniques de la MH

Les premiers modèles transgéniques murins de la MH ont été créés dans les années 1990 (Menalled & Chasselet, 2002 ; Menalled & Brunner, 2014 ; Ramaswamy et al., 2007). Cinq modèles sont plus particulièrement utilisés dans la littérature (Figure 9). Les paramètres modifiés dans la génération de ces modèles sont : la longueur de la protéine HTT introduite (exon 1 ou exon 1 plus quelques dizaines d'acides aminés supplémentaires, ou protéine entière), la longueur de l'expansion de triplets CAG (ou chaîne polyQ) allant de 82 à 140 répétitions, la protéine humaine ou murine et le promoteur (murin, humain ou prion) (Figure 9). Le modèle R6/2 est l'un des premiers modèles créés (Mangiarini et al., 1996). Il s'agit d'un modèle de surexpression du fragment Nter de la protéine HTT mutée humaine (exon 1 de la protéine humaine avec 144 répétitions du triplet CAG). Le phénotype du modèle R6/2

est sévère. Les souris meurent après 13 à 14 semaines. La précocité d'apparition du phénotype fait que ce modèle reste très employé puisqu'il permet de raccourcir l'expérimentation. Cette précocité d'apparition du phénotype et la sévérité du phénotype n'est cependant pas le plus proche de ce qui est observé chez les patients atteints de la MH. Par ailleurs, seul l'exon 1 de la protéine mutée est exprimé dans ce modèle. C'est pourquoi d'autres modèles ont été générés. Le modèle N171-82Q correspond à la surexpression du fragment Nter de la protéine HTT humaine, des acides aminés 1 à 171 sous l'expression du promoteur prion, avec 82 répétitions CAG. Le phénotype est retardé et moins sévère (Schilling et al., 1999).

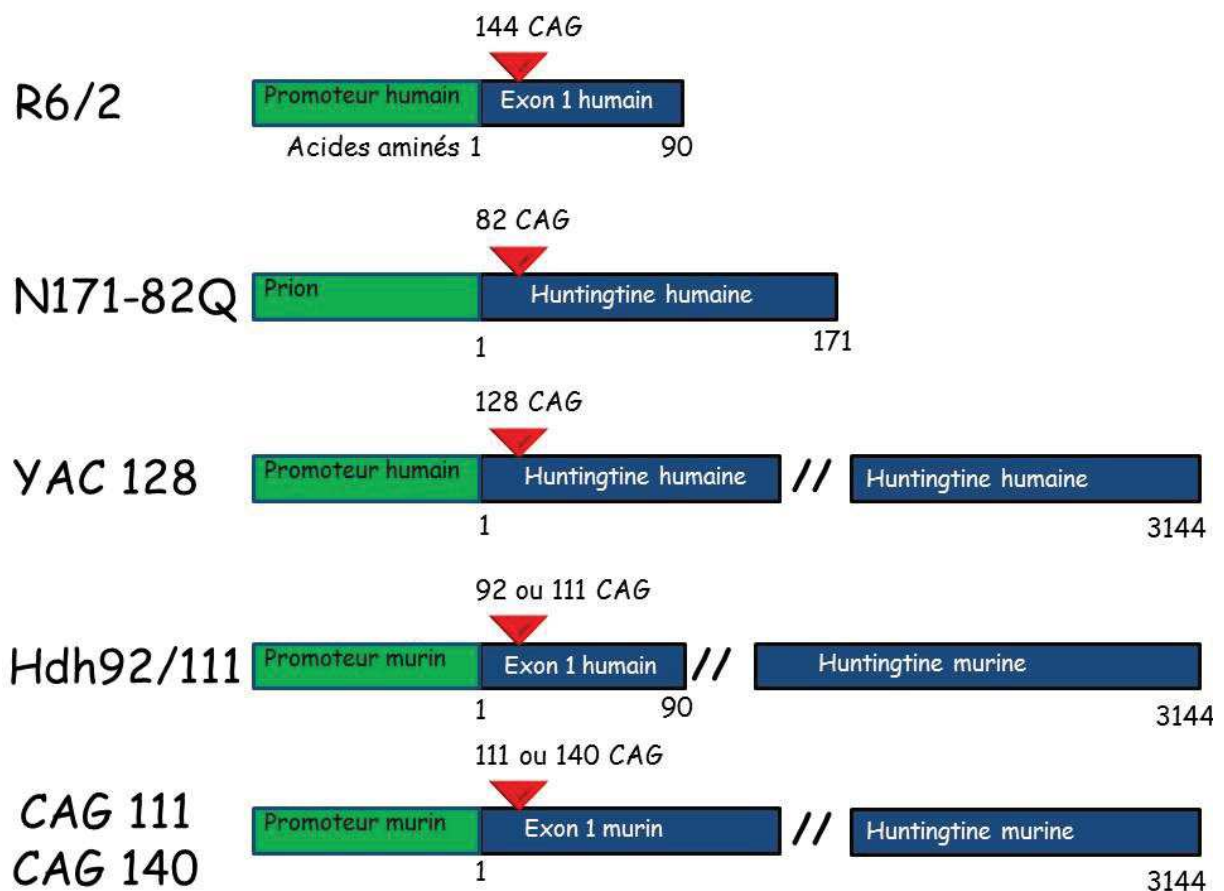


Figure 9 : Cinq modèles murins de la MH : R6/2, N171-82Q, YAC 128, Hdh92 ou 111 et CAG 111 ou 140. En vert : type de promoteur, en bleu : la longueur de la protéine, en rouge : nombre de répétitions de triplets CAG.

Cependant, la protéine introduite n'est pas entière. Le premier modèle introduisant la totalité de la protéine utilise des chromosomes artificiels de levure (YAC, Yeast artificial chromosome) avec 128 répétitions de triplets CAG (Hodgson et al., 1999). Il s'agit également

d'un modèle de surexpression. Le phénotype est moins sévère que les deux précédents modèles.

Les trois modèles R6/2, N171-82Q et YAC 128 comprennent non seulement les protéines introduites, mais également la huntingtine de la souris. Pour permettre une étude plus fine, des modèles knock-in ont été générés : seules les protéines avec le nombre de répétitions voulues sont exprimées. Un modèle avec la protéine humaine a été généré (Hdh) avec 92 ou 111 répétitions de triplets CAG (Wheeler et al. ,1999) et un modèle avec la protéine murine comportant 111 ou 140 répétitions de triplets CAG (Menalled et al. ,2003).

Ces derniers modèles peuvent être hétérozygotes ou homozygotes : contenir un allèle de la huntingtine non mutée et l'un avec 111 ou 140 répétitions ou alors contenir les deux allèles avec 111 ou 140 répétitions. J'ai utilisé le modèle CAG 140 (homozygote et hétérozygote) dans le cadre de mes expérimentations.

Il existe d'autres modèles murins contenant plus de répétitions de triplets CAG (150 ou 175) (Ramaswamy et al., 2007).

Par ailleurs, d'autres modèles animaux non murins ont également été générés (drosophile, singe et porc). Notre étude se focalise uniquement sur les modèles murins.

Les précédents modèles décrits portent uniquement sur l'expression d'une partie ou de la totalité de la HTT avec un nombre élevé de répétitions CAG. Qu'en est-il de la protéine non mutée ? Des modèles ont-ils été générés avec baisse de huntingtine ?

Un modèle KO a été généré et est létal (Duyao et al., 1995). Une étude très récente a consisté à diminuer l'expression de la huntingtine dans la totalité des tissus à 2 mois, à 4 mois et à 6 mois de vie. Le système utilisé est le système Cre-lox (Wang et al. ,2016). Les souris dont l'expression de la huntingtine est fortement abaissée à 2 mois de vie meurent en 8 jours de pancréatite aiguë (Wang et al., 2016). A 4 et 6 mois de vie, les souris développent un phénotype beaucoup moins sévère. Le phénotype de ce modèle a été caractérisé uniquement au niveau cérébral et pancréatique. Les autres tissus ou organes n'ont pas été étudiés.

La caractérisation des différents modèles murins de la MH a permis de mettre en évidence certains rôles de la protéine mutée comme certaines fonctions de la protéine non mutée.

2.4 La protéine mutée

L'expression d'une protéine mutante est investiguée dans de nombreuses études. L'hypothèse principale est celle d'une dérégulation, soit au niveau génique, soit au niveau protéique, des différentes voies analysées, due à des agrégats de cette protéine mutée contenant une expansion de glutamines (Bates, 2003 ; Bates et al., 2015). Ainsi, au niveau neuronal, une toxicité est induite en particulier, due à des inclusions intranucléaires d'agrégats (Figure 10) (DiFiglia et al., 1997).

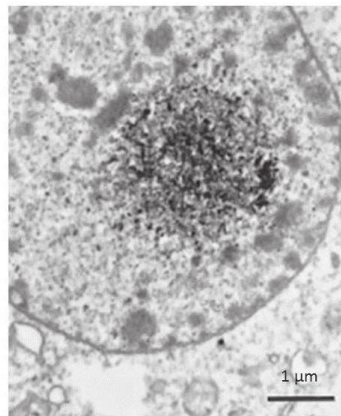


Figure 10 : Microscopie électronique montrant une inclusion intranucléaire d'un neurone cortical. L'agrégat est composé de fragment muté de huntingtine, mais également de microfilaments. Adapté de DiFiglia et al., 1997.

L'un des hypothèses physiopathologiques de la MH est que les agrégats ont un rôle considérable dans les anomalies observées figure 11 (Bates et al., 2015). Le clivage N-terminal de la protéine mutée engendre donc des fragments contenant des répétitions de glutamines (ou polyQ, au-delà de 35 répétitions). Ces fragments sont en mesure d'être transloqués dans le noyau. Au sein du noyau, ils peuvent donc s'agréger, former des oligomères, qui vont perturber la transcription (Bates et al., 2015). La perturbation de la transcription peut engendrer des défauts très étendus dans de multiples voies de signalisation. Il n'apparaît pas d'altérations plus spécifiques de certains éléments de la transcription que d'autres.

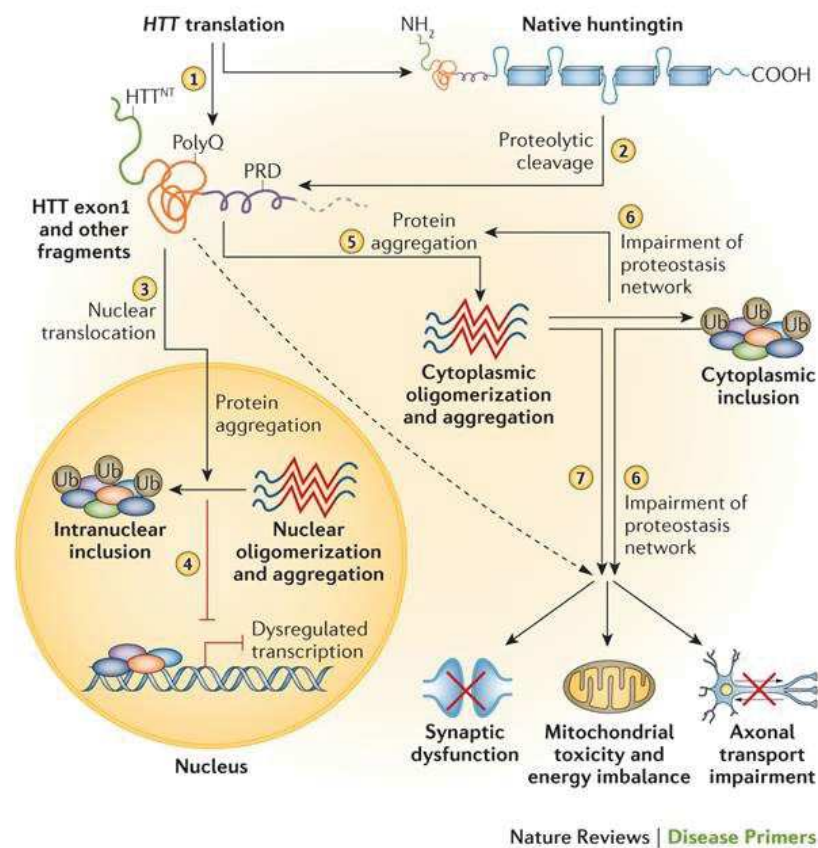


Figure 11 : Rôle des agrégats dans la MH. Bates et al., 2015.

Par ailleurs, des inclusions cytoplasmiques, au niveau neuronal, ont également été retrouvées, suggérant le même mécanisme de formation d'agrégats de fragments contenant une chaîne polypeptidique polyQ anormalement longue qu'au niveau intranucléaire. Ces agrégats pourraient avoir un rôle dans les dérégulations de la dégradation protéique (processus d'ubiquitination), mais également au niveau des dysfonctionnements synaptiques, de la toxicité mitochondriale observée ou encore des défauts dans le transport axonal (Figure 11) (Bates et al., 2015).

L'expression de la protéine mutée intervient dans de nombreux domaines touchant au niveau neuronal comme précédemment évoqué (Bates et al., 2015). L'un des domaines également touché et dont l'une des hypothèses provient d'un effet de la protéine mutée est l'homéostasie calcique neuronale (Figure 12) (Bezprozvanny, 2009).

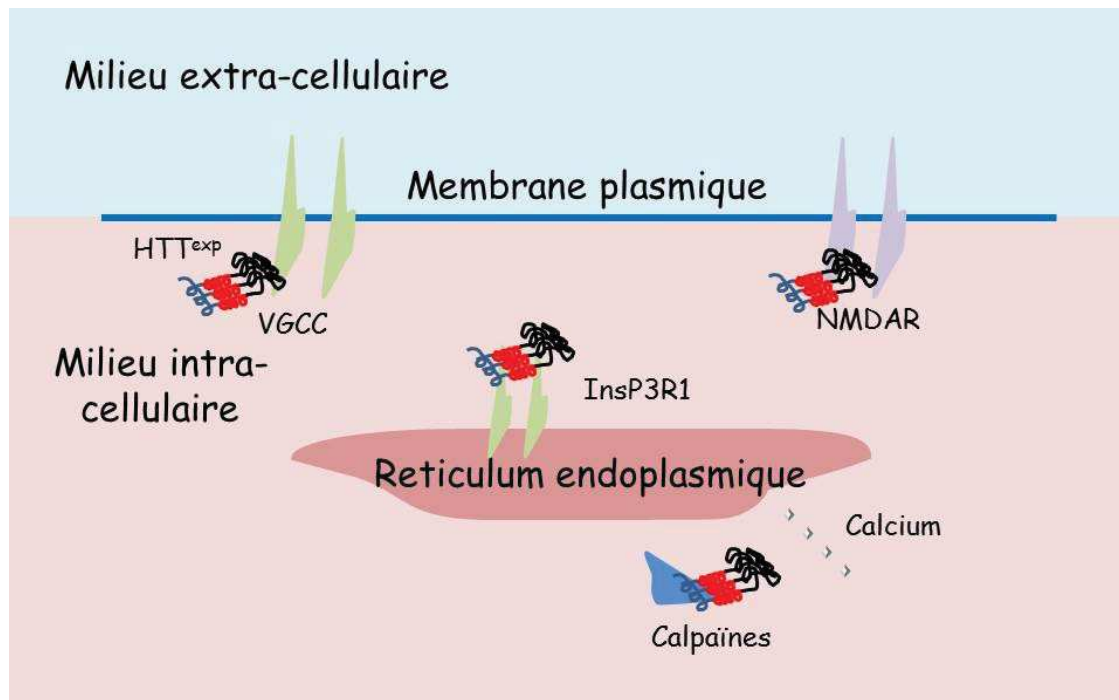


Figure 12 : Rôle des agrégats dans l'homéostasie calcique : HTT^{exp} : agrégats de protéines huntingtine avec chaînes polypeptidiques polyQ, VGCC : voltage-gated calcium channel, InsP3R1 : inositol (1,4,5)-triphosphate receptor, NMDAR : récepteur N-méthyl-D-aspartate. Adapté de Bezprozvanny, 2009.

La protéine mutée interagit avec la partie C-terminale InsP3R1 (inositol (1,4,5)-triphosphate receptor) (Tang et al., 2003) et induit des défauts calciques neuronaux (Tang et al., 2005) avec une augmentation du seuil d'activation de l'InsP3R1 (Zhang et al., 2008). L'expression d'un fragment C-terminal d'InsP3R1 permet de dissocier l'interaction entre la protéine mutée HTT et l'InsP3R1 et restaure une partie de l'homéostasie calcique (Tang et al., 2009). Par ailleurs, le dantrolène a un effet neuroprotecteur sur les effets observés liés à l'insP3R1. En somme, le récepteur de la ryanodine aurait également un rôle dans les perturbations de l'homéostasie calcique neuronale de la MH (Chen et al., 2011). Toutefois, aucun lien direct entre la huntingtine mutée et le récepteur de la ryanodine n'a été démontré (Chen et al., 2011).

Si l'InsP3R1 est impliqué dans les altérations calciques, d'autres récepteurs sensibles au calcium interviennent également : le récepteur N-méthyl-D-aspartate (NMDAR) (Zeron et al., 2002) ; le Voltage-gated calcium channel (VGCC) (Cepeda et al., 2007). Enfin, l'activité calpaïne est également perturbée et participe probablement aux défauts calciques neuronaux dus à l'expression de la protéine mutée (Gafni et al., 2004).

Nous voyons l'implication de l'expression de la protéine mutée dans de nombreuses voies neuronales.

Qu'en est-il cependant au niveau musculaire ?

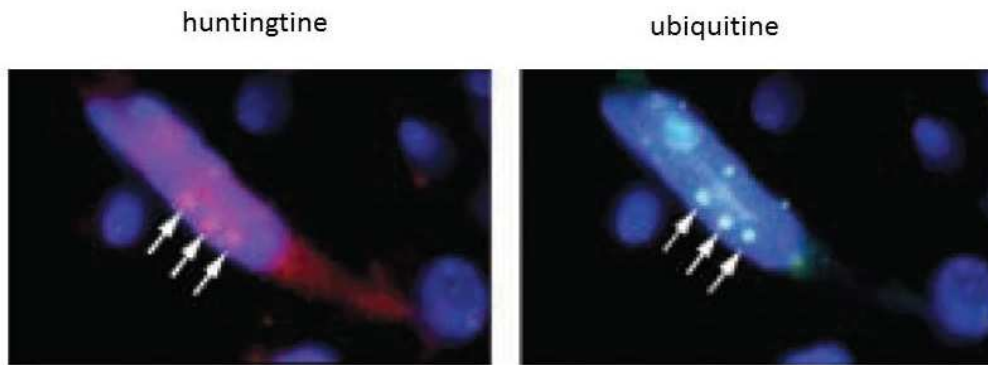


Figure 13 : Immunofluorescence de myotubes en cultures de souris R6/2. A gauche, marquage huntingtine (partie N-terminale de la protéine), à droite, ubiquitine. Présence de clusters marqués par la huntingtine et l'ubiquitine (flèches blanches). Adapté de Orth et al., 2003.

Ainsi, une immunofluorescence sur myotubes de souris de modèle de la MH (R6/2) montre l'apparition de clusters. Un comarquage montre la présence de la partie N-terminale de la Huntingtine et de l'ubiquitine (figure 13). Cette analyse ne permet pas, en revanche, de mettre en évidence s'il s'agit de fragments de huntingtine contenant l'expansion de triplets. Par ailleurs, il s'agit de cultures de six semaines (Orth et al., 2003). De plus, le marquage ne permet pas de savoir quel est le compartiment au sein duquel les clusters sont localisés. Ces clusters sont cependant retrouvés lors d'un immunomarquage de myotubes de patients atteints de la MH (figure 14) avec un anticorps dont l'épitope est situé dans l'exon 1 de la *HTT*, en dehors de la répétition de triplets CAG. Une autre étude d'une biopsie de patient, déjà évoquée, montre un aspect granuleux en immunohistologie (figure 14), non présent chez un sujet contrôle (Saft et al., 2005).

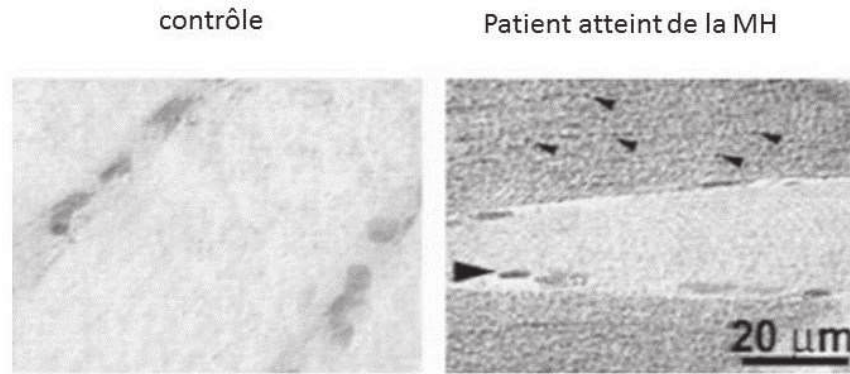


Figure 14 : Histologie d'une biopsie musculaire d'un sujet contrôle versus un patient atteint de la MH. Marquage de la huntingtine avec anticorps 2B4 (épitope acides aminés 50-64, Dehay et al., 2007). Aspect granuleux chez le patient, non retrouvé chez le sujet contrôle. Adapté de Saft et al., 2005.

Associées aux analyses précédemment décrites, des dérégulations transcriptionnelles sont observées (Luthi-Carter et al., 2002 ; Strand et al., 2005 ; She et al., 2011). L'hypothèse est celle d'une dérégulation due aux agrégats de partie N-terminale contenant l'expansion polyQ formés dans les noyaux. Ainsi, différentes voies comme HDAC4 sont déstabilisées au niveau transcriptionnel (Mielcarek et al., 2015b).

Par ailleurs, au niveau métabolique, des altérations mitochondriales ont été observées et également associées à une diminution de PGC1- α (Chaturvedi et al., 2009). Les agrégats observés pourraient être en jeu dans ces altérations métaboliques confirmées, notamment au niveau musculaire.

Comme illustré par la figure 8, l'anomalie génique de la MH induit deux conséquences. Si la première a été étudiée depuis le début des années 1990, la seconde est évoquée au début des années 2000 : quelles sont les conséquences de la baisse d'expression de la protéine non mutée (Cattaneo et al., 2001 ; Rangone et al., 2004) ? Les travaux s'orientent ainsi sur les fonctions de la protéine non mutée. Comment est constituée cette protéine, et comment agit-elle ?

2.5 La protéine non mutée

La protéine huntingtine (HTT) humaine est composée de 3144 acides aminés (figure 15), pour un poids moléculaire de 350 kDa. Il s'agit donc d'une protéine de haut poids moléculaire.

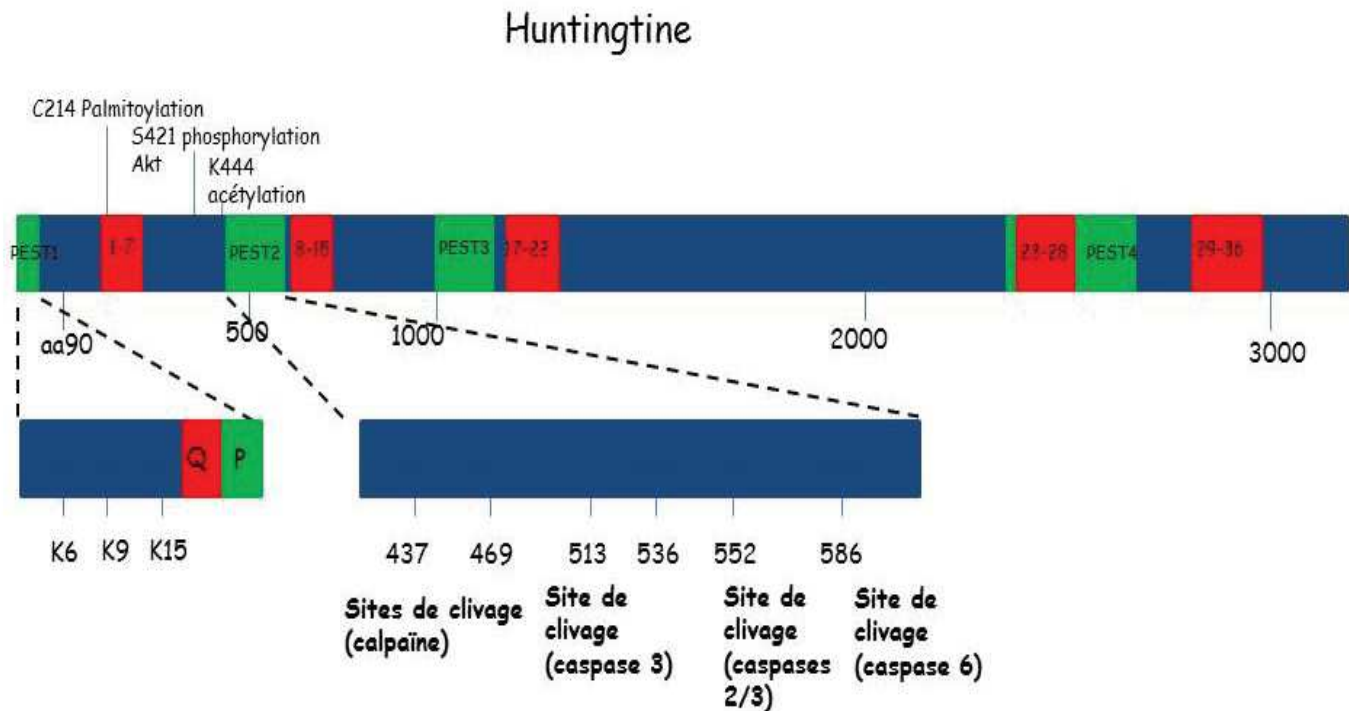


Figure 15 : La protéine se compose de 4 domaines PEST qui comprend de nombreux sites de clivage caspase et calpaïne. Les domaines en rouge correspondent aux HEAT repeat domains (36 domaines regroupés en 5 grands domaines), qui comprennent des sites d'interaction protéique. Le domaine N-terminal est schématisé avec une répétition de glutamine puis de proline au-delà de l'acide aminé (aa) 17.

La HTT est une protéine ubiquitaire, exprimée au niveau neuronal, mais également dans les autres organes et tissus (Carroll et al., 2015 ; Marques Sousa & Humbert, 2013). Le caractère ubiquitaire a été analysé par RT-PCR quantitative sur les différents tissus et organes (Carroll et al., 2015). Ainsi, l'ARNm est retrouvé dans la totalité des organes et tissus avec une prédominance au cérébral et testiculaire. L'expression en western-blot (WB) a été effectuée sur certains de ces organes et tissus périphériques (Figure 16, Sharp et al., 1995). En revanche, au niveau du muscle, si l'ARN a été détecté, il n'y a eu, à ce jour, aucune publication montrant l'analyse de l'expression de la huntingtine par western-blot.

Associé au caractère ubiquitaire, l'absence de HTT est létale chez la souris lors de la période embryonnaire à E7.5 (Duyao et al., 1995 ; Nasir et al., 1995 ; Zeitlin et al., 1995).

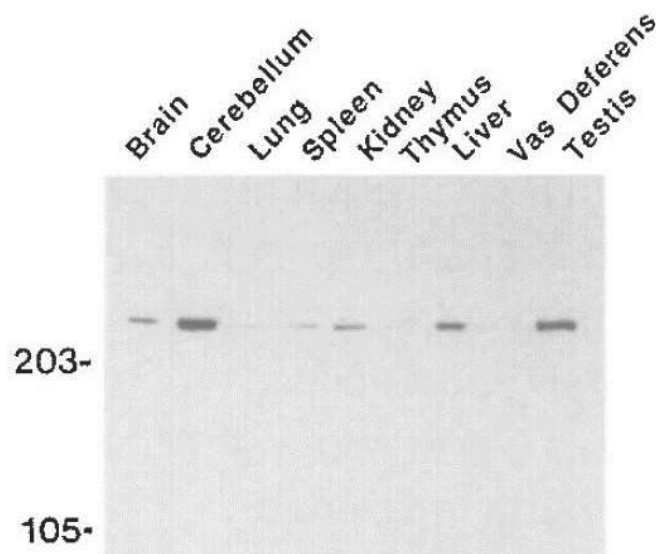


Figure 16 : Western-blot d'expression de la huntingtine dans différents tissus et organes. Image tirée de Sharp et al., 1995. La HTT a un poids moléculaire d'environ 350kDA.

Si la HTT totale est une protéine de haut poids moléculaire, de nombreux sites de clivage ont été identifiés et les protéolyses engendrent la possibilité d'expression de nombreux différents fragments. Ces sites de clivage par caspase et calpaïne notamment (Gafny & Ellerby, 2002 ; Goldberg et al., 1996 ; Hermel et al., 2004 ; Kim et al., 2001) se situent au sein de domaines riches en proline, acide glutamique, sérine et thréonine, appelés domaines ou régions (PEST) (figure 15).

La protéine HTT participe à de nombreuses fonctions cellulaires *princeps* : de la synthèse des protéines à leur dégradation. Nous allons tout d'abord voir les fonctions générales dans la cellule, puis nous verrons l'implication de la huntingtine dans ces fonctions.

2.5.1 De la synthèse à la dégradation protéique dans la cellule

Les premières étapes de la synthèse protéique ont lieu dans le noyau. Notons que la HTT est exprimée dans le noyau. Après transcription et maturation dans le noyau, l'ARNm est traduit dans le cytoplasme (Cooper, 2000). La HTT est également exprimée dans le cytoplasme. Les ribosomes indispensables à la traduction sont libres ou liés au reticulum (Figure 17A). Les protéines sont

ensuite adressées, selon le mode de traduction, au noyau, au peroxysome ou à la mitochondrie (ribosome libre), à la membrane plasmique, aux lysosomes, endosomes ou granules de sécrétion (Figure 17A).

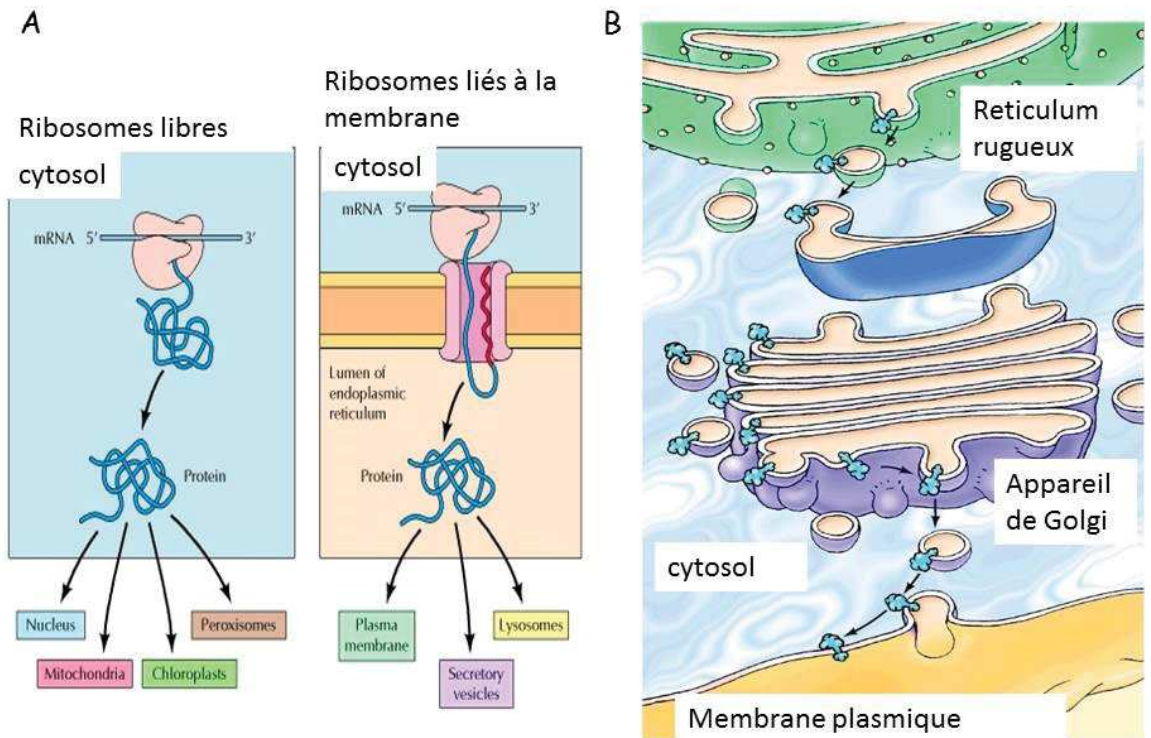


Figure 17 : A : Traduction de l'ARNm et adressage protéique. B : système d'adressage du reticulum rugueux à la membrane plasmique. Adapté de Cooper, 2000.

Les ribosomes liés à la membrane du reticulum endoplasmique lui donnent un aspect décrit comme rugueux (Figure 17B). Les protéines issues du reticulum rugueux sont exportées vers l'appareil de Golgi. Le compartiment intermédiaire est nommé ERGIC (ER-Golgi intermediate compartment). Le lien entre le reticulum rugueux et l'appareil de Golgi est effectué par des vésicules à manteau COPII issues des sites de sorties du reticulum (ERES) (Barlowe, 1998). Au niveau de l'appareil de Golgi, la partie cis est celle par laquelle arrivent les vésicules et la partie trans-Golgi la partie par laquelle repartent les vésicules. Le transport des vésicules au niveau du Golgi et du Golgi vers le reticulum est effectué via les vésicules à manteau de type COPI. Deux autres types de transport vésiculaires permettent l'endocytose et l'exocytose : le transport avec les vésicules à clathrines et le transport avec les vésicules à

cavéoline. Les transports (COPII, COPI, clathrine et cavéoline) nécessitent l'emploi du cytosquelette et de moteurs moléculaires. Au niveau du transport, nous verrons que la HTT est impliquée.

Les protéines ainsi synthétisées puis adressées peuvent ensuite être dégradées en vue de permettre un renouvellement.

Les deux principaux processus de dégradation intracellulaire sont le système ubiquitine-protéasome et l'autophagie (macroautophagie, microautophagie et autophagie médiée par les protéines chaperons) (Bonaldo & Sandri, 2013).

Le système ubiquitine-protéasome est en particulier utilisé dans la dégradation des protéines sarcomériques durant l'excitation contraction. Après le clivage de l'ATP en AMP, les enzymes de type E1 vont activer une ubiquitine. Puis ce sont les enzymes ligase de type E2 qui vont ajouter une deuxième ubiquitine. La classe d'enzyme E3 va permettre de terminer la chaîne de polyubiquitine et de l'associer à la protéine à dégrader. La protéine à dégrader polyubiquitinée va alors être adressée au protéasome. Cette protéine va être dégradée en acides aminés. A noter, à l'issue de l'action de la ligase E3, la possibilité de réversibilité d'une protéine polyubiquitinée avec les protéines (ubiquitin specific protein protease) USP14 et USP19 (Figure 18).

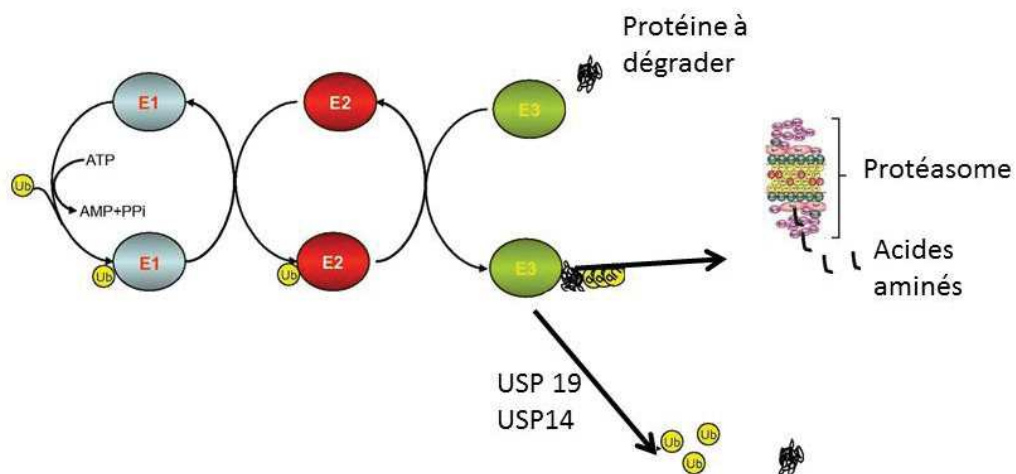


Figure 18 : Le protéasome. Adapté de Bonaldo & Sandri, 2013.

Concernant le second processus de dégradation, il est schématiquement décrit selon trois axes (Figure 19). Il y a tout d'abord le processus de macroautophagie (nommé couramment autophagie). La macroautophagie est activée par un complexe de régulation impliquant les protéines BECLIN-1, Vsp34 et 15, Atg14 et Ambra1. Ce complexe va permettre le

recrutement de LC3 au niveau de l'autophagosome naissant (membrane isolée). Une mitochondrie est également recrutée grâce à un complexe spécifique (mitophagie spécifique) comprenant PINK1 et Bnip3. Enfin, les protéines à dégrader polyubiquitinées sont recrutées via p62. L'autophagosome est ensuite associé au lysosome.

La seconde voie est l'autophagie médiée par les protéines chaperons (Figure 19). Ce sont des protéines qui ne sont pas polyubiquitinées mais qui ont été endommagées, par exemple par des dérivés réactifs de l'oxygène (reactive oxygen species, ROS). Ce dommage va induire l'apparition de séquences protéiques KFERQ reconnues par la protéine chaperone Hsc70. Cette dernière va permettre de délivrer la protéine endommagée directement dans le lysosome via les récepteurs Lamp2a.

Enfin, la microautophagie (Figure 19) est un processus permettant l'adressage direct dans le lysosome, comme le glycogène.

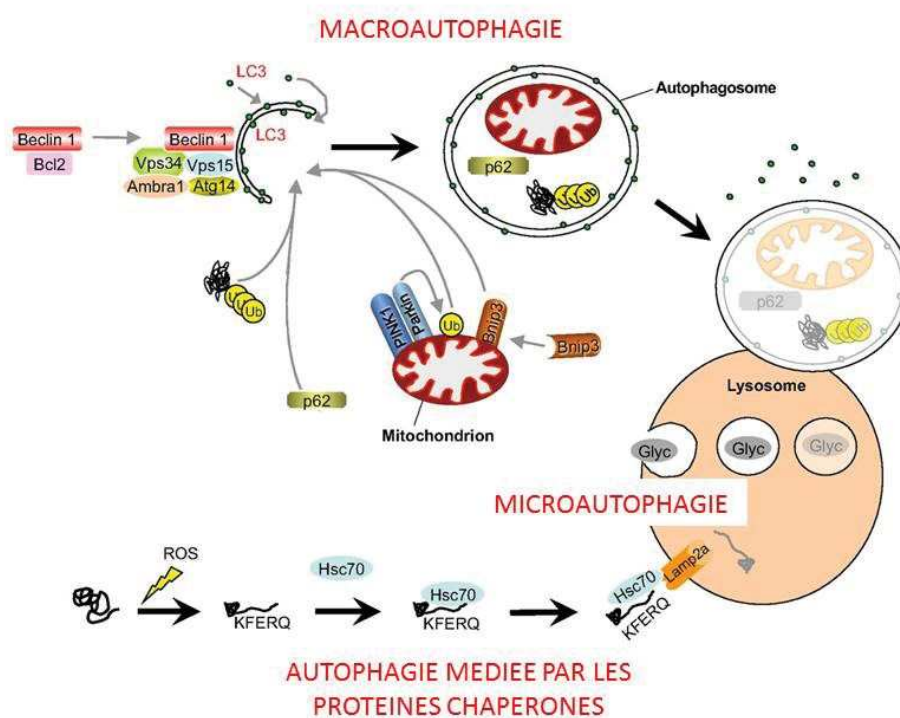


Figure 19 : Autophagie. Adapté de Bonaldo & Sandri, 2013.

L'autophagie est un processus indispensable pour la survie de la cellule, non seulement dans des conditions sans stimuli mais également avec différents stimuli comme le stress cellulaire, la carence en nutriments, la carence en acides aminés et en cytokines (Mizushima et al.,

2008). Ainsi, une perturbation de l'autophagie a un rôle direct au niveau cellulaire d'un point de vue général.

2.5.2 Les fonctions de la huntingtine

Différentes fonctions de la HTT ont été caractérisées (Figure 20, Saudou & Humbert, 2016) au niveau du cycle cellulaire précédemment décrit.

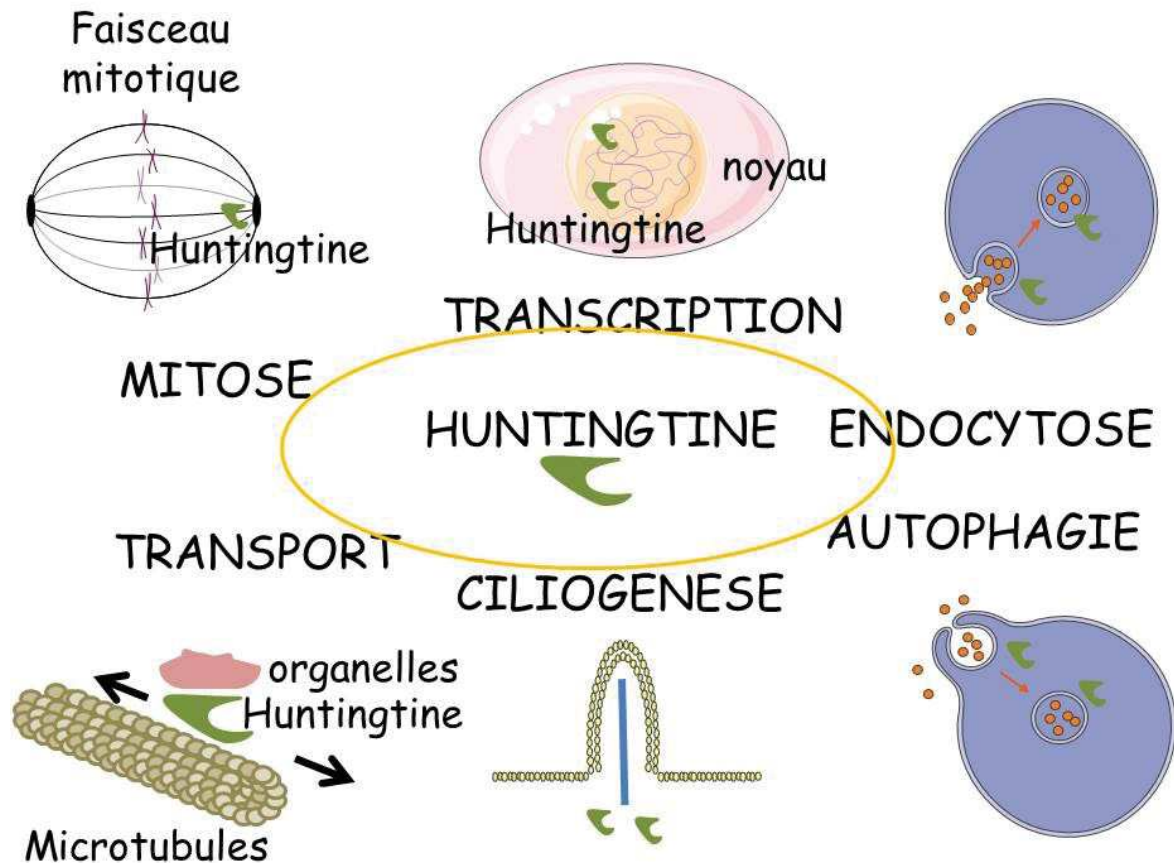


Figure 20 : Fonctions de la Huntingtine non mutée : rôle dans le transport intracellulaire, la mitose cellulaire, la transcription, l'endocytose, l'autophagie et la ciliogenèse.

Tout d'abord, au niveau du noyau, la HTT est exprimée et est impliquée dans la transcription. Elle permettrait de réguler la transcription selon un mécanisme à étayer (Valor, 2015), notamment au niveau neuronal (Thompson, 2003 ; Zuccato et al., 2003).

Puis, au niveau du cytoplasme, la HTT, également exprimée, a un rôle majeur dans le transport intra-neuronal d'organelles. Pour permettre ce transport, la HTT interagit soit directement avec les moteurs moléculaires (comme la dynéine), soit indirectement via la protéine HAP1 et la sous-unité p150^{glued} de la dynactine (Figure 20) (Colin et al., 2008 ;

Gauthier et al., 2004 ; McGuire et al., 2006 ; Twelvetrees et al., 2010, Figure 21). Les molécules transportées par la HTT sont multiples : le BDNF (brain derived neurotrophic factor) (Gauthier et al., 2004), des endosomes et des lysosomes (Caviston et al., 2011), des vésicules contenant des récepteurs GABA (Twelvetrees et al., 2010), des vésicules positives pour l'APP (amyloid precursor protein) (Colin et al., 2008 ; Her & Goldstein, 2008) ou encore des autophagosomes (Wong & Holzbaur, 2014).

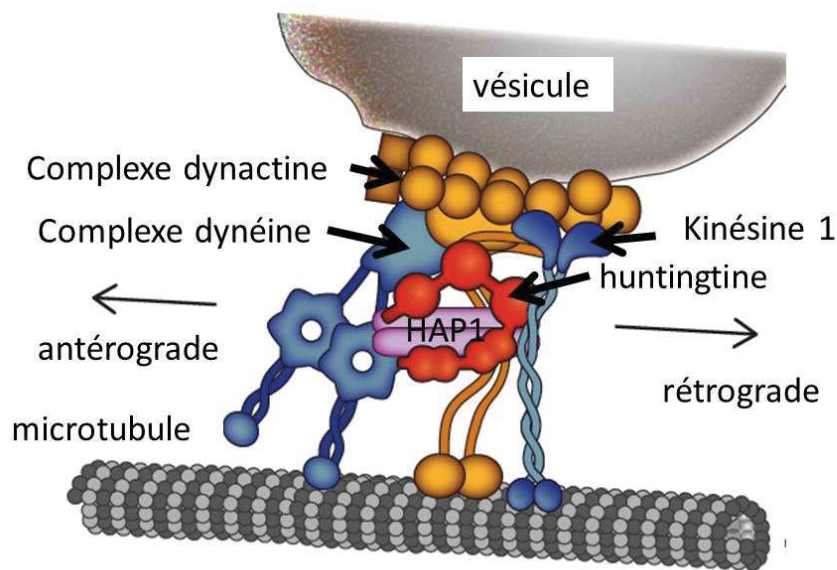


Figure 21 : transport de vésicules via la huntingtine. Adapté de Humbert & Saudou, 2016.

De plus, si la HTT permet le transport d'organelles diverses, elle peut également augmenter la vélocité dans les axones grâce à sa capacité à lier et à maintenir la GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) (Zala et al., 2013), ce qui permet d'avoir l'énergie suffisante pour un transport axonal rapide de vésicules (Hinckelmann et al., 2016). Enfin, le transport peut être soit rétrograde, soit antérograde selon la phosphorylation en S421 de la HTT (Colin et al., 2008).

Utilisant ce même complexe (Figure 21), une autre fonction de la HTT a été démontrée : elle coordonne la division cellulaire. Une diminution de l'expression de la HTT dans des neuroblastes ou des cellules de la glande mammaire entraîne une mauvaise orientation du faisceau mitotique (Elias et al., 2014 ; Godin et al., 2010). De plus, utilisant également le même complexe, la HTT régule la ciliogenèse (Haremaki et al., 2015).

Ensuite, la HTT a un rôle dans l'endocytose, via son interaction avec la dynamine 1 (El Daher et al., 2015).

Au niveau de la dégradation protéique, la HTT est également impliquée dans les processus d'autophagie (Cuervo & Zhang, 2015 ; Martin et al., 2014 ; Ochaba et al., 2014 ; Ruit et al., 2015a ; Rui et al., 2015b). En effet, la HTT interagit directement avec p62 d'une part et ULK1 d'autre part. p62 et ULK1 sont indispensables à la formation de l'autophagosome (Figure 22).

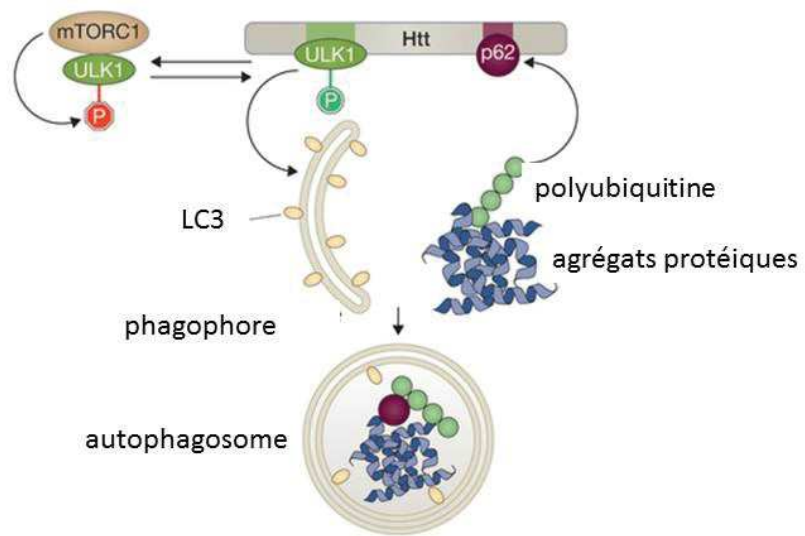


Figure 22 : La Huntingtine interagit directement avec p62 et ULK1, protéines impliquées dans la formation des autophagosomes. Adapté de Gelman et al., 2015.

L'absence de huntingtine résulte en un défaut de l'induction de l'autophagie sous condition de stress (lipotoxicité, mitotoxicité et protéotoxicité) (Rui et al., 2015a ; Rui et al., 2015b). En revanche, la perte de huntingtine n'affecte pas l'induction de l'autophagie lors d'absence de nutriments cellulaires (Rui et al., 2015a ; Rui et al., 2015b).

Afin de comprendre quelles pourraient être les autres fonctions de la huntingtine et/ou pour permettre d'approfondir les fonctions précédemment citées, il apparaît pertinent de regarder une pathologie ayant la même symptomatologie que les patients atteints de MH, mais dont l'étiologie génique ne porte pas sur la huntingtine : la maladie de Huntington-like 2 (HDL 2).

Il se peut ainsi que les gènes en cause, puis les protéines exprimées, aient des fonctions similaires à la huntingtine.

2.6 La maladie de Huntington-like 2

La maladie de Huntington-like 2 (HDL 2) est due à une expansion de triplets CTG anormale (au-delà de 41 répétitions pour une pénétrance complète) du gène de la junctophiline 3 : *JPH3* (Anderson et al., 2017 ; Holme et al., 2001 ; Krause et al., 2015 ; Margolis et al., 2001 ; Margolis, [2012]). La junctophiline 3 est une protéine ayant pour fonction le maintien entre la membrane plasmique et le reticulum endoplasmique (Figure 23). Par ailleurs, une perte de fonction de la junctophiline 3 donne un phénotype similaire à la HDL2 (Garbino et al., 2009 ; Kakizawa et al., 2008 ; Landstrom et al., 2014 ; Nichi et al., 2002 ; Seixas et al., 2012). Il s'en suit que le phénotype observé pourrait être lié à la perte d'expression de la junctophiline 3, c'est-à-dire à l'altération du maintien entre la membrane plasmique et le reticulum endoplasmique.

Or, ce maintien entre membrane plasmique et reticulum endoplasmique est primordial dans un type cellulaire particulier que nous allons étudier : la cellule musculaire.

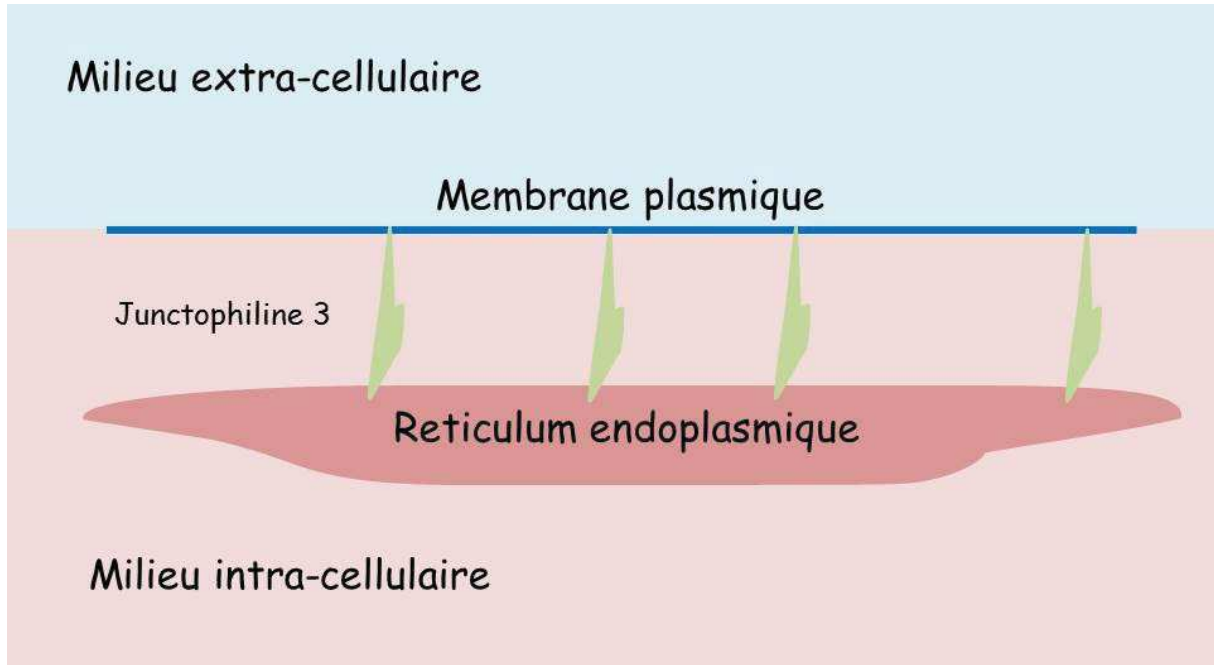


Figure 23 : Fonction de maintien entre la membrane plasmique et le reticulum endoplasmique de la Junctophiline 3 au niveau neuronal.

L'étude des différentes fonctions de la protéine huntingtine, ainsi que la maladie de Huntington-like 2 due à la junctophiline 3, nous donnent des hypothèses quant à la fonction de la huntingtine dans un paradigme différent du paradigme neuronal très étudié : le muscle. En effet, nous allons voir que la structure et la fonction du muscle permettent d'élaborer une hypothèse quant au rôle de la huntingtine dans le muscle.

Chapitre III : Le muscle : structure et fonction

3.1 Le muscle : un tissu primordial

Le muscle est un tissu primordial, très altéré chez les patients atteints de la MH (voir chapitre IV). Le muscle squelettique représente en moyenne 33% du poids du corps chez la femme et 40 % chez l'homme (Gonzalez-Freire et al., 2017 ; Janssen et al., 1985). Les IRM musculaires réalisées notamment dans le cadre diagnostique pour caractériser les myopathies versus des sujets contrôles permettent de quantifier le volume des muscles. Chez le sujet sain (Figure 24), le volume musculaire est effectivement important comparé au volume total si l'on analyse les membres inférieurs par exemple.

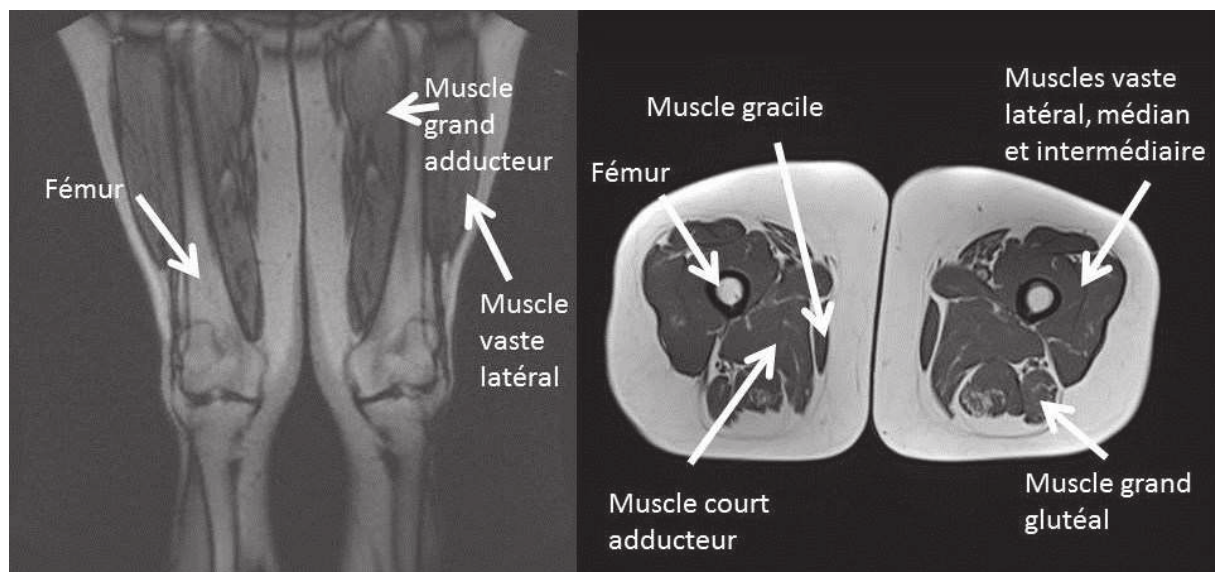


Figure 24 : Exemple d'IRM musculaire. A gauche, coupe coronale, IRM T2 au niveau des membres inférieurs. Différents muscles sont observés (comme le muscle grand adducteur ou encore le muscle vaste latéral). Le diamètre de ces muscles est important. A droite, coupe axiale des membres inférieurs, au niveau des cuisses. IRM séquence T2. Les muscles occupent plus de 40% du volume analysé. Différents muscles sont identifiés : muscle gracile, muscle court adducteur, muscles vaste latéral, médian et intermédiaire et muscle grand glutéal. Images CHU Grenoble.

La fonction principale du muscle est la contraction. Cette fonction principale entre en jeu dans une fonction vitale, la respiration ainsi que dans deux autres fonctions physiologiques primordiales, le mouvement et la posture.

Concernant la fonction vitale respiratoire : le muscle squelettique joue un rôle à deux niveaux, d'une part avec le diaphragme et les muscles intercostaux et d'autre part au niveau de la déglutition. En effet, l'altération du diaphragme peut induire une diminution majeure de la capacité pulmonaire et une insuffisance respiratoire. D'autre part, les défauts de déglutition liés à l'altération des muscles squelettiques induisent des fausses routes à répétition et des pneumonies. Ces défauts peuvent également être induits par une altération du système nerveux central et ou périphérique. Rappelons également que la pneumonie est l'une des causes principales de décès chez les patients atteints de la MH (Sorensen et al., 1992). Cependant, le lien direct entre défaut musculaire et défaut de déglutition chez les patients atteints de la MH reste à démontrer. Si le muscle est impliqué dans la respiration, fonction vitale, il est aussi indispensable pour le mouvement et la posture.

En effet, le muscle permet ainsi le mouvement et ce, dès la période fœtale. Les mouvements fœtaux sont perçus dès le deuxième trimestre de grossesse. L'absence de mouvement durant la période fœtale, que l'origine soit extrinsèque (contrainte mécanique du fait d'un oligoamnios par exemple) ou intrinsèque (pathologie d'origine génétique), peut conduire à une symptomatologie sévère, comme la fixation des articulations ou arthrogrypose (fixation des articulations à deux niveaux) (Hall, 2009 ; Hall, 2014 ; Hall & Kiefer, 2016 ; Poreau, 2014).

Le muscle squelettique permet également le maintien de la posture. Un défaut du muscle squelettique peut donc entraîner une hypotonie, parfois néonatale et sévère, comme retrouvé au sein des myopathies à cores centraux (Romero et al., 2005 ; Marty & Fauré, 2016).

Pour permettre la respiration, le maintien de la posture et le mouvement, le muscle a une structure bien précise.

3.2 Structure du muscle

Reliant plusieurs os, le muscle est dit fléchisseur si les centres des os se rapprochent lors de la contraction et extenseurs en cas d'éloignement des centres des os (Silverthorn, 2007).

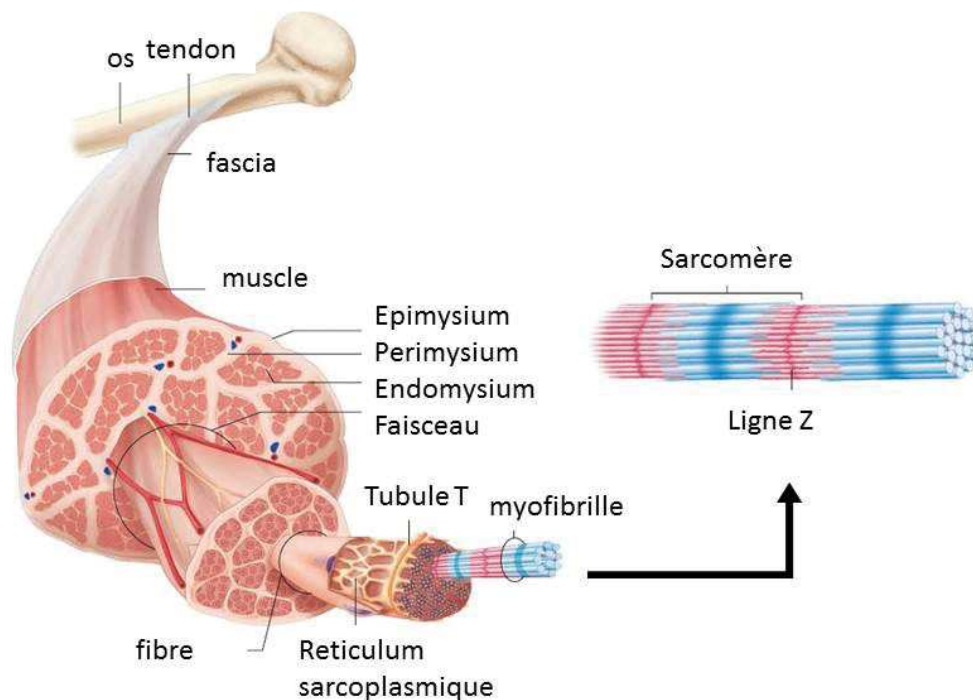


Figure 25 : Structure musculaire du muscle au sarcomère. Schéma adapté de (Patton & Thibodeau, 2010).

Le muscle squelettique est entouré d'un fascia, autour de l'épimysium. Le muscle est composé de faisceaux compartimentés par du perimysium (figure 25). Chaque faisceau est constitué de fibres musculaires, elles-mêmes entourées par de l'endomysium (figure 25). Une fibre musculaire est une cellule musculaire aussi appelée myotube. Les cellules musculaires sont longitudinales. Elles sont plurinucléées. Elles mesurent jusqu'à 30 cm de long pour 100 μm de diamètre. Les cellules musculaires ou myotubes proviennent de la fusion de cellules satellites mononucléées ou myoblastes (Abmayr & Pavlath, 2012 ; Buckingham, 2006 ; Wagers & Comboy 2005). Une estimation de $2,5 \times 10^8$ fibres musculaires dans le corps humain

a été proposée (Howell & Fulton, 1949 ; Bianconi et al., 2013). Une estimation concernant le nombre de cellules satellites avance le nombre de $1,5 \times 10^{10}$ (Morgan & Partridge, 2003). Les cellules musculaires sont elles-mêmes composées de myofibrilles (figure 25). Les myofibrilles correspondent aux myofilaments d'actine et de myosine et permettent la contraction de la cellule musculaire (Figure 26). La cellule ou fibre musculaire est entourée d'une membrane : le sarcolemme. Les noyaux sont en position périphérique de chaque fibre. Au sein d'une fibre sont retrouvés les myofibrilles, les mitochondries et le reticulum sarcoplasmique (figure 26). Le reticulum sarcoplasmique s'enroule autour des myofibrilles. Il comprend des tubules longitudinaux, ainsi que des citernes terminales. Avec une invagination de la membrane plasmique, nommée tubule transverse ou tubule T, le reticulum sarcoplasmique via ses citernes terminales forme des triades (figure 26). Une triade correspond donc à une citerne de reticulum sarcoplasmique, un tubule T et une autre citerne sarcoplasmique. Au niveau des myofibrilles, l'agencement des myofilaments permet de distinguer plusieurs bandes et lignes (figure 26). Tout d'abord, le sarcomère : il est l'unité contractile du muscle. Le sarcomère est constitué des myofilaments compris entre deux lignes Z (*zwischen*). Une ligne Z ou disque Z correspond à des protéines de structures permettant notamment l'arrimage des filaments fins d'actine.

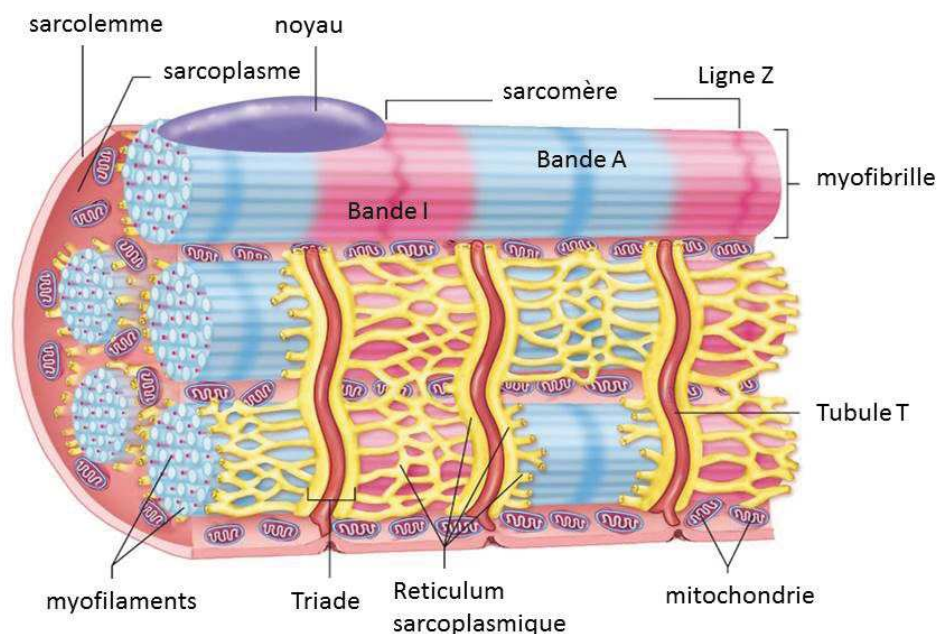


Figure 26 : Structure d'une fibre musculaire. Schéma adapté de (Patton & Thibodeau, 2010).

Ensuite, la bande I (isotropique) est une région occupée uniquement par les filaments fins (figures 26). La bande A (anisotropique) correspond à la longueur des filaments épais et comprend les filaments épais et une partie des filaments fins. La zone H (*helles*) est la zone ne comprenant que les filaments épais. Enfin, la ligne M (*Mittel*) est la zone d'ancrage des filaments épais (figure 27A).

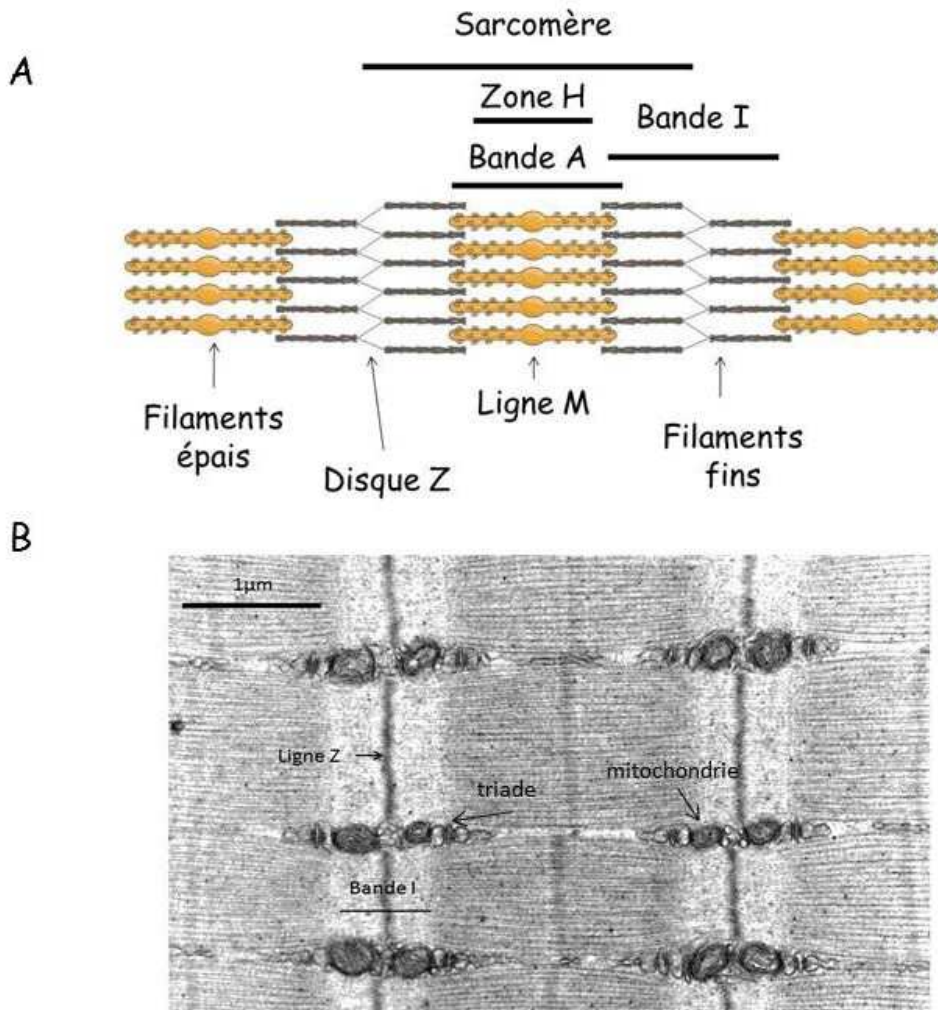


Figure 27 : Structure contractile de la fibre musculaire. A : organisation schématique de la fibre avec zone H (*helles*), bande A (anisotropique), bande I (isotropique), ligne M (*Mittel*). B : microscopie électronique d'une fibre musculaire (image D. Giovannini CHU Grenoble).

La structure contractile de la fibre musculaire est tout à fait identifiable en microscopie électronique (Engel & Franzini-Armstrong, 1994). Les bandes I correspondent aux bandes les

plus claires. Les lignes ou disques Z sont les lignes très foncées. La bande A est la bande plus foncée. La ligne M est également plus foncée au centre de l'image (figure 27A et 27B). Notons également la présence des mitochondries de part et d'autre de la ligne Z et, accolées aux mitochondries, les triades. Le sarcomère, compris entre deux lignes Z, est en fait également nommé unité contractile puisqu'il permet de comprendre le phénomène de contraction.

Les fibres musculaires ont toutes une organisation identique précédemment décrites. De plus, deux classes de fibres ont été distinguées selon les caractéristiques histologiques et métaboliques.

3.3 Types de fibres

Les deux classes de fibres (type 1 et 2) sont présentes chez l'homme et chez la souris. Les fibres de type 1 sont très vascularisées et riches en mitochondries, un métabolisme oxydatif est associé (Figure 28). Un marquage de la cytochrome C-oxydase (COX) montre en effet l'aspect foncé des fibres de type 1 (Figure 28). Les fibres de type 2, à l'inverse, sont pauvres en mitochondries et peu vascularisées, un métabolisme glycolytique est associé. Les fibres de type 2 sont subdivisées en fibres de type IIa, IIb et IIx selon l'enrichissement en mitochondries (Schiaffino & Reggiani, 2011).

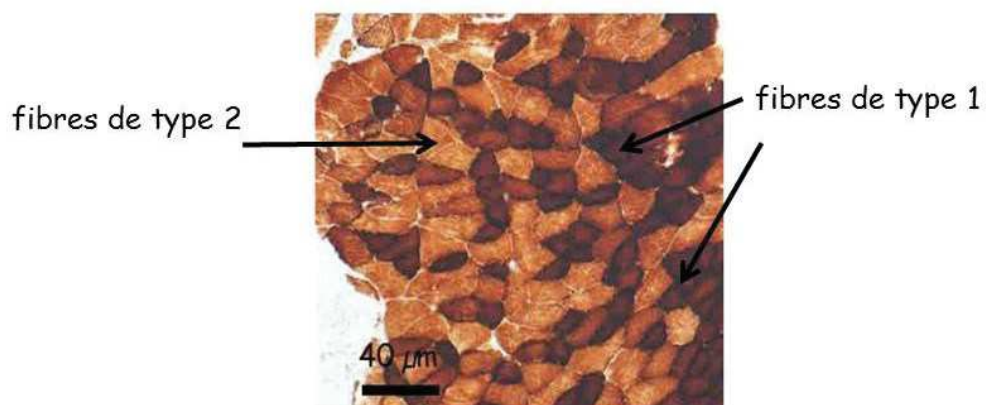


Figure 28 : Fibres murines de type 1 et 2. Muscle tibialis anterior. Coloration COX (Cytochrome C-oxydase). Image D. Giovannini – CHU Grenoble.

Les fibres de type 2, aussi appelées fibres rapides, sont impliquées lors des efforts courts et intenses. Les fibres de type 1, ou dites lentes, sont impliquées dans les efforts de moindre intensité mais sur une durée plus importante (Schiaffino & Reggiani, 2011). Les différents types de fibres permettent une adaptation selon l'effet physiologique provoqué.

Après avoir vu la structure des fibres et les différents types de fibres, nous allons voir qu'elles sont constitutives d'unités motrices mettant en jeu le système nerveux central.

3.4 Du système nerveux central au muscle

Les fibres musculaires regroupées et associées à un motoneurone constituent l'unité motrice (Figure 29A). Les motoneurones sont localisés dans la partie antérieure de la moëlle épinière. Leurs axones établissent un contact au niveau de chaque fibre musculaire au niveau de la jonction neuromusculaire (Figure 29B). Ainsi, au niveau de la jonction neuromusculaire, lors de l'arrivée du potentiel d'action, les vésicules du bouton présynaptique contenant l'acétylcholine vont fusionner avec la membrane. L'acétylcholine est libérée dans la fente synaptique (Figure 29B) (Hall & Sanes, 1993). Les récepteurs à l'acétylcholine regroupés du fait de l'action préalable de l'agrine (Ferns et al., 1996) sont activés et vont permettre la propagation du potentiel d'action le long de la membrane plasmique du myotube après entrée massive de sodium intracellulaire.

L'unité motrice concerne plusieurs fibres, qui sont innervées par un seul motoneurone. Lorsque le potentiel d'action issu d'un motoneurone atteint les fibres innervées, elles se contractent. Il y a contraction de l'unité motrice.

Du fait de la constitution de l'unité motrice, une altération musculaire (baisse de force, atrophie) peut provenir non seulement du muscle lui-même (anomalie intrinsèque), mais également de l'un des composants de l'unité motrice jusqu'au système nerveux central.

Il s'ensuit qu'un dysfonctionnement à l'un de ces niveaux (système nerveux central, moëlle épinière, motoneurone, nerf, jonction) peut également être la cause du défaut musculaire observé.

La maladie de Huntington est une maladie multisystémique. Les altérations observées au niveau musculaire (chapitre IV) peuvent donc être la conséquence d'altérations du système nerveux central, de la moëlle, du motoneurone ou de la jonction neuromusculaire. L'hypothèse que nous formulons est qu'il s'agit d'une combinaison de ces altérations, comprenant également des altérations intrinsèques du muscle.

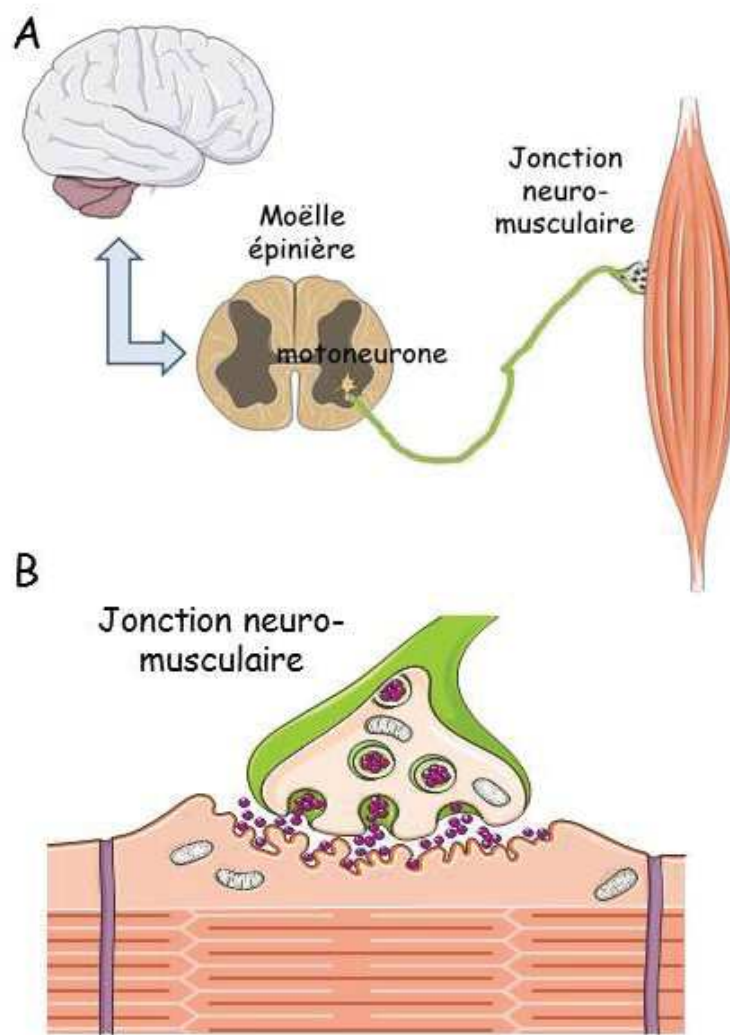


Figure 29 : A : Du système nerveux central au muscle. B : jonction neuromusculaire avec libération d'acétylcholine.

Après libération de l'acétylcholine et entrée massive de sodium, le potentiel d'action va se propager le long de la fibre musculaire et induit le couplage excitation contraction.

3.5 Couplage excitation contraction

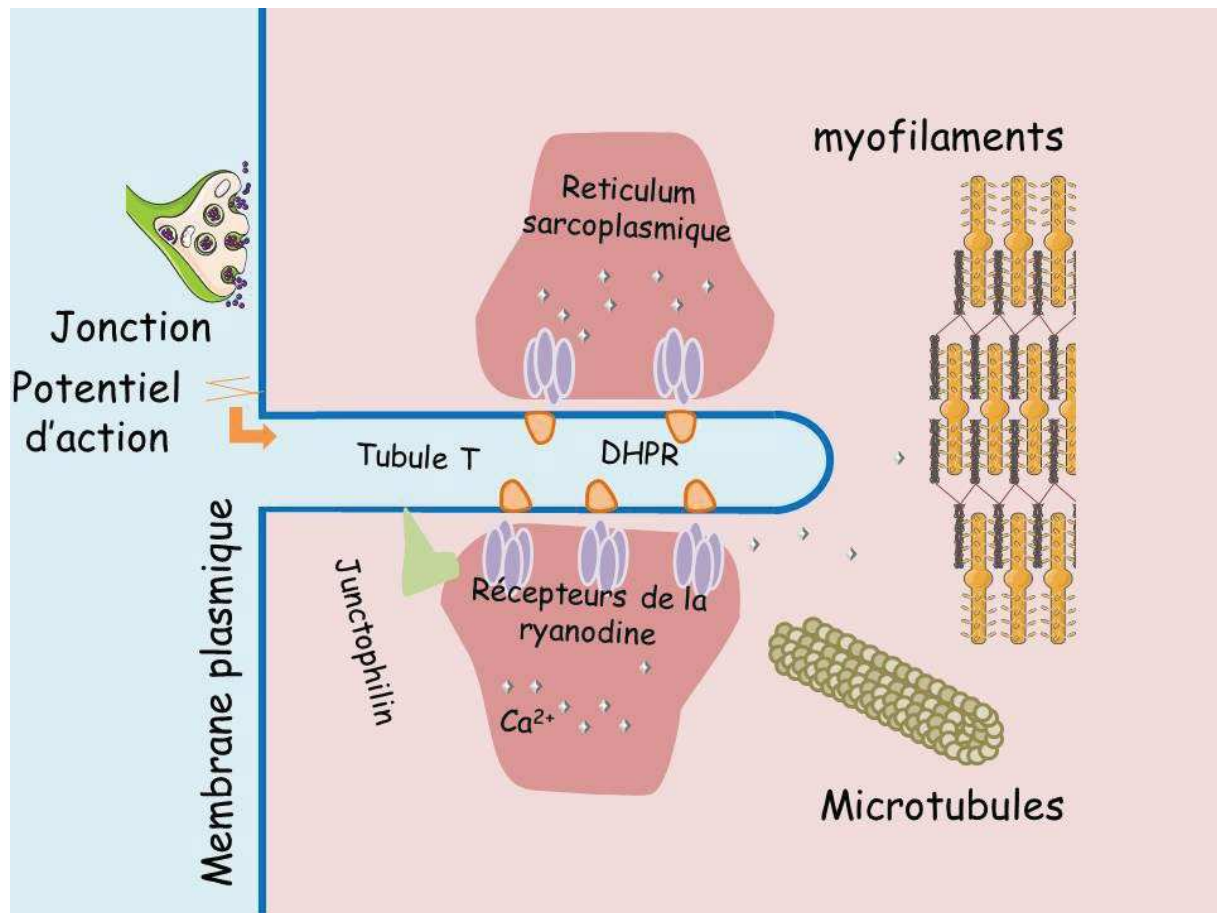


Figure 30 : Contraction musculaire depuis la libération d'acétylcholine au relâchement calcique.

Le couplage excitation contraction constitue une des étapes clés dans la chaîne d'évènements conduisant à la contraction musculaire. Comment s'organise ce couplage, et de façon plus précise, comment est constituée la triade, cœur du couplage excitation contraction ?

La libération d'acétylcholine au niveau de la jonction neuro-musculaire induit un potentiel d'action qui se propage le long de la membrane plasmique (Figure 30). Le potentiel d'action se propage jusqu'au tubule transverse ou tubule T, invaginations régulières de la membrane plasmique qui correspondent à une jonction des bandes A et I. Deux récepteurs membranaires entrent alors en jeu : le récepteur des dihydropyridines (DHPR) et le récepteur de la ryanodine (RyR1). Le DHPR et RyR1 sont en contact physique (Marty et al., 1994). Le potentiel d'action va induire une modification de conformation des récepteurs DHPR, une ouverture du canal calcique RyR1 et permettre la libération de calcium des citernes de reticulum sarcoplasmique (Marty et al., 1994) (Figure 30). Il s'agit du mécanisme « voltage induced calcium release » (VICR) : le potentiel d'action induit les relâchements de calcium (Lamb,

2000). Ce mécanisme est différent des cellules musculaires cardiaques au sein desquelles les relâchements de calcium des stocks contenus dans le reticulum endoplasmique sont induits par l'influx de calcium extracellulaire issu des récepteurs DHPR, qui ne sont pas en contact physiques avec le RyR dans ce paradigme (Lamb, 2000), par un mécanisme de « calcium induced-calcium release ».

Ce contact physique DHPR-RyR1 a eu lieu au niveau des points de contact entre le reticulum sarcoplasmique et la membrane plasmique, qui sont appelés triades.

3.6 La triade

La triade est composée de trois compartiments : un compartiment de reticulum sarcoplasmique, puis le tubule transverse (tubule T), correspondant à l'invagination de la membrane plasmique et enfin, un nouveau compartiment de reticulum sarcoplasmique (Engel & Franzini-Armstrong, 1994) (Figure 31). Les compartiments de reticulum sarcoplasmique sont en fait des citernes contenant du calcium.

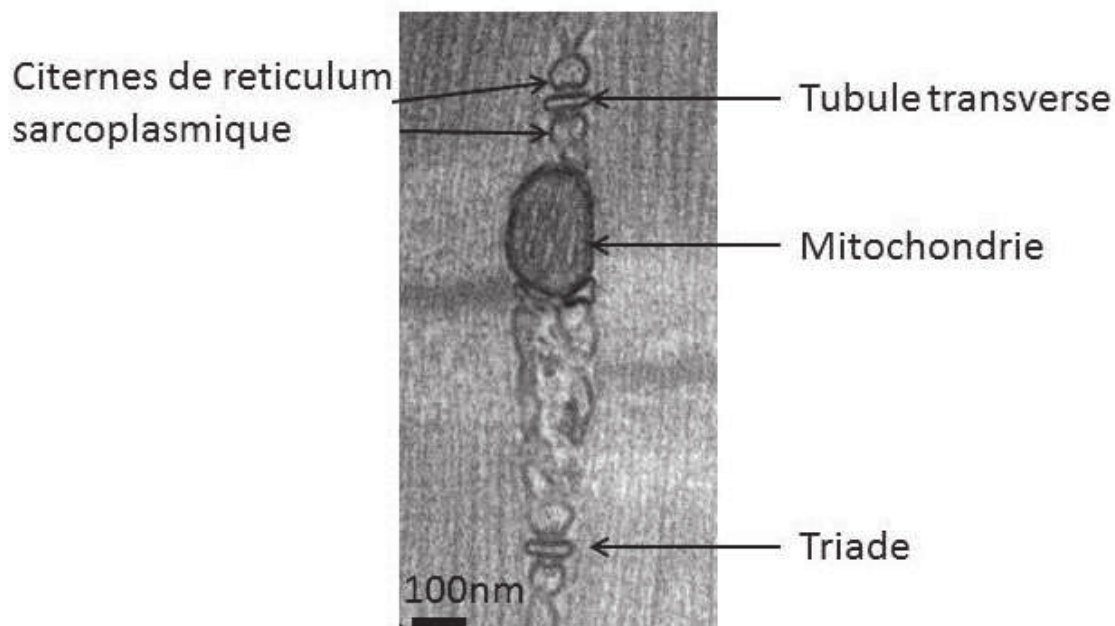


Figure 31 : Triade en microscopie électronique. Muscle murin, coupe transversale. Image Dr S. Oddoux – GIN Grenoble.

Au niveau des citernes terminales, le calcium contenu est relargué après stimulation.

La libération de calcium peut être reproduite in vitro sur fibres dissociées ou cultures cellulaires de myoblastes (Allard et al., 1996 ; Baker et al., 1996 ; Garcia & Beam, 1994) ou

d'autres modèles animaux (Chandlers et al., 1993). Il est possible de suivre l'évolution du calcium dans le cytosol grâce à des sondes adaptées.

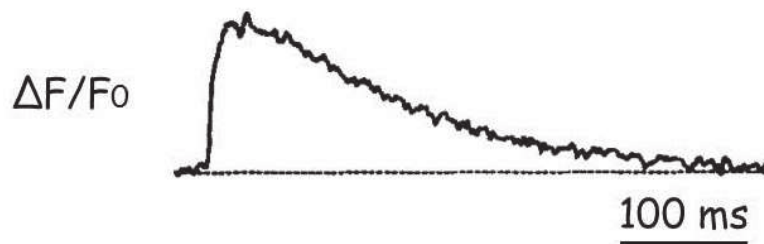


Figure 32 : Suivi par mesure de fluorescence de relâchements de calcium dans le cytosol. Myotube murin avec activité spontanée, analyse effectuée avec une sonde calcique Fluo-3. Adapté de Garcia & Beam, 1994.

Des sondes calciques fluorescentes permettent d'identifier l'évolution de concentration calcique cytosolique dans une cellule (Figure 32). Lors d'une stimulation cellulaire, provoquée par différentes drogues ou par une stimulation électrique, il est observé une augmentation très rapide (de l'ordre de la milliseconde) pour atteindre un pic, puis une décroissance progressive ramenant la concentration à la ligne de base en 450 ms environ (Garcia et al., 1994 ; Garcia & Beam, 1994) (Figure 32).

3.7 Les protéines de la triade

Le couplage excitation contraction, dont la résultante est le relâchement de calcium dans le cytosol, met en jeu plusieurs protéines au niveau de la triade : le récepteur des dihydropyridines, le récepteur de la ryanodine, mais également, FKBP12, la calséquestrine, la triadine, la junctine, la junctophiline 1 et CLIMP63 (Marty & Fauré, 2016) (Figure 33).

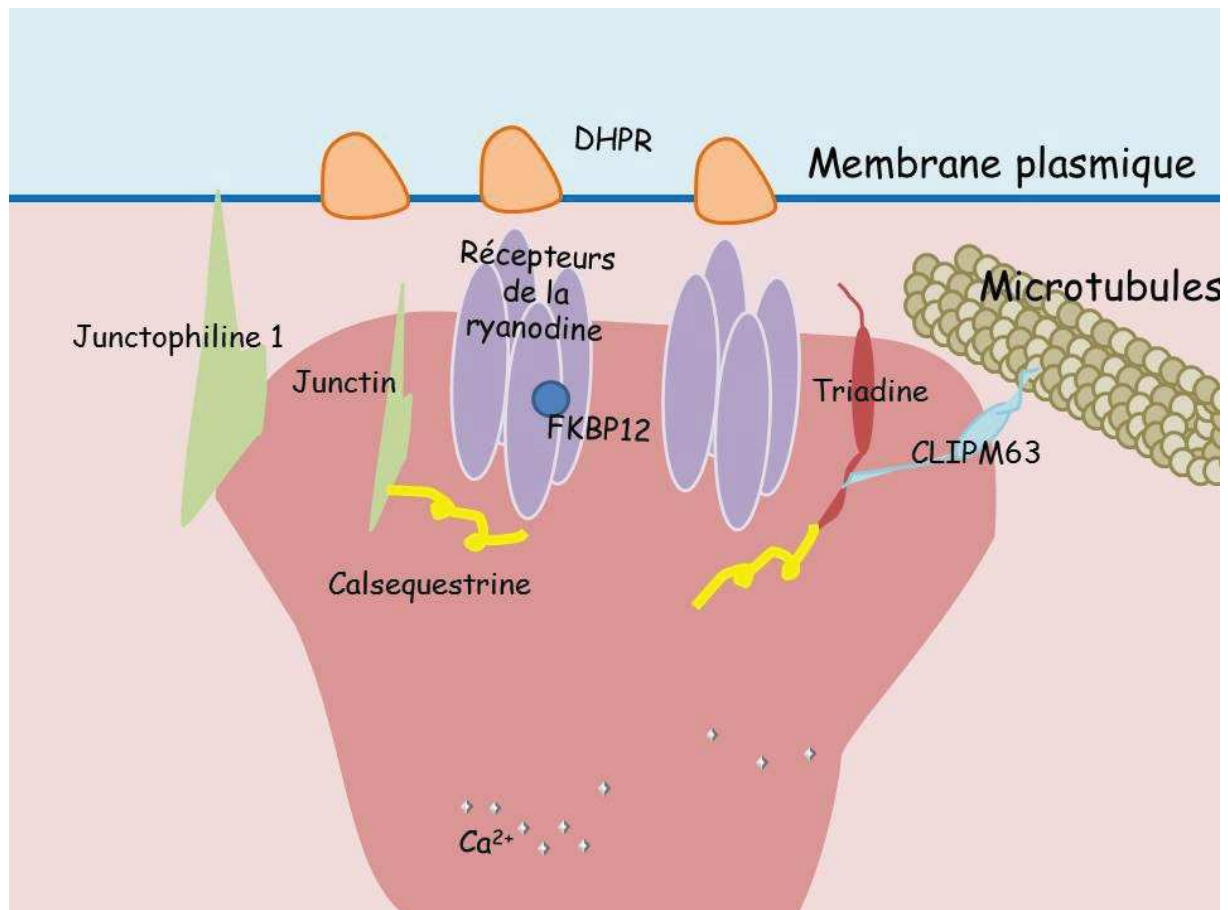


Figure 33 : Protéines de la triade participant au couplage excitation contraction et au maintien physique de celle-ci

Ces protéines permettent d'une part les relâchements calciques dans le cytosol et d'autre part le maintien physique et topologique des différents compartiments de la triade.

3.7.1 Le DHPR

Dans la triade, la principale protéine membranaire de la membrane plasmique est le récepteur des dihydropyridines (ou dihydropyridine receptor DHPR). Il s'agit d'un canal calcique localisé au niveau des tubules T (Fossett et al., 1983). Le gène est *CACNAS1*. Ses mutations conduisent à l'hyperthermie maligne ou la paralysie périodique hypokaliémique (Marty & Fauré, 2016 ; Monnier et al., 1997 ; Monnier & Lunardi, 2000). Le DHPR est composé de 5 sous unités. La sous unité $\alpha 1$ correspond spécifiquement à la partie canal, se situant au niveau de la membrane plasmique. Le DHPR a été modélisé en 3D après cryo-microscopie électronique en 2016 avec une résolution de 3,6 Å (Figure 34).

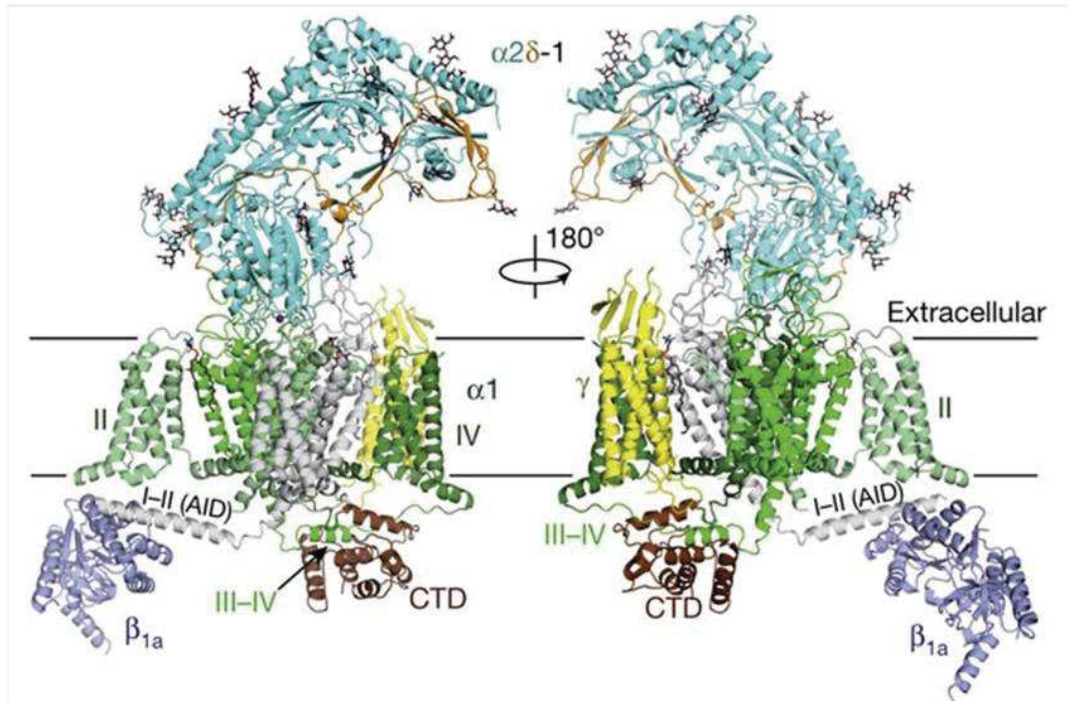


Figure 34 : Modélisation en 3D du DHPR, avec la partie sous unité $\alpha 1$ qui est transmembranaire. Adapté de Wu et al., 2016.

Le DHPR change de conformation lors de la dépolarisation au niveau du quatrième segment transmembranaire des quatre séquences homologues des sous unités $\alpha 1$ s (Figure 34) puis au niveau des cinquième et sixième segments (Wu et al., 2016).

3.7.2 RyR1

Le récepteur de la ryanodine de type 1 (RyR1) est une protéine de 565kDa. C'est l'une des trois isoformes de récepteurs de la ryanodine. RyR1 est l'isoforme majoritaire dans le muscle. C'est un homotétramère, dont la représentation en 3D suite à une analyse en cryomicroscopie électronique a été effectuée en 2015 (Figure 35). Il est composé d'une partie cytoplasmique de 280x280x120 Å et d'une partie membranaire de 120x120x60 Å (Lanner et al., 2010). La partie membranaire (membrane du reticulum sarcoplasmique) représente 1/5^{ème} de la protéine et est située au niveau C-terminal de la protéine. La partie membranaire constitue le pore du canal.

Ce tétramère permet en effet le relâchement du calcium des citernes de reticulum sarcoplasmique vers le cytosol.

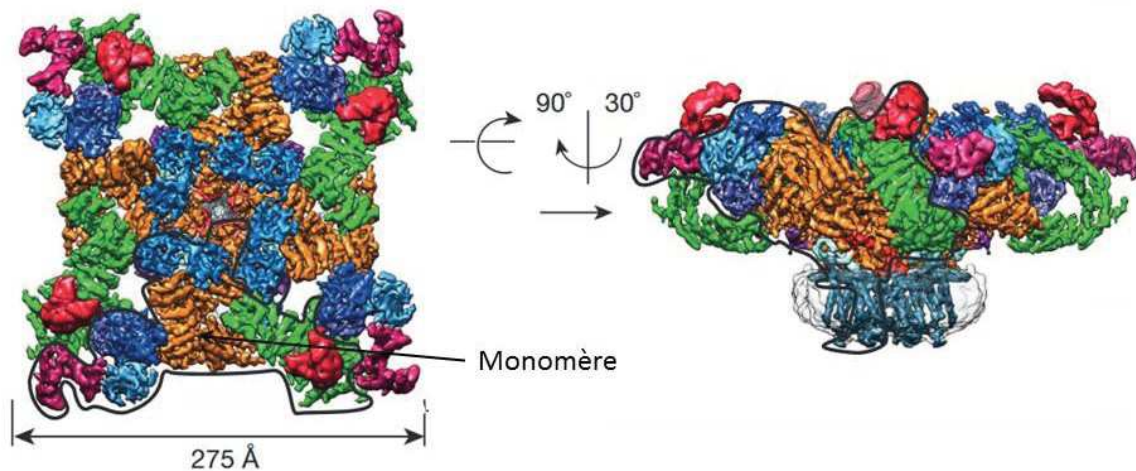


Figure 35 : Représentation en 3D du récepteur de la ryanodine, isoforme 1. Adapté de Efremov et al., 2015.

Plusieurs molécules chimiques permettent d'induire l'ouverture du canal RyR1 et sont communément employées lors des tests d'imagerie calcique. La caféine permet l'ouverture du canal. Le 4 chloro-m-crésol (4 CmC) permet d'activer spécifiquement ce canal (Kabbara & Allen, 1999). A l'inverse, le dantrolène permet d'inhiber son action et est utilisé en thérapeutique lors de l'hyperthermie maligne (Watt & Bhimji, 2017).

La protéine est codée par le gène *RYR1* situé sur le chromosome 19q13.2. Il comporte 104 exons (Lanner et al., 2010).

L'inactivation chez la souris du gène *RYR1* est létale (Takeshima et al., 1994). Ce qui montre l'importance de ce canal calcique notamment au niveau musculaire.

Les mutations du gène *RYR1* (mutations faux-sens ou non-sens, d'un allèle ou des deux) entraînent des myopathies à central cores, des myopathies à multiminicores, ou encore des myopathies centronucléaires (Clarke et al., 2010 ; Klein et al., 2012 ; Marty & Fauré, 2016 ; Monnier et al., 2001 ; Monnier et al., 2003 ; Monnier et al., 2008 ; Wilmshurst et al., 2010). Les cores sont des zones dépourvues de mitochondries lors d'analyse histologique de biopsies musculaires (Figure 36). Il existe une variabilité d'expression phénotypique des pathologies liées aux mutations de RyR1.

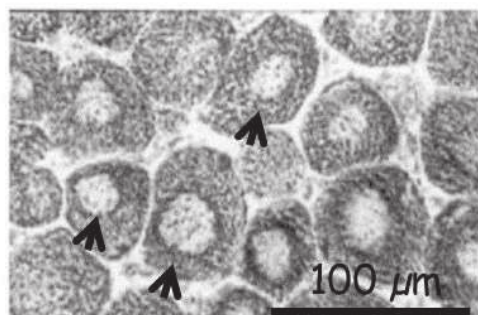


Figure 36 : Analyse histologique (NADH-tétrazolium reductase) d'une biopsie musculaire de patient avec mutation d'épissage homozygote de RyR1. Adapté de Monnier et al., 2001.

3.7.3 Contact physique entre le DHPR et RyR1

Le DHPR est en contact physique avec le récepteur de la ryanodine (RyR1) (Figure 37).

Lors d'immunoprécipitations de sous unités du DHPR issues de fractions de muscle enrichies avec de la membrane plasmique et du reticulum sarcoplasmique, le RyR1 est détecté lors des IP avec les sous unités $\alpha 2$ et β du DHPR (Marty et al., 1994).

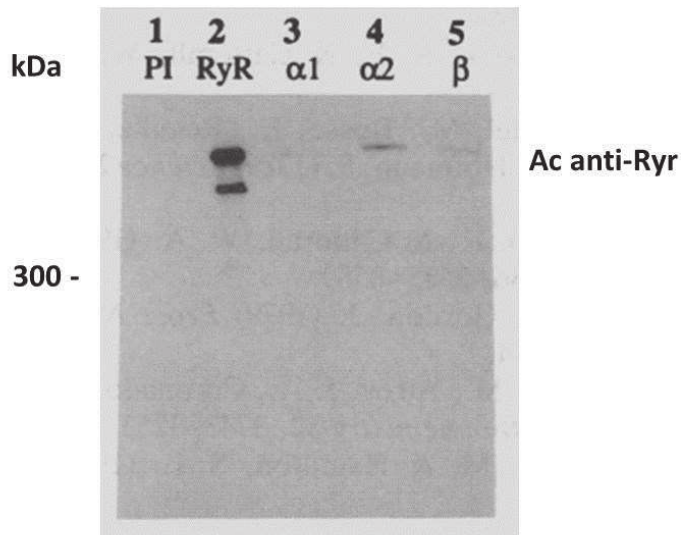


Figure 37 : Immunoprécipitations (IP) d'homogénats de muscle fractionnés contenant essentiellement de la membrane plasmique et du reticulum sarcoplasmique (triades). IP réalisées avec différents anticorps (Ac) : RyR1, $\alpha 1$ (sous unité $\alpha 1$ du DHPR), $\alpha 2$ (sous unité $\alpha 2$ du DHPR) et β (sous unité β du DHPR). Western-blot révélé avec Ac anti-RyR1 (protéine de 550kDa). Adapté de Marty et al., 1994.

Au sein de la même étude, il est montré l'existence d'un rapport stœchiométrique entre le DHPR et le RyR1 : deux protéines de DHPR sont en contact avec un tétramère de RyR1.

Des analyses en cryo-microscopie électronique ont permis de représenter en 3D le DHPR, le RyR1 et le contact entre les deux protéines (Efremov et al., 2015 ; des Georges et al., 2016 ; Yan et al., 2015 ; Zalk et al., 2015).

3.7.4 FKBP12

Interagissant avec le récepteur de la ryanodine, une autre protéine est indispensable pour le bon fonctionnement des relâchements calciques : FKBP12 (Figure 33) (Lamb & Stephenson, 1996). Cette protéine de 12 kDa, comparée aux 545 kDa du récepteur de la ryanodine, permet ainsi de stabiliser ce dernier en configuration ouverte et de coordonner les 4 monomères (Avila et al., 2003), ainsi que d'éviter les fuites de calcium en configuration fermée (Gaburjakova et al., 2001). Une protéine de FKBP12 est présente par monomère de RyR1, ce qui contribue à la stabilisation du récepteur de la ryanodine (Qi et al., 1998).

3.7.5 La junctine

La junctine est une petite protéine d'environ 20 kDa (Zhang et al., 1997) comprenant un domaine N-terminal cytoplasmique, un domaine transmembranaire au niveau du reticulum sarcoplasmique et un domaine C-terminal représentant 80% de la protéine comportant des domaines KEKE, et permettant d'interagir avec le récepteur de la ryanodine, mais aussi la calséquestrine et la triadine. Son rôle est à ce jour inconnu.

3.7.6 La calséquestrine

La calséquestrine est une autre protéine régulatrice du récepteur de la ryanodine, en particulier lors des relâchements calciques. L'absence de calséquestrine conduit à un phénotype similaire à celui de l'hyperthermie maligne (Protasi et al., 2009). Des défauts structuraux musculaires sont également observés en l'absence de calséquestrine 1 (Paolini et al., 2015) en particulier au niveau du fonctionnement mitochondrial et du stress oxydatif. La première mutation retrouvée chez l'homme est liée à un phénotype de myopathie avec faiblesse musculaire et fatigue, ainsi que des agrégats retrouvés au niveau du reticulum sarcoplasmique en microscopie électronique (Rossi et al., 2014). La calséquestrine a un rôle de séquestration du

calcium (Franzini-Armstrong et al., 1987). Etant située à proximité du récepteur de la ryanodine, elle permet de mettre à disposition ce calcium. Ainsi, lors de l'activation du récepteur de la ryanodine, un relâchement massif de calcium est possible (Beard et al., 2002).

3.7.7 *La triadine*

La triadine est une protéine transmembranaire dont l'isoforme principale est de 95kDa. L'absence de triadine conduit à des défauts musculaires : baisse de force, diminution de l'expression de DHPR, de calséquestrine et de junctine (Oddoux et al., 2009). Il y a également une altération de l'homéostasie calcique (Oddoux et al., 2009 ; Shen et al., 2007). La triadine est impliquée dans la structure du reticulum sarcoplasmique (Fourest-Lieuvin et al., 2012). En effet, l'isoforme 95 est en mesure de former des polymères permettant d'induire une déformation du reticulum sarcoplasmique et donc un meilleur contact entre le RyR1 et le DHPR (Marty, 2015). Par ailleurs, la triadine interagit d'une part avec la calséquestrine au niveau de son domaine C-terminal et d'autre part, elle interagit avec CLIMP-63, protéine qui est elle-même associée aux microtubules. L'hypothèse émise est que la triadine pourrait jouer un rôle d'ancrage de la triade et du complexe de relâchement calcique aux microtubules ainsi que du maintien durant le développement musculaire et la contraction (Marty, 2015).

Des mutations de la triadine sont associées à des pathologies cardiaques (Roux-Buisson et al., 2012).

3.7.8 *CLIMP-63*

CLIMP-63 est une protéine associée aux microtubules de 63 kDa qui interagit avec la triadine d'une part et avec les microtubules d'autre part (Osseni et al., 2016). Un mutant de CLIMP-63 transfecté dans des fibres musculaires dissociées de souris induit une altération du réseau de microtubules, montrant ainsi les effets d'une modification du lien entre CLIMP-63 et ses partenaires.

3.7.9 *La junctophiline 1*

La junctophiline 1 est une protéine de 90 kDa qui est localisée aux triades et qui a un rôle structurel du reticulum sarcoplasmique et de la membrane plasmique (Block et al., 1988 ; Landström et al., 2014). L'absence de junctophiline 1 induit notamment un découplage entre

le RyR1 et le DHPR (donc entre le reticulum sarcoplasmique et la membrane plasmique) qui conduit à un dysfonctionnement du relâchement calcique (Hirata et al., 2006). Les défauts morphologiques dus à l'absence de junctophiline 1 sont observables en microscopie électronique au niveau des triades (Figure 38).

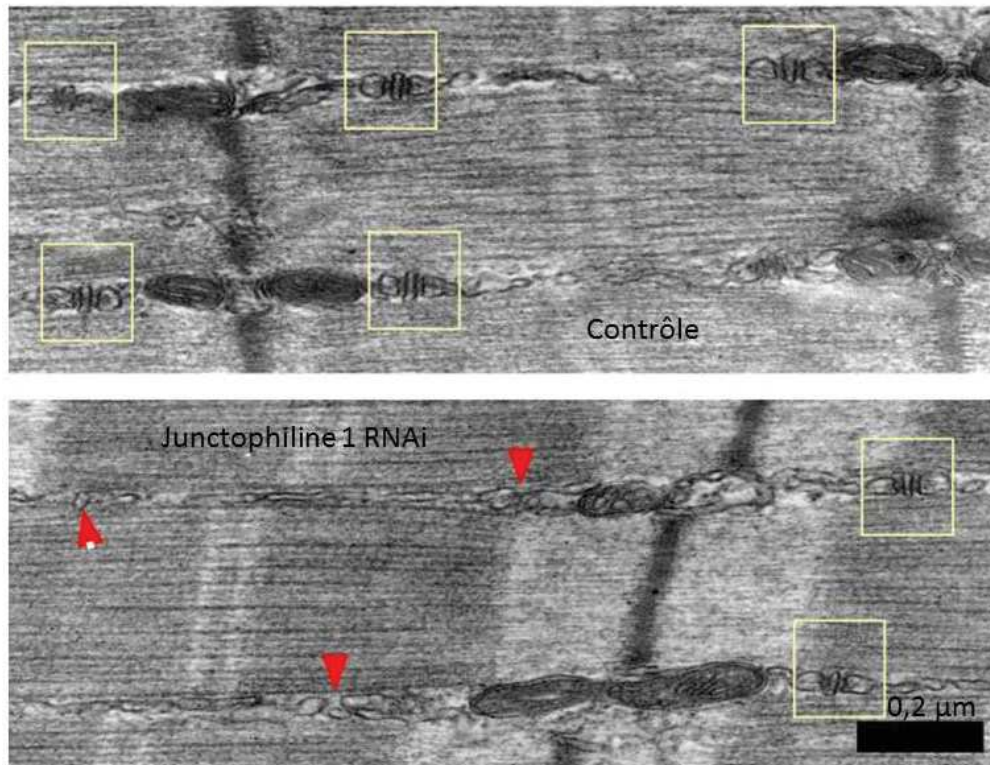


Figure 38 : Microscopie électronique de muscle murin contrôle (en haut) et avec baisse de l'expression de la junctophiline 1 et 2 en bas. Les flèches rouges montrent les triades altérées et les carrés jaunes les triades normales. Adapté de Hirata et al., 2006.

Nous voyons donc que la triade a une structure singulière qui permet d'accomplir la fonction principale du muscle : la contraction.

3.8 La contraction

La contraction est un phénomène physiologique qui apparaît altéré chez les patients atteints de la MH (voir chapitre IV). Comment s'opère-t-elle ?

Le glissement des filaments fins sur les filaments épais permet ainsi le raccourcissement de la fibre et génère une tension proportionnelle à l'interaction entre les filaments fins et épais

(Silverthorn, 2007). Ainsi, si l'on regarde la disposition d'un sarcomère, lors de la contraction, c'est-à-dire lors du glissement des filaments, la bande I va quasiment disparaître (Figure 39).

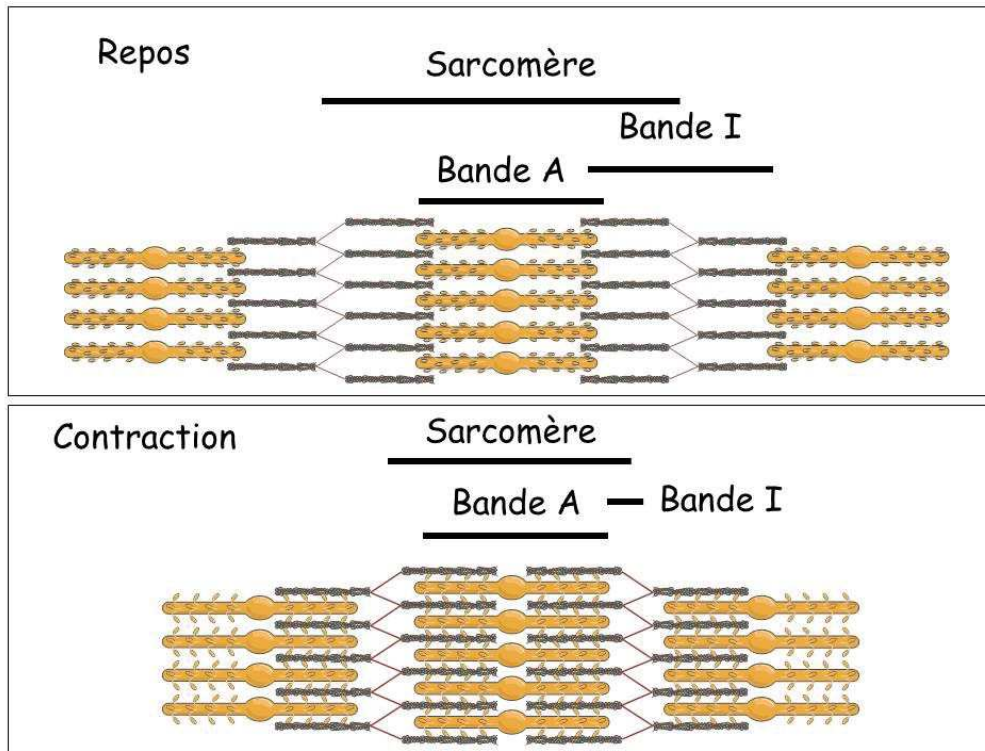


Figure 39 : Contraction musculaire et raccourcissement du sarcomère et de la bande I.

Le glissement des myofilaments correspond à un cycle énergétique entre les protéines en présence, essentiellement l'actine F (polymère d'actine G, nécessitant de l'ATP hydrolysé en ADP) et la myosine, régulées par la tropomyosine et la troponine C. Ainsi, lors de l'état de rigidité les têtes de myosine sont liées à l'actine G, la tête de pont de la myosine formant un angle de 45° avec l'actine. L'ATP se fixe ensuite au niveau de la tête de myosine ayant pour conséquence une modification de l'affinité de la liaison entre la tête de myosine et l'actine G. L'ATP est ensuite hydrolysé en ADP et P_i . La tête de myosine pivote et forme alors un angle de 90° entre sa tête de pont et l'actine (il s'agit de l'état de relâchement musculaire). La libération de P_i entraîne le pivotement de la tête de myosine, l'angle entre la tête de pont et l'actine passe alors de 90° à 45° et permet l'avancée du filament d'actine. La libération de l'ADP permet le retour à l'état de rigidité. Afin de permettre un glissement contrôlé des

myofilaments, une protéine, la tropomyosine est enroulée autour de l'actine et permet de bloquer partiellement les sites de liaison entre l'actine et la myosine (von der Ecken, 2015). Les études de structure récentes, en cryo-microscopie électronique avec une résolution de 3,7Å pour l'actine F, montrent les sites d'interaction précis entre l'actine F et la tropomyosine qui peuvent être modifiés lors de mutations ponctuelles de l'actine et/ou de la tropomyosine et donc inactifs (von der Ecken et al., 2015). Cette régulation par la tropomyosine du glissement des myofilaments est elle-même régulée par la troponine C qui lie le calcium. En l'absence de calcium, le complexe troponine-tropomyosine recouvre le site de liaison entre l'actine et la myosine. Lorsque le calcium est présent dans le cytosol, il va se lier à la troponine, écartant ainsi la tropomyosine du site de liaison et permettant la liaison entre la tête de myosine et l'actine.

3.9 Cellules satellites, prolifération, différenciation et régénération

Le muscle a une structure singulière et permet la contraction. Le muscle est constitué de fibres musculaires. Ces fibres sont des cellules musculaires bien différenciées : les myotubes. Les myotubes peuvent être obtenus en culture afin d'effectuer des tests *in vitro*, technique que j'ai employée afin de générer des modèles avec forte baisse de l'expression de la HTT.

L'obtention de myotubes résulte de la mise en culture de myoblastes cellules non différenciées en phase de prolifération, puis le passage en phase de différenciation (Figure 40). La culture cellulaire *in vitro* utilise des facteurs de croissance permettant la prolifération puis la différenciation des myoblastes en myotubes.

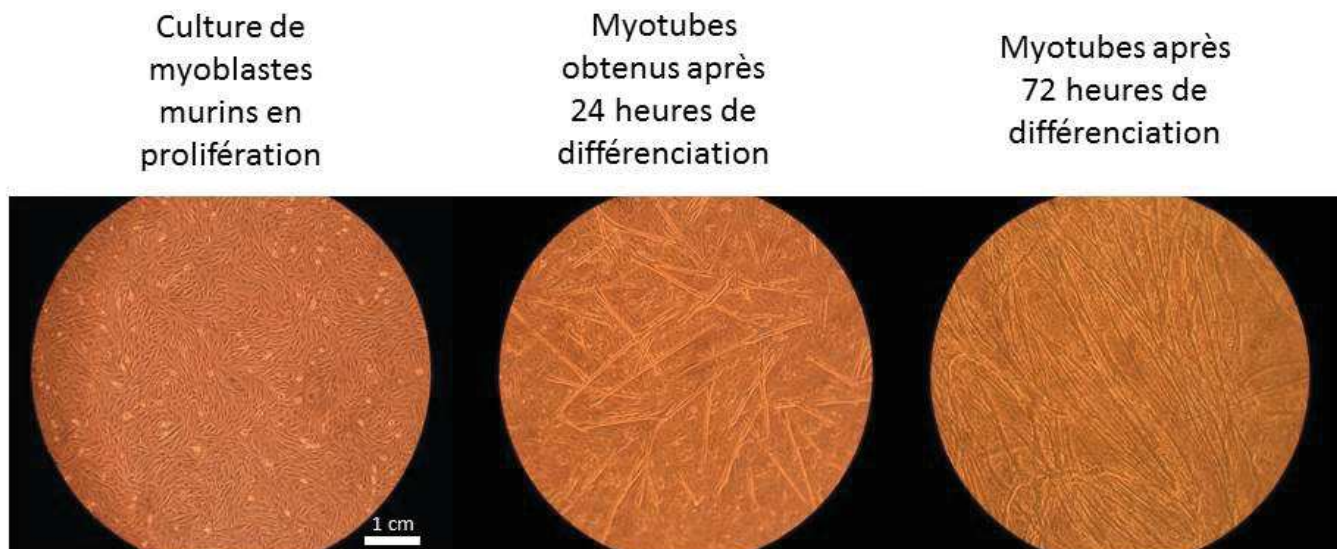


Figure 40 : Des myoblastes aux myotubes.

Les myoblastes sont des cellules satellites localisées sous la lame basale des fibres musculaires. Les cellules quiescentes expriment le marqueur Pax 7. Les myoblastes ont la faculté de régénérer les fibres musculaires lorsque celles-ci sont endommagées.

Les myoblastes entrent alors en prolifération et ont une expression plus élevée du marqueur Myf5 (Tidball, 2011). L'étape suivante est la différenciation en phase précoce qui montre une élévation des marqueurs MyoD et Myf5 ainsi qu'une augmentation de l'expression de gènes spécifiques du muscle. La différenciation en phase précoce voit également l'augmentation de l'expression de la myogénine et de Myf4 ainsi que des facteurs de transcription de la famille MEF2 (myocyte enhancer binding family 2) (Tidball, 2011). Les facteurs de transcription de la famille MEF2 sont impliqués dans la dernière étape : la différenciation en phase tardive avec fusion des myoblastes donnant un myotube plurinucléé (Figure 41).

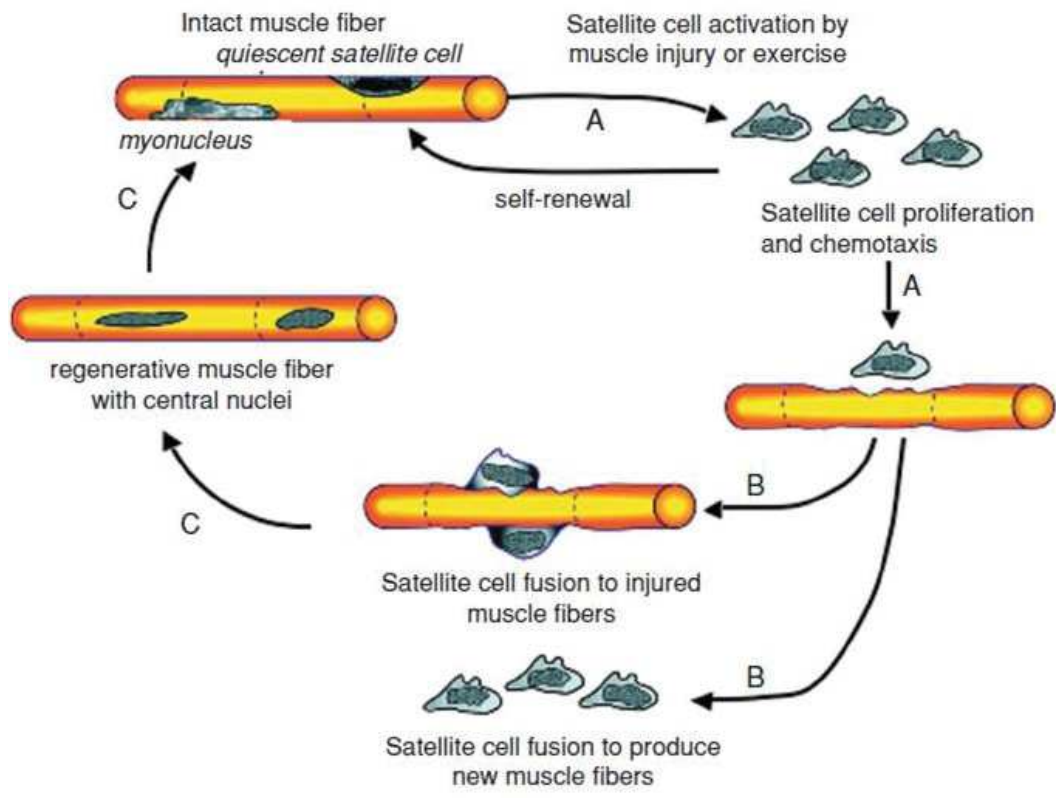


Figure 41 : Régénération des fibres musculaires. La première phase est l'activation des myoblastes quiescents. Les myoblastes, après prolifération, vont fusionner au niveau des fibres endommagées et vont également fusionner entre eux pour donner de nouvelles fibres. Les fibres régénérées ont des noyaux centraux, qui vont migrer en périphérie et donner des myotubes adultes. Adapté de Tidball, 2011

Les myotubes régénérés ont des noyaux centraux qui vont ultérieurement migrer en périphérie. Les myotubes adultes sont ainsi formés. La fusion des myoblastes a lieu au niveau des fibres endommagées ainsi qu'entre eux pour former de nouvelles fibres.

3.10 Le trafic musculaire intracellulaire

Le myotube va progressivement se différencier pour aboutir à une structure bien organisée et bien définie. Au niveau des triades, celles-ci sont constituées de doubles rangées de points (Figure 42) régulièrement réparties.

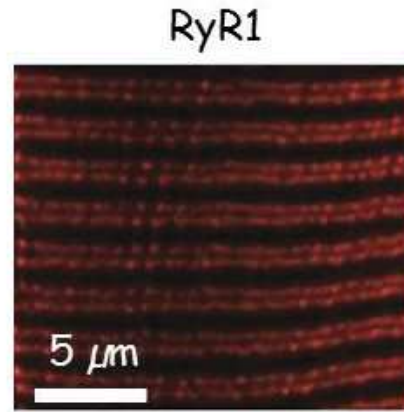


Figure 42 : Immunomarquage de RyR1 dans une fibre musculaire murine dissociée. Le marquage de RyR1 est en doubles rangées de points. Adapté de Osseni et al., 2016.

Cette organisation bien identifiable au niveau des triades est donc progressive. Par ailleurs, même différencié, le myotube peut être régénéré comme nous l'avons vu. Ainsi, le trafic intracellulaire dans les myotubes, comme dans toute cellule, s'opère également. De plus, nous avons vu que l'une des fonctions de la protéine HTT au niveau des neurones est le transport intracellulaire. Qu'en est-il dans le muscle ? Peu d'études ont été entreprises sur le sujet. Les études se sont essentiellement focalisées sur les protéines du couplage excitation contraction, essentielles à la fonction principale du muscle. Deux groupes de protéines peuvent être distingués : celles localisées au niveau de la membrane plasmique et celles localisées au niveau du reticulum sarcoplasmique. Du fait de leur localisation dans les myotubes différenciés, l'hypothèse a été émise de mécanismes de trafic différents. Cependant, les mécanismes en jeu ne sont pas à ce jour établis.

Concernant les protéines de la membrane plasmique impliquée dans le couplage excitation contraction, le DHPR, que nous avons vu, est la seule protéine dont le trafic a été étudié.

Une étude très récente dans des myotubes du modèle zebrafish a montré un trafic de la sous unité α du DHPR le long du reticulum sarcoplasmique (Linsley et al., 2017).

En revanche, la question reste posée de son adressage à la membrane plasmique (Figure 43). L'une des hypothèses est le passage par la voie de l'ERES (endoplasmic reticulum exist site) vers le Golgi puis du Golgi vers la membrane plasmique.

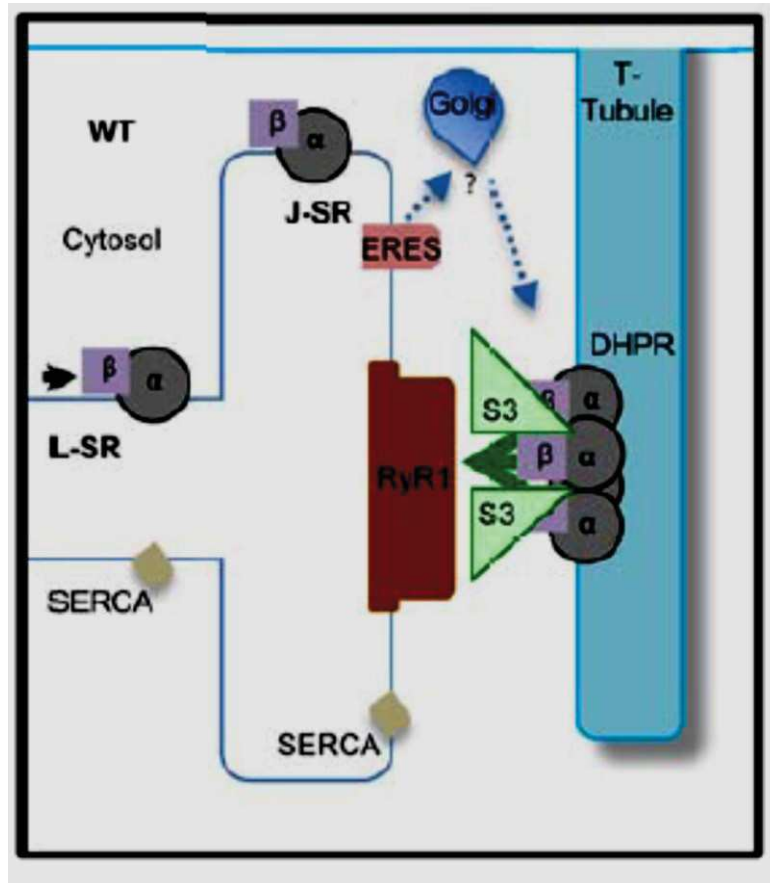


Figure 43 : trafic du DHPR. SR : sarcoplasmic reticulum. ERES (endoplasmic reticulum exist site). Adapté de Linsley et al., 2017.

L'étude du trafic du DHPR dans les cellules cardiaques a montré un adressage vers la membrane plasmique par un transport vésiculaire à clathrines (Fu & Hong, 2016).

Au niveau du muscle squelettique, le trafic du DHPR jusqu'à la membrane plasmique reste à découvrir.

Il en est de même des protéines localisées au niveau du reticulum sarcoplasmique (membrane et lumen). Le trafic des protéines situées dans le lumen et dans la membrane du reticulum sarcoplasmique pourrait avoir lieu par diffusion (RyR1) (Rossi et al., 2008) ou par transport vésiculaire (calséquestrine) (Tijskens et al., 2003).

Les mécanismes du trafic intracellulaire musculaire restent à découvrir et pourraient mettre en jeu une protéine ubiquitaire dont la fonction de trafic a déjà été caractérisée dans les neurones : la huntingtine.

Pour étudier cette hypothèse, nous allons enfin voir en détail que les patients atteints de la MH ont un phénoype musculaire. Les défauts musculaires observés chez les patients comme chez les modèles animaux vont nous permettre d'orienter les études à mener sur le rôle de la huntingtine dans le muscle.

Chapitre IV : les signes musculaires de la maladie de Huntington

4.1 Des anomalies multiples et sévères

Le muscle est également affecté chez les patients atteints de la maladie de Huntington ainsi que chez les modèles animaux de la pathologie (figure 44). Les principales altérations sont l'atrophie et la faiblesse musculaire, un défaut d'excitation contraction, une altération métabolique (défauts au niveau mitochondrial) et une dérégulation transcriptionnelle. L'ensemble de ces défauts est lié à une dégénérescence cellulaire. Des défauts de la jonction neuromusculaire ont également été observés.

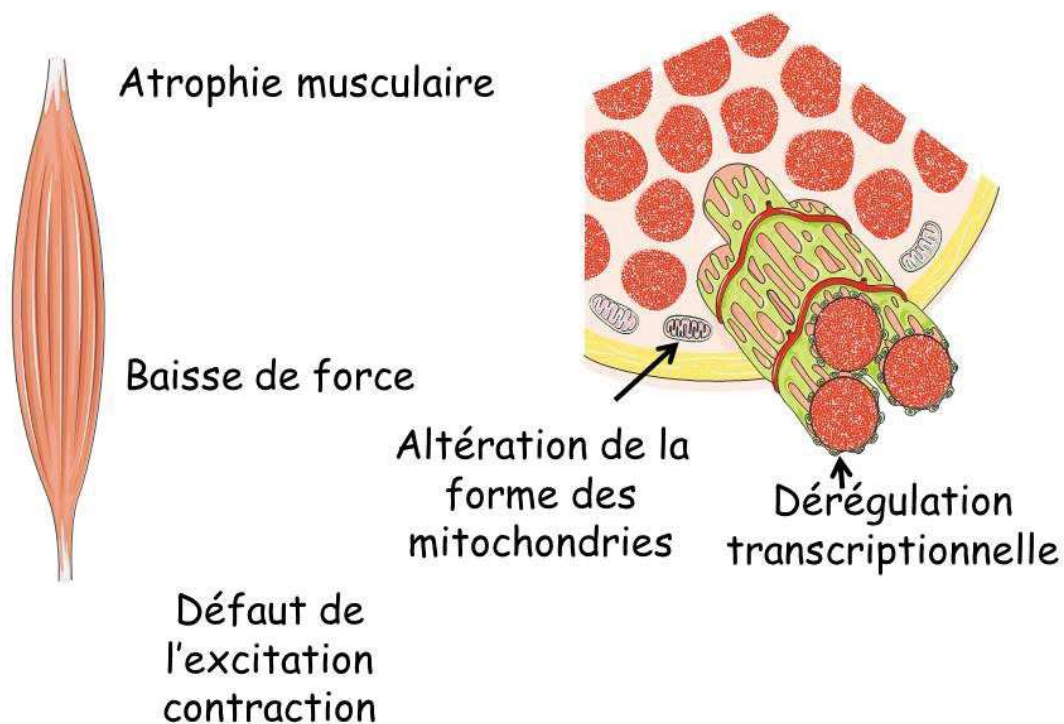


Figure 44 : anomalies musculaires retrouvées chez les patients atteints de la maladie de Huntington : atrophie musculaire, baisse de force, altération métabolique (mitochondries), dérégulation transcriptionnelle.

4.2 Baisse de force et atrophie musculaire

4.2.1 Patients atteints de la MH

Le poids total des patients diminue au fur et à mesure de la progression de la maladie. Une fonte musculaire majeure et un état cachectique à un stade avancé de la pathologie sont observés (Aziz et al., 2008 ; Djoussé et al., 2002 ; Farrer et al., 1985a ; Farrer et al., 1985b ; Mochel et al., 2007 ; Ribchester et al., 2004 ; Robbins et al., 2006 ; Sanberg et al., 1981 ; Stoy et al., 2000 ; Trejo et al., 2004 ; Trejo et al., 2005). Cette perte de poids d'une cohorte de 25 patients avec une moyenne de l'item moteur de l'UHDRS de 55 est d'un peu plus de 12 % (Trejo et al., 2004). La perte de poids est associée à une atrophie musculaire : la même étude montre une diminution de 9,7 % du tour de bras (Trejo et al., 2004). Une étude (Saft et al., 2005) d'une cohorte de 15 patients avec des signes moteurs avancés de la maladie (moyenne de l'item moteur de l'échelle UHDRS de 25,4, valeur normale : 0) présente des défauts musculaires. La force musculaire est en effet diminuée. Lors de la flexion du pied, la force maximale atteinte est statistiquement plus faible d'environ 20 % chez le groupe de patients versus le groupe contrôle (même âge et même sexe). Lors de l'exercice aérobie effectué et l'analyse effectuée en spectrométrie de masse au phosphore 31, le temps de récupération de la phosphocréatine (PCr) est significativement allongé de plus de 66 % (Saft et al., 2005). Associée à cette étude, une biopsie chez un patient décédé (ne faisant pas partie de la cohorte) évoque une centralisation nucléaire et un aspect « granuleux » sur des fibres marquées avec l'anticorps (Ac) 2B4 reconnaissant la partie N-terminal de la protéine HTT. Il n'y a pas de marquage de NADH, ni de quantification de données histologiques (notamment diamètre des fibres, nombre de fibres avec centralisation nucléaire). Cette étude montre ainsi la faiblesse musculaire observée dans la MH et les atteintes musculaires métaboliques lors de l'exercice. Ces dernières sont également observées lors d'une étude antérieure (Lodi et al., 2000) avec un rapport PCr/Pi diminué de plus de 20 % dans une cohorte de 8 patients atteints de la MH versus un groupe contrôle de 12 patients. La faiblesse musculaire est confirmée dans une étude plus récente. Cette étude comprend 20 patients atteints de la MH, le score UHDRS moyen total étant de 48, versus un groupe de 20 sujets sains. L'âge, le sexe et l'indice de masse corporelle (IMC) sont identiques dans chaque groupe. Une étude dynamométrique des membres inférieurs est réalisée (Busse et al., 2008). Elle montre une faiblesse musculaire de l'ensemble des chefs musculaires analysés de la cohorte de patients versus sujets sains. Cette étude est la seule montrant précisément la faiblesse musculaire observée chez les patients atteints de la MH. Des travaux de 2000 montrent également une variabilité de la force

musculaire dans la préhension entre le pouce et l'index, sans identifier de faiblesse (Gordon et al., 2000). Ces travaux mettent cependant en jeu plusieurs phénomènes, puisque peuvent s'associer les troubles cognitifs dans la variabilité de l'exercice. Enfin, un cas a été rapporté d'un patient marathonien porteur de 43 répétitions de triplets CAG (valeur normale en dessous de 35 répétitions) ayant développé des premiers signes à l'âge de 31 ans. Ces signes sont une douleur des muscles proximaux des membres inférieurs, accentuée après l'effort, mouvements involontaires (chorée) débutants des membres inférieurs et supérieurs, début de bradykinésie lors des tests effectués (Kosinski et al., 2007). Ses performances mesurées au cours des marathons depuis les années 1990 sont en très forte diminution avec une moyenne à 160 minutes en 1996 contre plus de 195 minutes en 2004 attestant de la baisse de force musculaire même avec un entraînement régulier (Kosinski et al., 2007).

4.2.2 Modèles animaux de la MH

La faiblesse musculaire est également confirmée sur les modèles murins de la pathologie. Les analyses sur modèles murins de la pathologie confirment le phénotype musculaire marqué. L'atrophie musculaire est quantifiée avec deux modèles murins différents de la pathologie : le modèle R6/2 (exon 1 avec 144 répétitions de triplets CAG) et le modèle HdH150 (protéine murine totale avec 150 répétitions de triplets CAG). L'atrophie est de 20% sur les différents muscles prélevés (quadriceps, gastrocnémien et plantaris, TA) et pour les deux modèles (Mielcarek et al., 2015). Une étude de force isométrique des muscles EDL et TA de souris R6/2 versus WT montre un allongement de 20% du temps nécessaire pour atteindre la force maximale (environ 5 ms supplémentaires) (Mielcarek et al., 2015b). La force musculaire maximale est également diminuée pour les muscles TA et EDL du modèle R6/2 (Mielcarek et al., 2015). Dans une étude antérieure, la force globale mesurée par grip test sur un autre modèle murin (N171-87Q : 171 premiers acides aminés de la HTT avec 87 répétitions de glutamines) est diminuée jusqu'à 33 % (Chaturvedi et al., 2009). Ces deux signes princeps : atrophie et faiblesse musculaire sont également associées à un défaut de l'excitation-contraction et plus particulièrement du relâchement calcique.

4.3 Anomalies du relâchement calcique

Les modèles animaux ont permis également de montrer un défaut du relâchement calcique au niveau musculaire (Braubach et al., 2014).

Le modèle R6/2 a également été utilisé dans cette étude. Présentant tout d'abord une réduction significative du diamètre des fibres, Braubach et al. (2014) utilisent des fibres musculaires dissociées (du muscle interosseux) pour mesurer les relâchements calciques par sonde fluorescente dépendante des potentiels d'action suite à une stimulation extracellulaire. Le type de courbe obtenue a un pattern similaire à celui vu Figure 20. Il y a donc la présence d'un pic, puis une décroissance. Il a été montré une augmentation significative du temps nécessaire pour atteindre le pic, ainsi qu'une différence significative de la décroissance. Les expériences utilisant également les fibres dissociées avec la sonde calcique Fura-2-AM ont montré une diminution significative du pic de calcium dans les fibres du modèle R6/2 comparé à des contrôles (Figure 45). La diminution du pic est de 20% (Braubach et al., 2014).

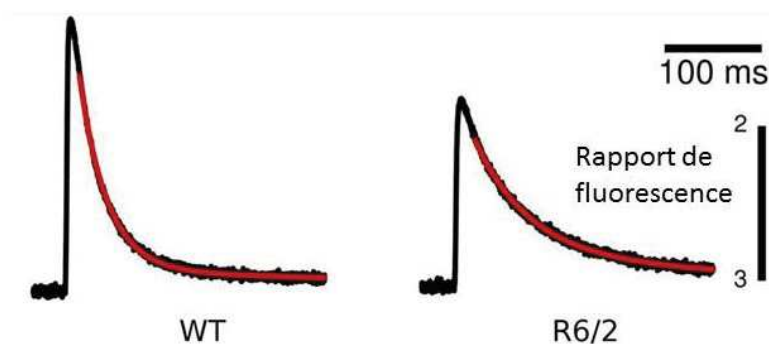


Figure 45 : Réponse de relâchement calcique intracellulaire suite à une stimulation extracellulaire. La partie rouge correspond à la courbe de régression en phase descendante, différente entre le WT et le modèle R6/2. Adapté de Braubach et al., 2014.

La mesure du courant d'une fibre isolée après stimulation électrique (patch clamp) va permettre d'évaluer le niveau minimum nécessaire pour que la contraction ait lieu. Ces expériences ont montré que le seuil d'activation des fibres du modèle R6/2 correspond à un voltage plus bas que les WT.

Ce seuil d'excitabilité plus bas avait par ailleurs été observé avec le modèle R6/2. Il est décrit en association avec une diminution des transcrits mRNA du canal voltage dépendant chlore *Clcn1* et une diminution de la conductance de ce canal (Waters et al., 2013). Cette altération du canal chlore avait également été retrouvée dans la dystrophie myotonique de type 2 (Ursu et al., 2012). Les canaux calciques permettent de réguler le potentiel de membrane. Associés à ces défauts calciques, les mitochondries sont également altérées.

4.4 Anomalies mitochondriales

Au niveau mitochondrial, une localisation anormale de mitochondries ainsi qu'un gonflement des mitochondries sont observées (figure 46). Les mitochondries sont localisées en ultrastructure de part et d'autre de la ligne Z. Des localisations aberrantes sont observées dans le modèle murin N171-87Q de la pathologie.

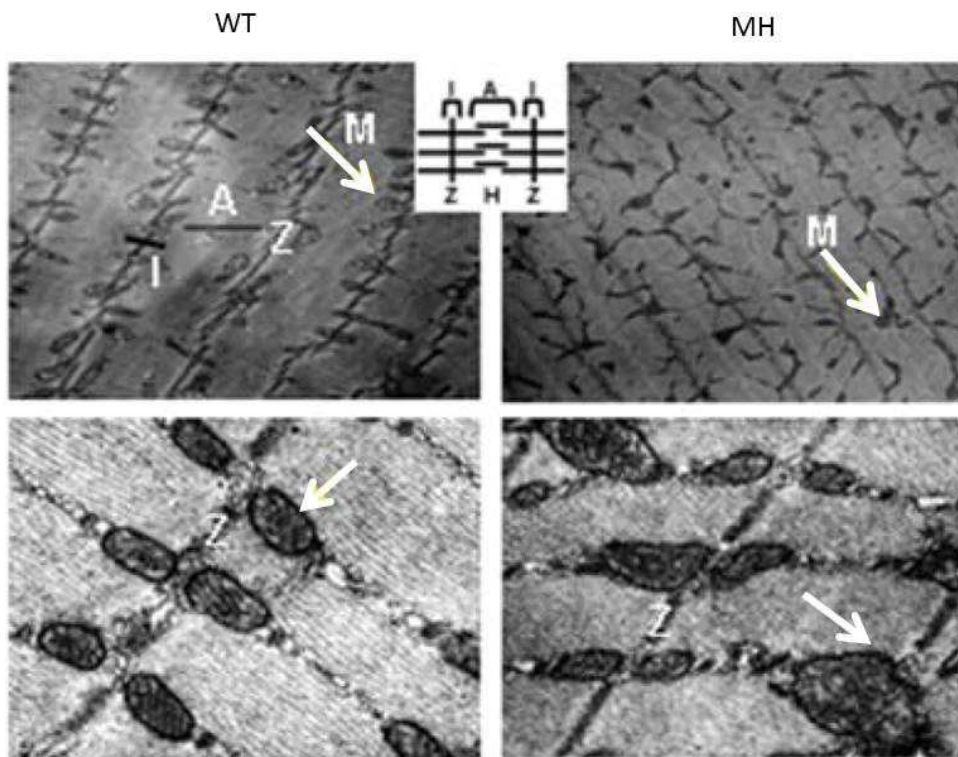


Figure 46 : Microscopie électronique à transmission du muscle soleus de souris WT versus modèle de la maladie de Huntington MH (modèle N171-87Q). En haut, grossissement 4800x, en bas, 19000X. La structure normale est composée des bandes A, I et ligne Z. M : mitochondrie. Adapté de Chaturvedi et al., 2009.

De plus, les expériences de gonflement des mitochondries montrent une susceptibilité augmentée dans le modèle de la MH R6/2 (Gizatullina et al., 2006). Associée aux anomalies mitochondriales, une diminution majeure de la concentration d'ATP des muscles TA et EDL est observée dans le modèle HdH150 (Mielcarek et al., 2015b).

Les différents modèles animaux de la MH présentent des défauts musculaires à type d'atrophie, faiblesse, défauts de relâchement calcique, altération du métabolisme, qui ont pu

être également décrits chez les patients. Un autre élément est présent : la dérégulation transcriptionnelle. La présence de la mutation engendre une modification des transcrits pouvant avoir une conséquence fonctionnelle musculaire. Les études sont menées sur des modèles murins de la pathologie.

Le cas rapporté du patient marathonien montre lors de la biopsie du muscle gastrocnémien la présence de fibres dégénérées, une augmentation de fibres à noyaux centraux, une diminution du diamètre de quelques fibres, associés, au niveau du métabolisme, à une accumulation mitochondriale au niveau subsarcolemmal (Figure 47). Il y a une réduction de l'activité du complexe IV cytochrome oxydase (Kosinski et al., 2007).

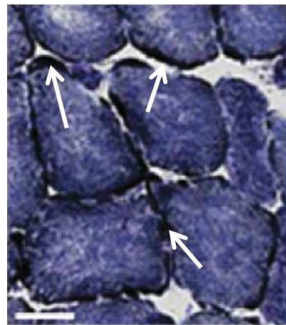


Figure 47 : biopsie musculaire d'un patient de 37 ans avec MH (43 répétitions de triplets CAG). Coloration NADH. Accumulation de mitochondrie au niveau subsarcolemmal (flèches blanches). Barre d'échelle 50µm. Adapté de Kosinski et al., 2007.

Une étude antérieure montre un défaut du complexe I chez des patients atteints de la MH (Arenas et al., 1998).

4.5 Dérégulation transcriptionnelle

En effet, une dérégulation transcriptionnelle est observée : dérégulation des facteurs de transcription du domaine TEA (Mielcarek et al., 2015), ainsi que le récepteur à l'acétylcholine nicotinique, *FOXO-3* (Forkhead box O3, qui régule notamment la voie de signalisation Notch), *caspase 8* (impliquée dans le clivage de chaîne polypeptidique, protéine fortement exprimée dans le muscle) et *HDAC4* (Histone déacetylase 4, impliqué notamment dans la différenciation myofibroblastique, mais également dans les processus d'autophagie) dont les transcrits sont augmentés dans le muscle des modèles murins R6/2 et Hdh150 (Mielcarek et al., 2015). D'autres analyses antérieures montrent également une dérégulation

transcriptionnelle au niveau du muscle, comme cela a été identifié au niveau neuronal (Luthi-Carter et al., 2002 ; She et al., 2011 ; Strand et al., 2005).

4.6 Dégénérescence cellulaire

Les défauts musculaires observés : atrophie, baisse de force, altérations des relâchements calciques, altérations au niveau des mitochondries et dérégulation transcriptionnelle, corroborent l'une des observations faites de dégénérescence cellulaire. En effet, des cellules musculaires de patients ont été mises en culture (Ciammola et al., 2006). Il a été observé une augmentation de l'apoptose (Figure 48) avec des clusters dans les myotubes dont un co-marquage montre la présence de la huntingtine et de l'ubiquitine.

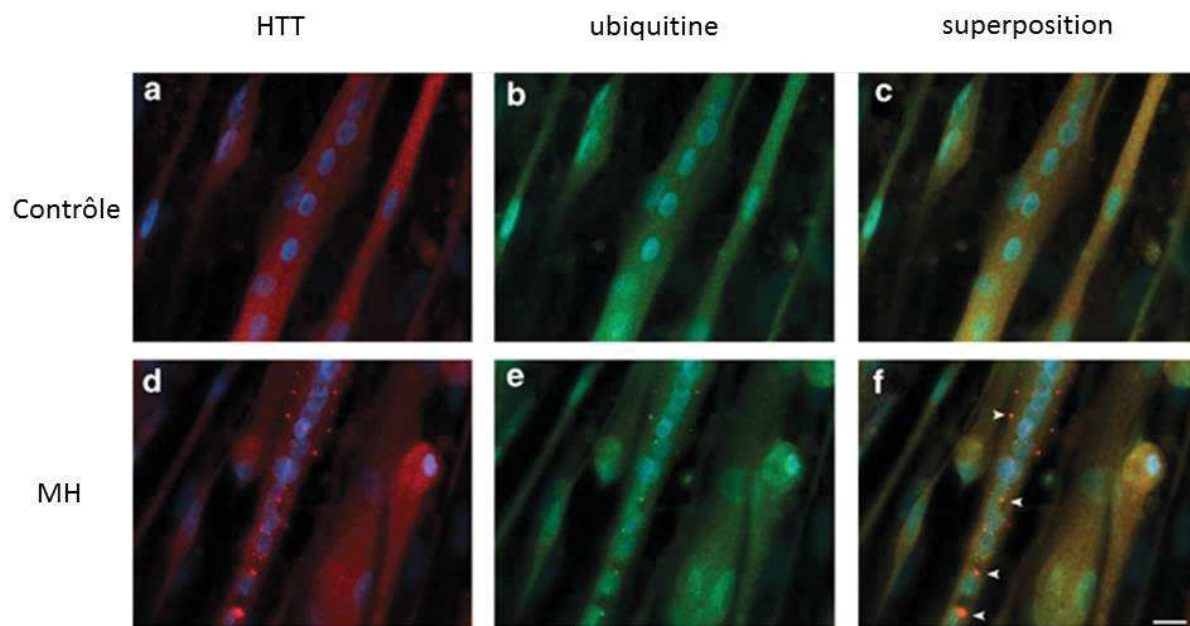


Figure 48 : myotubes de sujets sains (contrôle, a, b, c) et de patients atteints de la MH (d, e, f). Immunomarquage avec un anticorps anti-huntingtine en rouge (a, d), ubiquitine en vert (b, e) et la superposition des deux (c, f). Barre d'échelle 10µm. Adapté de Ciammola et al., 2006.

Associés aux défauts musculaires intrinsèques, d'autres défauts, notamment de la jonction neuromusculaire ont pu être identifiés.

4.7 Défauts de la jonction neuromusculaire

Les défauts musculaires observés sont associés également à des défauts de la jonction neuromusculaire (Ribchester et al., 2004). Les observations du modèle murin R6/2 montrent en effet un défaut des neurofilaments, qui sont sténosés par endroit, et qui comportent des zones supplétives à d'autres endroits (Figure 49). Il y a également l'absence de récepteurs à l'acétylcholine au niveau de certaines zones de la plaque motrice (Ribchester et al., 2004).

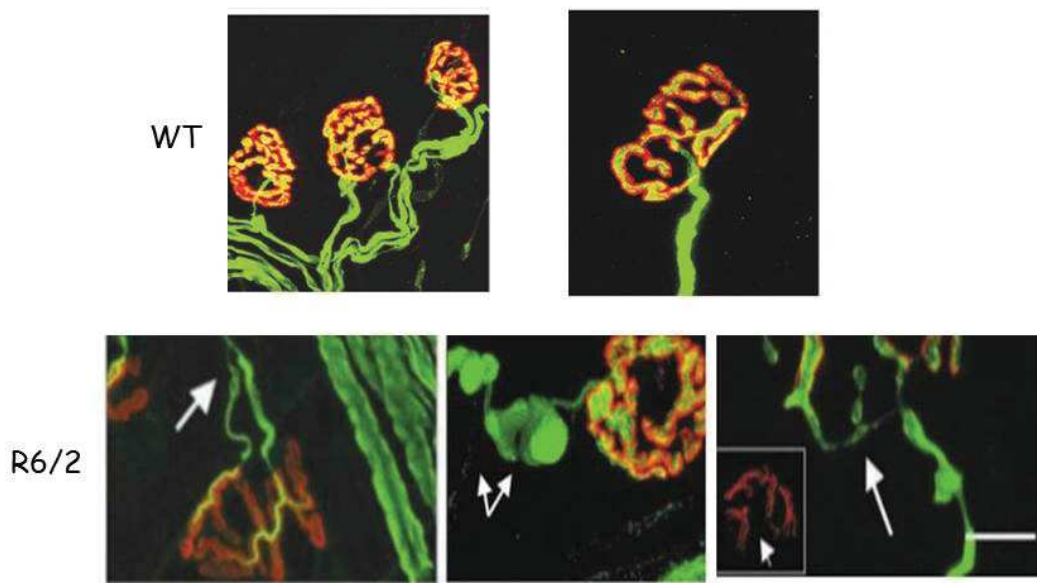


Figure 49 : immunomarquage de neurofilaments (vert) et des récepteurs à l'acétylcholine (rouge) d'une jonction neuromusculaire WT (en haut) et de modèle murin R6/2 de la MH (en bas). Présence d'anomalies des neurofilaments avec sténose et zone supplétive de neurofilaments. Absence de récepteurs à l'acétylcholine au niveau de certaines zones de la plaque motrice terminale. Barre d'échelle 20 μ m. Adapté de Ribchester et al., 2004.

Investiguer et comprendre les causes des atteintes périphériques devient alors un enjeu pour tester des thérapeutiques plausibles (Carroll et al., 2015 ; Martin et al., 2008 ; Mielcarek et al., 2015a ; Zielonka et al., 2015). A cet effet, il est nécessaire de comprendre les mécanismes moléculaires impliquant le gène de la huntingtine ainsi que la protéine mutée et non mutée, résultantes de l'anomalie génique.

Objectifs de thèse

Mes travaux de thèse ont pour objectif une meilleure compréhension du(des) rôle(s) de la huntingtine dans le muscle.

L'hypothèse est que la huntingtine, protéine ubiquitaire, pourrait avoir une fonction dans la dynamique intracellulaire musculaire, son absence entraînant ainsi des altérations de la fonction musculaire. Mes travaux se fondent sur les quatre éléments suivants. Tout d'abord, des défauts musculaires ont été observés dans la maladie de Huntington, chez les patients et les modèles murins de la pathologie. Ensuite, ces défauts mettent en jeu la huntingtine, protéine ubiquitaire. Puis, la huntingtine est connue pour être une protéine associée aux microtubules, ayant une fonction de transport intracellulaire neuronal, ayant un rôle dans l'homéostasie calcique neuronale et permettant d'établir des points de contacts entre le reticulum endoplasmique (RE) et la membrane plasmique (MP). Enfin, ce dernier point est corroboré par une phénocopie de la MH impliquant directement la junctophiline 3 dont la fonction essentielle est ce maintien entre le RE et la MP.

Si les fonctions de la huntingtine non mutée ont été étudiées au niveau neuronal, aucune publication, à ce jour, ne met en relief la fonction ou les fonctions de cette protéine dans le muscle. Aucune étude ne montre même l'expression de la huntingtine dans le muscle.

Mon travail a donc consisté tout d'abord à caractériser la huntingtine dans le muscle : est-elle exprimée et sous quelle(s) isoforme(s)? J'ai donc montré que la huntingtine était exprimée dans le muscle (Partie I).

Puis, en l'absence de huntingtine dans le muscle, des défauts, notamment fonctionnels, sont-ils observés ? Ces défauts pourraient en effet contribuer à la pathologie.

Au niveau cellulaire, j'ai développé des modèles de myotubes dont l'expression de la huntingtine est abaissée et qui montrent une altération de la fonction principale : les relâchements calciques (Partie II).

J'ai créé une nouvelle lignée de modèles murins dont l'expression de la huntingtine est diminuée spécifiquement dans le muscle et j'ai pu montrer que la fonction musculaire est altérée (Partie III).

Enfin, j'ai étudié différents fragments de la huntingtine en imagerie calcique pour comprendre plus précisément le rôle de la huntingtine (Perspectives).

Matériels & méthodes

Chapitre I : Les cellules

Quatre types cellulaires ont été utilisés dans les présents travaux de thèse.

1.1 Culture primaire de cellules satellites

Les muscles de souris nouveau-nées sont prélevés et dissociés manuellement dans un premier temps. Une digestion par la trypsine 0,1% a lieu ensuite pendant 30 minutes. Les cellules sont ensuite centrifugées à 1500 rpm pendant 10 minutes. Le culot obtenu contient ainsi une majorité de cellules satellites. Celles-ci sont cultivées en milieu de prolifération (Ham's F10, 20% sérum de veau foetal, 2% d'Ultroser G, 2% pénicilline – streptomycine) dans des boîtes de culture recouvertes de laminine. A 70 à 80% de confluence, elles sont congelées dans un milieu congélation : 65%HAM F10, FBS 25%, 10% DMSO, à hauteur de 1 à 1,2 millions de cellules par ml.

Les cultures primaires de cellules murines ainsi préparées comportent également d'autres populations cellulaires comme des fibroblastes.

J'ai utilisé des cultures primaires murines de plusieurs phénotypes (voir chapitre VI).

Au moment de leur utilisation, les cellules sont décongelées en milieu de prolifération, puis après 12 à 24 heures de culture, elles sont placées en différenciation dans un milieu (DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) Glutamax Glucose 1g/l, 5% de sérum de cheval, 1% de pénicilline-streptomycine) jusqu'à formation des myotubes.

L'utilisation de ces cellules me permet de tester *in vitro* la fonction du muscle, notamment les relâchements calciques avec les tests d'imagerie calcique.

1.2 Myotubes humains immortalisés

L'équipe de Vincent Mouly à l'Institut de Myologie à Paris a immortalisé des myoblastes humains d'une biopsie d'un sujet sain. La lignée immortalisée a été obtenue par une double transduction par un lentivirus codant pour la télomérase et un lentivirus codant pour Cdk4.

Les cellules sont cultivées comme les cellules murines.

Deux raisons amènent à l'utilisation de cette lignée : il s'agit d'un modèle *in vitro* mais humain, de plus, cette lignée cellulaire contient uniquement des myoblastes.

1.3 Fibres musculaires murines dissociées

Les fibres dissociées proviennent des muscles *tibialis anterior* ou *flexor digitorum brevis*. Les muscles sont prélevés puis fixés pendant 30 minutes dans de la PFA 4%. Une perméabilisation pendant 45 minutes à 30°C dans du PBS-Triton 1% a lieu. Un marquage immunofluorescent est ensuite effectué.

Les fibres musculaires dissociées représentent un modèle de cellules musculaires adultes différenciées comme décrites au paragraphe 1.1. L'analyse des fibres dissociées apporte un complément à l'utilisation de la lignée cellulaire et des cultures primaires précédemment décrites.

1.4 Cellules HEK

Les cellules HEK293T (cellules embryonnaires humaines immortalisées) ont été utilisées pour la production de lentivirus. Le milieu de culture utilisé est composé de DMEM 4.5 g/L glucose pyruvate + 10% de sérum de veau fœtal + 1% de pénicilline-streptomycine). Après décongélation, 500 000 cellules sont déposées dans des boîtes de culture 100 mm et cultivées jusqu'à une confluence de 70 à 80% pendant 3 jours. L'objectif est d'obtenir 2 500 000 cellules par boîte de culture 100 mm. Le protocole de production des lentivirus (chapitre IV) est ensuite appliqué.

Chapitre II : Biochimie

J'ai effectué des analyses par Western-Blot de la huntingtine et des protéines de la triade. J'ai utilisé des lysats cellulaires et des homogénats de muscles squelettiques murins.

2.1 Lysats cellulaires

Pour l'analyse par western-blot des protéines contenues dans les cellules murines issues de cultures primaires ou dans les cellules humaines immortalisées, les cellules sont tout d'abord collectées par trypsination ménagée. Les cellules sont lavées au PBS puis culotées (2000rpm, 10 minutes). Les culots, sur glace, sont ensuite suspendus dans un tampon de lyse (NaCl 15 mM et EDTA 1mM) avec des inhibiteurs de protéase : PMSF à 400 μ M (fluorure de phénylméthanesulfonyle) + DFP à 100 μ M (di-isopropyl fluorophosphate). Les cellules sont soniquées sur glace 12 x 1s à 20 % de la puissance maximale. Le lysat est enfin dosé par la méthode de Folin Lowry et conservé dans de l'azote ou à -20°C.

2.2 Homogénats de muscles et d'encéphale

Les différents tissus à analyser sont prélevés (tibialis anterior, extensor digitorum longus, quadriceps, gastrocnémien, diaphragme, soleus, cerveau). Chaque tissu est congelé dans l'azote liquide.

Lors de la réalisation de l'homogénat, le tissu est décongelé et lysé par Minilys dans un tampon contenant : sucrose 200 mM, Hepes 20 mM pH 7.4, CaCl₂ 0.4 mM) avec ajout d'inhibiteurs de protéases (PMSF à 400 μ M + DFP à 100 μ M). La lyse dure 3 fois 20 secondes avec une minute dans la glace à chaque intervalle.

Les homogénats sont ensuite dosés et conservés à -80°C.

2.3 Dosage des protéines par la méthode de Folin Lowry

Afin de doser les homogénats et/ou lysats cellulaires, la technique de Folin Lowry (Lowry et al., 1951) est employée. Il s'agit de réaliser une gamme de 0µg/µl à 50 µg/µl de Bovine serum albumine (BSA). La BSA est ajoutée dans un tube à hémolyse à 10 µl de SDS 20% puis 2,5 ml d'un mélange à volume égal composé de d'EDTA-Cu²⁺ à 0.005% et de NaCO₃ à 4% + NaOH à 0.2 mM. Le réactif de Folin (125µl) est ajouté, le tube est immédiatement vortexé. Le même procédé est réalisé en remplaçant la BSA par les échantillons à doser. La totalité des tubes est ensuite placée dans l'obscurité pendant 45min. Le dosage est réalisé par absorbance à 660nm. Un calcul de régression permet d'obtenir la concentration en protéines en fonction de l'absorbance pour la gamme de BSA. Ainsi, la mesure de l'absorbance des échantillons donne la concentration protéique en µg/µl.

2.4 Western-Blot

Les homogénats et les lysats cellulaires sont décongelés.

Les gels sont réalisés au laboratoire. La quasi-totalité des gels sont des gels gradients 5%-15%, permettant ainsi de voir les protéines de haut poids moléculaires (dont la Huntingtine) et les protéines de poids moléculaires beaucoup plus bas.

Les échantillons sont dilués dans du tampon de dénaturation Laemmli (Laemmli, 1970). La migration est ensuite effectuée à Ampère constant (0,04A) dans un tampon de migration (Tris 25 mM, glycine 192 mM, SDS 0.1%) pendant 45 minutes à 60 minutes. Après migration, un transfert sur une membrane d'Immobilon P (Millipore) dans du tampon de transfert (éthanol 10%, Tris 25 mM, glycine 192 mM, SDS 0.025%) à ampérage constant (0,8A) pendant 240 min est effectué sous réfrigération. Après saturation 30 min dans du tampon de saturation contenant 0.3% de Tween 20 dans du PBS supplémenté avec 4% de lait (Blotting Grade Blocker Non Fat Dry Milk, BioRad). Les membranes sont incubées avec les anticorps primaires dilués dans du tampon de saturation sous agitation pendant une nuit à 4°C. Après trois lavages de 10 min dans du PBS 0,3% Tween 20 les membranes sont incubées avec les anticorps secondaires couplés à la peroxydase pendant 2 heures. Après trois lavages de 10 min dans du PBS 0.3% Tween 20 la révélation est faite avec un substrat chemiluminescent de la peroxydase Pierce ECL ou super pico ECL selon le protocole du fournisseur. La révélation est acquise sur un Chemidoc XRS. Les données générées sont traitées à l'aide du logiciel Quantity One v4.6.6.

Chapitre III : Les anticorps

Deux types d'anticorps ont été utilisés : les anticorps primaires et les anticorps secondaires.

3.1 Anticorps primaires

Nom	Protéine	Espèce	Fabricant
1C2	Huntingtine	souris	Sigma
2C1	Huntingtine	souris	Sigma
4C8	Huntingtine	souris	IGBMC Strasbourg
DHPR	DHPR	souris	Abcam
EPR5526	Huntingtine	lapin	Abcam
GAPDH	GAPDH	souris	Sigma
JPH1	Junctophiline 1	lapin	Sigma
LC3	LC3	souris	Sigma
P62	P62	souris	Sigma
RyR1 34C	RyR1	souris	DSHB USA
RyR1 Porc	RyR1	lapin	Notre équipe
Trisk 95	triadine	lapin	Notre équipe
Tub 2.1	tubuline	souris	Sigma

3.2 Anticorps secondaires

Nom	Espèce	Fabricant
Alexa 488	Souris Lapin cobaye	Invitrogen
Alexa 546	Souris Lapin cobaye	Invitrogen
Cyanine 3	Souris Lapin	Jackson
Cyanine 5	cobaye	Jackson
HRP	Souris Lapin	Jackson

3.3 Marquage immunofluorescent

Les cellules sont tout d'abord fixées avec de la PFA 4% pendant 20 minutes. Trois lavages sont ensuite effectués au PBS de 5 minutes chacun. Les cellules ou les fibres sont perméabilisées avec du Triton 1% pendant 15 minutes pour les cellules et 45 minutes pour les fibres. Trois lavages sont ensuite réalisés au PBS-Triton 0,1%, 5 minutes chacun. Les anticorps primaires sont ensuite ajoutés dans une solution de saturation comprenant : du PBS-Triton 0,1% X-100, 0,5% de BSA (bovin serum albumine) et 2% de sérum de chèvre. Les anticorps primaires sont laissés 16 heures en présence des cellules ou des fibres. Puis trois lavages sont effectués. Les anticorps secondaires sont ajoutés dans la solution de saturation pendant 2 heures. Trois lavages au PBS Triton 0,1% sont effectués. Une coloration au PBS-Hoechst 1/1000^{ème} pendant 10 minutes est effectuée. Enfin le montage sur lame ou sur Ibidi est réalisé avec du FluorSave. Les images sont acquises avec un microscope confocal Leica SPE ou Zeiss LSM710. Les données sont traitées avec les logiciels Image J et Adobe Photoshop 7.0.

Chapitre IV : Les virus

Trois classes de virus ont été utilisées : les Adeno-associated Virus (AAV), les adénovirus et les lentivirus.

4.1 Les Adeno-associated virus (AAV)

J'ai utilisé des AAV sérotype 8 (Généthon) avec le promoteur desmine et exprimant la Cre recombinase. 15µl de virus ($3 \cdot 10^9$ particules) ou de PBS stérile ont été injectés dans le tibialis anterior de souris HTT fl/fl contenant des sites loxP de part et d'autre de l'exon 1 du gène de la huntingtine sur les 2 allèles. Les AAV proviennent de l'équipe d'Anna Buj-Bello. Un MTA (material transfert agreement) a été signé.

4.2 Les adénovirus

J'ai utilisé des adénovirus pour diminuer l'expression de la huntingtine dans les myotubes issus de cultures primaires de souris HTT fl/fl contenant des sites loxP de part et d'autre de l'exon 1 du gène de la huntingtine. Les adénovirus utilisés sont des Ad5CMVCre : adénovirus exprimant la Cre-recombinase sous la dépendance du promoteur CMV. Le titre est de $4 \cdot 10^{10}$ particules virales par ml. J'ai également utilisé des adénovirus contrôles Ad5CMV-GFP (Généthon, titre 10^{14} particules par ml).

Le protocole de transduction virale des cellules musculaires est le suivant : mise en culture à J0 des cellules issues de cultures primaires du génotype HTT fl/fl. Les cellules sont mises en culture sur des boîtes P35 revêtues de laminine à une densité de 50 000 cellules par boîte. La transduction est effectuée 4 heures après mise en prolifération avec 8 particules virales par cellule (multiplicity of infection – MOI 8). Les cellules sont ensuite mises en différenciation 16 heures plus tard. Une transduction par un virus contrôle (Ad5CMV – GFP) est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions.

4.3 Les lentivirus

J'ai produit des lentivirus dans le laboratoire P2 virologie de l'Institut, en binôme avec Julie Brocard. Les vecteurs lentiviraux ont été produits dans des cellules HEK293T. A J1, 2,5 millions de cellules HEK293T par boîte de culture 100 mm sont transfectées (CalPhos™ Mammalian, Clontech) avec trois plasmides : pWPXLd 4µM, psPAX2 4µM et pVSV-G 4µM contenant les gènes de l'enveloppe virale. A J2, le milieu est changé. A J3, le milieu est récupéré et centrifugé (2000rpm, 5 minutes). Le surnageant est filtré puis centrifugé (4000rpm, 24 heures). Le culot, contenant les particules virales, est repris dans un milieu de culture (D-MEM 4.5 g/l glucose 10%, sérum de veau fœtal, 1% pénicilline-streptomycine). Des aliquots de 20µl sont réalisés et congelés dans l'azote liquide et conservé à -80°C.

Les virus sont ensuite titrés par cytométrie en flux. 200 000 cellules HEK293T sont transduites avec une gamme virale de 1µl à 10µl. Après deux jours de culture, les cellules sont récupérées et analysées par cytométrie en flux. Les réglages sont menés selon la protéine fluorescente ajoutée dans la construction. Dans mon cas, il s'agit de la protéine mCherry. Le pourcentage de cellules exprimant mCherry est mesuré par cytométrie en flux et calculé suivant la formule :

$$\text{Titre} = \text{nombre de cellule à 2 Jours} \times \text{facteur de dilution} \times \left(\frac{\% \text{ de cellules GFP positives}}{100} \right) \times \frac{(\mu\text{l de milieu})}{(\mu\text{l de virus})} = \frac{\text{UI}}{\text{ml}}$$

UI : Unités Infectieuses

Les productions de lentivirus effectuées ont donné des titrations autour de 1.10^7 UI par ml.

Les lentivirus créés contenaient deux inserts : un utilisant un fragment N-ter de la huntingtine (acides aminés 1-588) (Pardo et al., 2010, Figure 50), ce fragment été choisi pour être résistant au lentivirus shRNA huntingtine (voire paragraphe suivant) et un fragment C-ter (acides aminés 2800 à 3144). Les plasmides proviennent de l'équipe de Frédéric Saudou.

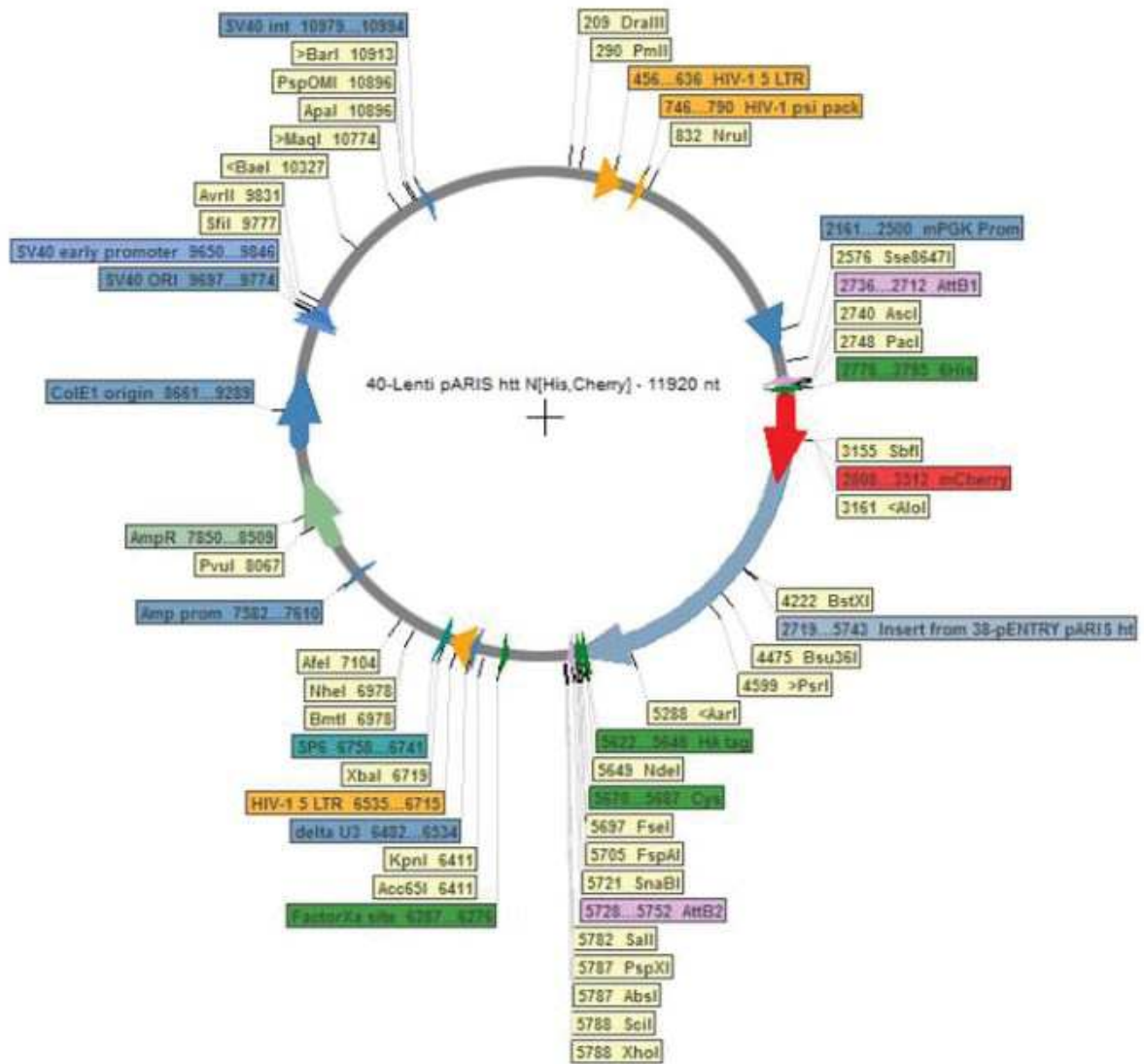


Figure 50 : plasmide contenant le fragment 1-586 acides aminés de la huntingtine, utilisé pour fabriquer les lentivirus.

Les lentivirus ont été utilisés dans le cadre d'infections de myotubes de cultures primaires WT ou KO triadine (déplétées en protéine triadine, cultures primaires réalisées par Muriel Sébastien et Perrine Teyssier du laboratoire).

Par ailleurs, j'ai utilisé des lentivirus réalisés par la Plateforme de Vectorologie de la SFR BioSciences Gerland – Lyon Sud (UMS 3344 / US8). Deux types de lentivirus ont été utilisés : d'une part des lentivirus shRNA huntingtine et d'autre part un lentivirus contrôle : lentivirus shRNA luciférase.

Le protocole d'infection des cellules musculaires est identique au protocole précédent avec les adénovirus. Brièvement, mise en culture à J0 des cellules issues de cultures primaires du génotype choisi (souris WT, cellules musculaires humaines immortalisées). Les cellules sont mises en cultures sur des boîtes P35 revêtue de laminine. 50 000 cellules sont déposées dans chaque boîte P35. La transduction est effectuée 4 heures après mise en prolifération à multiplicity of infection (MOI) 1. Les cellules sont ensuite mises en différenciation 16 heures plus tard.

Chapitre V : Imagerie

Les lots de souris sont anesthésiés par Isoflurane (maintien 2%, débitmètre 02 : 2L/min). L'imagerie a été réalisée sur des cellules ou des fibres dissociées fixées en imagerie confocale pour étude de localisation protéique et sur des cellules vivantes avec imagerie calcique et étude du trafic.

5.1 Imagerie calcique avec cellules vivantes

Les cellules musculaires (humaines ou murines) sontensemencées à 50000 cellules sur une boîte P35 revêtue de laminine (50µl). Après 2 jours (souris) ou 4 jours (humains) de différenciation, les relâchements de calcium sont analysés. Après un rinçage au PBS, les cellules sont chargées par la sonde calcique Fluo4-AM diluée au 1/1000^{ème} pendant 60 minutes à 20°C. Après deux lavages au PBS, les cellules sont placées dans du milieu de culture pendant 30 minutes à 37°C pour permettre la désestérification de la sonde. Puis, le milieu est retiré, du Krebs glucosé (NaCl 136mM, KCl 5mM, CaCl₂ 2mM, MgCl₂ 1mM, HEPES 10mM, pH 7,4) est ajouté et les boîtes sont placées sur la platine du microscope (LEICA, SPE), objectif 10x. La fluorescence est enregistrée à raison d'une image par seconde pendant 90 secondes. La libération de calcium est induite par ajout d'un ml de solution choisie (KCl 140mM avec ou sans calcium externe 2 mM et 4-CmC 500µM) au bout de 10 secondes. Une seule stimulation par boîte est réalisée.

Les images sont ensuite analysées avec Image J, Calsignal et Graphpad.

5.2 Etude du trafic avec cellules vivantes

Deux types d'expériences ont été menés pour étudier le trafic. Le premier concerne le trafic de fragments de la huntingtine qui ont été transduits dans des myotubes issus de cultures primaires. Le second concerne l'analyse du trafic d'une protéine de la triade, la triadine, après diminution d'expression de la huntingtine.

5.2.1 Trafic de la huntingtine

Des myotubes murins issus de cultures primaires de souris KO triadine sont mises en différenciation. Les cellules sont transduites avec un lentivirus contenant la triadine comme contrôle (MOI 1). Puis les cellules sont transduites avec un lentivirus que j'ai produit au laboratoire contenant la partie N-terminale de la huntingtine (acides aminés 1- 588) ou un lentivirus contenant la partie C-terminale de la huntingtine (acides aminés 2800-3144) (MOI 8). Les cellules sont analysées après 72 heures avec le microscope confocal Zeiss LSM710 ou le microscope confocal Zeiss avec spinning disk permettant des acquisitions plus rapides (une image par seconde). Les films réalisés sont ensuite analysés avec le logiciel Image J.

5.2.2 Trafic de la triadine

Dans des myotubes dont l'expression de la huntingtine est fortement diminuée, la mise en place technique a été réalisée par Muriel Sébastien et Perrine Teyssier au laboratoire. Des myotubes murins issus de cultures primaires de souris KO triadine sont mis en différenciation. Les cellules sont transduites avec un lentivirus sh huntingtine afin de diminuer l'expression de cette dernière. Puis les cellules sont transduites avec un lentivirus contenant la triadine-GFP (MOI 1). Les cellules sont analysées après 72 heures avec le microscope confocal Zeiss LSM710 ou le microscope confocal Zeiss avec spinning disk permettant des acquisitions plus rapides (une image par seconde). Les films réalisés sont ensuite analysés avec le logiciel Image J. Des régions d'intérêt sont mesurées. Le nombre de clusters de protéine triadine exprimant la GFP est compté dans chaque région. Le nombre de clusters en mouvement est compté également. La fraction mobile (nombre de clusters en mouvement/ nombres de clusters totaux) est alors calculée.

Chapitre VI : Modèles animaux

Afin de déterminer les fonctions de la huntingtine dans le muscle adulte, et comme le modèle KO huntingtine est létal, j'ai créé un modèle avec extinction de la huntingtine dans les muscles squelettiques.

A cette fin, j'ai suivi la formation expérimentation animale de niveau 1 et j'ai obtenu le certificat d'autorisation à expérimenter sur animaux vivants délivré par la direction départementale de la protection des populations. J'ai rédigé et soumis le projet à des fins d'expérimentation animale au comité d'éthique n°4 (Annexe I) qui a rendu un avis favorable (dossier 2016053008307403).

J'ai également utilisé un modèle murin de la pathologie Q140.

6.1 Modèle murin avec extinction de la huntingtine dans le muscle

Les animaux ont été produits par croisement de souris *HTT* fl/fl contenant des sites loxP de part et d'autres de l'exon 1 du gène de la huntingtine, provenant de l'équipe de Frédéric Saudou, avec des souris exprimant la Cre recombinase sous la dépendance du promoteur HSA (Human skeletal actin, permettant l'expression uniquement au niveau du muscle squelettique), par Julie Brocard au laboratoire, qui s'est chargée du génotypage des animaux (Figure 51). Dix backcross ont été effectués afin d'obtenir un fond génétique C57Black 6 J.

Les expériences ont été réalisées sur des souris mâles et femelles âgées de 6 semaines.

Les animaux utilisés expriment d'une part le gène de la *HTT* avec deux sites loxP situés de part et d'autre de l'exon 1, et d'autre part la recombinase Cre sous l'influence d'un promoteur HSA – ERt2. Le promoteur HSA-Cre-ERt2 permet l'expression de la recombinase Cre uniquement dans le muscle squelettique, après induction par le tamoxifène (Figure 51). Pour induire l'expression de la Cre puis une recombinaison, 5 injections intrapéritonéales de 100µl tamoxifène seront réalisées, une par jour. Le tamoxifène (réf Sigma, T5648) est dilué dans de l'éthanol puis émulsionné dans de l'huile de tournesol (réf Sigma, T5007) (éthanol/huile en mélange 10/90) à la concentration de 10mg/ml.

Souris KO inductible muscle spécifique



Figure 51 : Lignée KO huntingtine spécifique du muscle. Cette lignée provient du croisement de deux lignées. L'une exprimant la Cre recombinase sous la dépendance du promoteur muscle spécifique HSA, l'autre lignée comportant des sites LoX P de part et d'autre de l'exon 1 du gène de la huntingtine.

En vue de mesurer la force musculaire globale des souris de cette lignée, un test d'agrippement est effectué.

Test d'agrippement

Les souris sont posées sur une grille qui est retournée. La force globale de la souris est évaluée par la mesure du temps qu'elle reste accrochée à la grille. Après un entraînement de chaque souris (3 fois par semaine pendant deux semaines lors de l'injection du tamoxifène, durant maximum 3 minutes au début puis 5 minutes), le test est arrêté au bout de 5 min si la souris n'est pas tombée. Trois essais sont réalisés. Le meilleur temps est sélectionné. Le test est réalisé une fois par semaine après la période d'entraînement.

De plus, afin d'obtenir des premiers résultats plus rapidement sur le poids du muscle et la baisse d'expression de la HTT dans le muscle squelettique, un modèle avec forte baisse d'expression de la HTT a été généré par transduction d'AAV exprimant la Cre recombinase au niveau du muscle tibialis anterior. Des lots de souris HTT fl/fl sont anesthésiés par Isoflurane (maintien 2%, débitmètre 02 : 2L/min). L'injection est faite sous hotte de confinement (PSMII). Les virus injectés sont des AAV sérotype 8 (Généthon) avec le promoteur desmine et exprimant la Cre recombinase. 15µl de virus (3.10^9 particules) ou de PBS stérile seront injectés (Figure M2). L'injection est effectuée dans chaque patte avec une seringue à insuline au niveau du tibialis antérieur, muscle aisément repérable. Les animaux sont euthanasiés à 6 semaines après injection virale pour mesure du poids du muscle et étude en Western-Blot quantitative de la baisse de Huntingtine.

6.2 Modèle murin Q140

J'ai utilisé un modèle murin de la pathologie. Il s'agit du modèle CAG 140 ou Q140. Ce modèle est un modèle knock-in comprenant un promoteur murin et la HTT murine avec 140 répétitions de triplets CAG. Les répétitions peuvent être localisées sur un seul allèle (modèle hétérozygote) ou sur les deux allèles (modèle homozygote) (Figure 9). J'ai utilisé ce modèle pour obtenir des cellules satellites et réaliser les cultures primaires en vue d'effectuer de l'imagerie calcique.

Résultats

Chapitre I : La huntingtine s'exprime dans le muscle

La huntingtine est une protéine ubiquitaire fortement exprimée dans le cerveau et plus précisément au niveau du striatum. L'analyse de l'expression a été effectuée dans d'autres tissus (cœur, foie, testicules) confirmant le caractère ubiquitaire de l'expression de la HTT. Le muscle n'a toutefois pas fait l'objet d'une étude d'expression de la protéine, seule l'expression de l'ARNm a été confirmée dans le muscle. Dans ce chapitre, j'ai donc confirmé l'expression de la HTT dans le muscle, comparativement au cerveau, j'ai analysé l'expression de la HTT au cours de la différenciation et j'ai tenté de déterminer la localisation de la HTT.

1.1 Expression de la huntingtine dans des homogénats de muscle

L'expression de la HTT dans le muscle a été d'abord testée à partir d'homogénats totaux de quadriceps de souris WT. L'ARNm a également été extrait de ces muscles. Pour comparer le niveau d'expression, l'ARNm et des extraits protéiques ont été obtenus à partir des cerveaux des mêmes souris. (Figure 52 A, B et C). Les RT-qPCR de muscles et de cerveaux ont été réalisées au laboratoire par le Dr Laurent Pelletier.

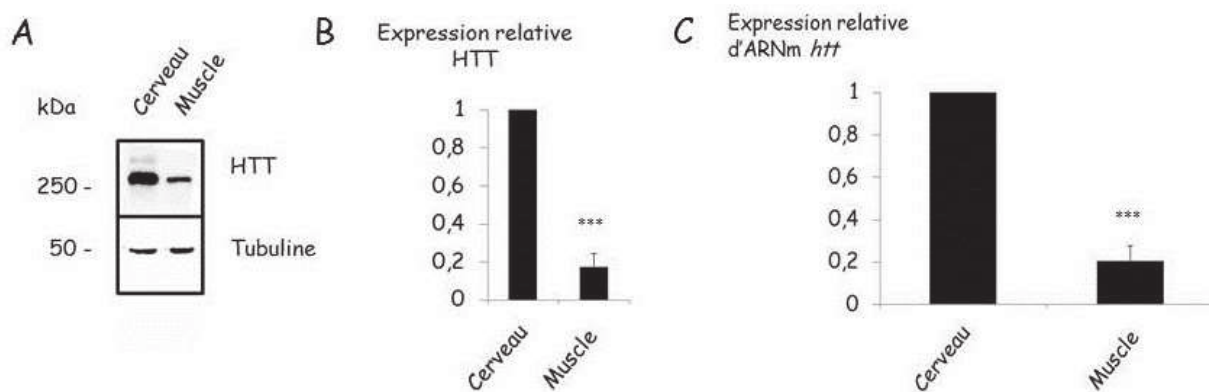


Figure 52 : A : analyse par western-blot quantitatif de l'expression de la huntingtine du muscle (quadriceps) versus cerveau. 40 μ g de chaque tissu ont été déposés. La huntingtine a un poids moléculaire de 350kDa. La quantification est réalisée par rapport à la tubuline (50kDa).

B : expression relative normalisée par rapport au cerveau (le rapport HTT/Tubuline du cerveau est considéré comme 100%, le rapport HTT/tubuline dans le muscle est fonction de celui du cerveau). n=4 homogénats de souris différentes, *** : p<0,001, test de Student.

C : analyse par RT-qPCR de l'expression d'ARNm de la huntingtine dans le muscle (quadriceps) par rapport au cerveau. La normalisation est faite comme précédemment. n=3 homogénats de souris différentes, *** : p<0,001, test de Student.

La huntingtine est détectée dans les homogénats totaux de muscle (Figure 52A). Le niveau d'expression de la huntingtine dans le muscle par rapport au cerveau est de 18% (s.e.m +/- 0,03) (Figure 52B).

Afin de confirmer ce résultat, une comparaison des niveaux d'ARNm de HTT retrouvés entre le cerveau et le muscle a été réalisée.

L'expression relative de l'ARNm de HTT dans le muscle par rapport au cerveau est de 20% (s.e.m +/- 0,03) (Figure 52C).

Après avoir confirmé l'expression de la HTT dans les homogénats totaux d'un muscle murin (quadriceps), j'ai étudié l'expression dans différents types de muscles. Au niveau cérébral, la HTT est plus exprimée dans le striatum (Montoya et al., 2006b). L'explication de cette spécificité n'est, à ce jour, pas résolue. Les muscles étant impliqués dans les fonctions de mouvement et de la respiration, j'ai étudié des muscles associés à ces fonctions afin de savoir si la HTT a une expression musculaire particulière.

1.2 Expression de la huntingtine dans des homogénats de muscles différents

J'ai sélectionné trois muscles permettant les fonctions de mouvement au niveau de la patte : quadriceps, tibialis anterior et extensor digitorum longus (edl) ainsi que le diaphragme impliqué dans la respiration et j'ai analysé par western-blot l'expression de la HTT (Figure 53).

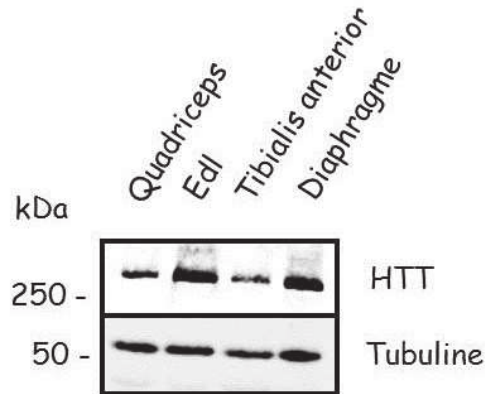


Figure 53 : analyse par western-blot de l'expression de la huntingtine dans des homogénats de quadriceps, d'extensor digitorum longus (edl), de tibialis anterior et du diaphragme.

La HTT est exprimée dans chacun des muscles analysés (Figure 53), sans spécificité.

1.3 Expression de la huntingtine au cours de la différenciation des myotubes

Les homogénats de muscle totaux comprennent essentiellement du muscle, mais également d'autres tissus et/ou populations cellulaires. Afin de savoir si la HTT est exprimée uniquement dans le muscle, j'ai réalisé une analyse en western-blot sur des myotubes humains immortalisés. Ces cultures cellulaires, issues de cellules primaires, ne contiennent que des myoblastes et sont dépourvues de toute autre population cellulaire. Par ailleurs, l'expression de la HTT dans les myotubes n'ayant, à ce jour, pas été déterminée, j'ai étudié l'expression de la HTT au cours de la différenciation des cellules. En effet, en vue de pouvoir également effectuer de l'imagerie calcique sur des myotubes, il me faut savoir à quel moment la HTT s'exprime.

Des myotubes humains immortalisés ont été mis en culture et différenciés pendant 4 jours. Toutes les 24 heures, un prélèvement de cellules est effectué. Les cellules sont ensuite lysées et un Western-Blot est effectué. Trois protéines sont analysées : la huntingtine, le récepteur de la ryanodine (RyR1) qui marque l'état de différenciation de la population cellulaire et la tubuline, comme marqueur de charge.

Ces expériences montrent que la population cellulaire composée uniquement de cellules musculaires exprime bien la HTT. Elle s'exprime dès 24 heures de différenciation, et a un niveau d'expression équivalent lors de la différenciation, jusqu'à 96 heures (Figure 54).

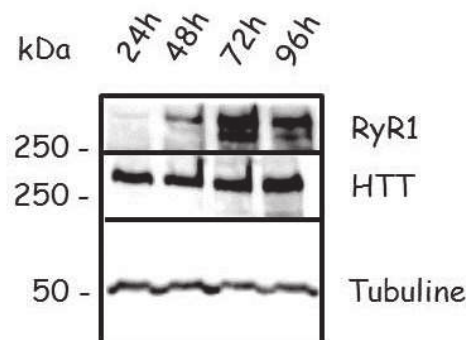


Figure 54 : Analyse par western-blot de l'expression de la huntingtine au cours de la différenciation dans des myotubes humains immortalisés. RyR1 : récepteur de la ryanodine (550 kDa), HTT : huntingtine. Le récepteur de la ryanodine est révélé après déshybridation de la membrane ayant permis la détection de la HTT.

L'expression du récepteur de la ryanodine augmente fortement au cours de la différenciation. A partir de 72 heures, l'expression du RyR1 est maximale. En vue d'effectuer les analyses

d'imagerie calcique sur myotubes (Chapitre II), le délai de 96 heures est retenu pour la différenciation: la HTT est exprimée à ce temps là, le RyR1 également et a atteint son plus haut niveau dans ce modèle cellulaire.

1.5 Localisation de la huntingtine dans une fibre musculaire dissociée

La huntingtine est donc bien exprimée au niveau des fibres musculaires de souris et des myotubes humains et s'exprime fortement dès 24 heures de différenciation. Nous avons vu que les myotubes ont une organisation singulière visible en immunofluorescence, notamment au niveau des triades (Figure 42). J'ai observé la localisation de la HTT dans des fibres musculaires dissociées afin de savoir si la HTT a le même pattern d'organisation que les protéines de la triade. J'ai comparé le marquage en immunofluorescence de HTT avec celui de RyR1, récepteur localisé sur la membrane du reticulum sarcoplasmique.

La HTT donne un marquage le long de la fibre en forme de points. Quelques uns sont localisés à la périphérie du noyau. Un certain nombre de points colocalisent avec le récepteur de la ryanodine (Figure 55). D'autres points se situent de part et d'autre des doubles rangées de points de récepteurs de la ryanodine.

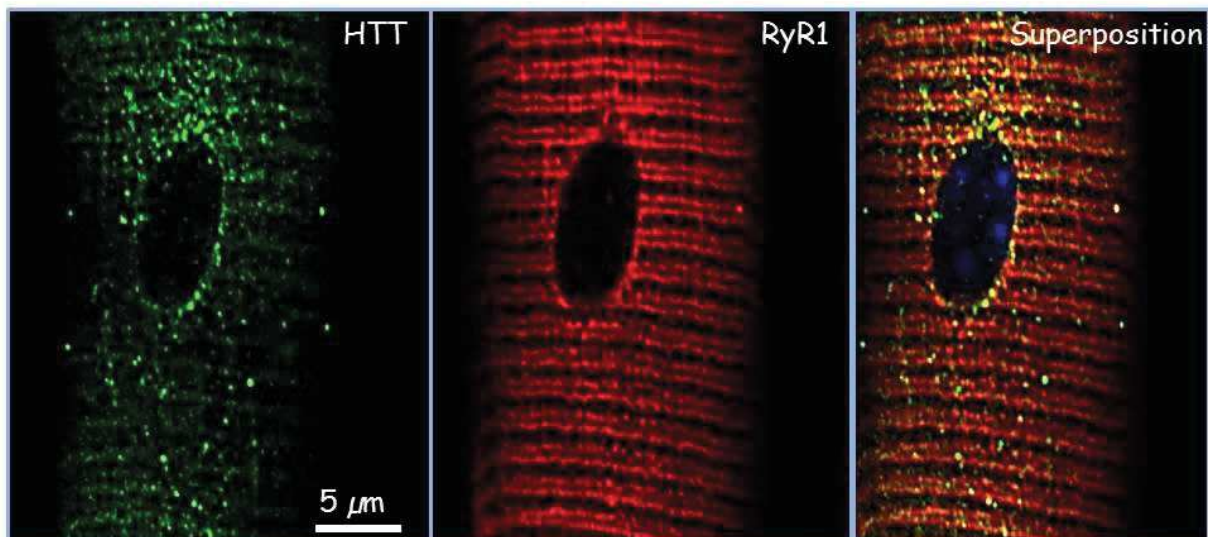


Figure 55 : Immunomarkage de fibres dissociées (muscle edl) de souris WT. Fixation à la PFA 4% et perméabilisation au Triton 1%. A gauche, marquage de la huntingtine (anticorps 4C8, épitope entre les acides aminés 443 et 457 de la HTT), au centre, marquage du récepteur de la ryanodine (en double rangée de points) et à droite superposition des 2 images précédentes.

Le marquage par immunofluorescence de la HTT dans une fibre musculaire dissociée n'a cependant pas de pattern identique à celui du récepteur de la ryanodine.

1.6 Discussion

L'expression de la huntingtine a été analysée dans différents tissus, cependant aucune analyse en western-blot dans la littérature actuelle n'a été effectuée sur le muscle.

Les analyses en ARNm ont déjà été publiées (Bates et al., 2015 ; Mielcarek et al., 2015) indiquant l'expression de l'ARNm de la huntingtine dans le muscle. De même la HTT a été détectée en immunohistochimie dans le muscle (Bates et al., 2015). J'ai donc tout d'abord confirmé cette expression sur des cellules musculaires murines et humaines. J'ai ensuite montré que cette expression atteint un plateau dès 24 heures de différenciation. J'ai enfin montré que la HTT est exprimée dans différents types de muscle. Pour autant, comme il s'agit d'un paradigme d'étude nouveau, des isoformes de la huntingtine pourraient être présentes. En effet, l'expression de différentes isoformes a été retrouvée au niveau cérébral (Labardorf & Myers, 2015 ; Mort et al., 2015 ; Ruzo et al., 2015). Le résultat d'expression de la protéine HTT permet alors d'envisager l'hypothèse d'isoformes, dont peut-être certaines spécifiques du muscle. L'analyse en western-blot avec des différents anticorps que j'ai testés ciblant la parties C et N-terminales n'a pas été concluante quant à la détection d'isoforme spécifique.

L'expression de la protéine huntingtine est corrélée à l'expression de l'ARNm de la huntingtine dans le muscle à 20% du niveau d'expression dans le cerveau.

Ce résultat confirme les analyses d'ARNm antérieures et les analyse d'immunohistochimie (Bates et al., 2015).

L'immunofluorescenc réalisée sur fibres de souris montre une localisation de la protéine sous forme de points. Tout d'abord, cette localisation est différente de celle de RyR1 (Figure 55). A quoi correspond ce pattern ? L'une des hypothèses est que ces points pourraient se situer au niveau du Golgi.

Les études d'expression sur deux modèles (murin et cellules humaines immortalisées) sont complémentaires. En effet, je vais utiliser le modèle murin afin d'effectuer des expériences à la fois au niveau cellulaire (Chapitre II) et au niveau physiologique (Chapitre III). Au niveau cellulaire, cependant, les cultures primaires ne comportent pas exclusivement des cellules musculaires. En effet, des fibroblastes, au sein desquels la HTT est exprimée, sont présents. Le modèle de myoblastes humaines immortalisées comporte lui, une unique population

cellulaire. Il permet donc de montrer que dans des myotubes exclusivement la HTT est exprimée. De plus, il s'agit de cellules humaines, modèle cellulaire pertinent dans une perspective de tests de thérapeutiques (voir Conclusion générale).

Les données d'expression montrent que la HTT est exprimée dès le début de la différenciation. Cette donnée permet d'émettre l'hypothèse d'une ou plusieurs fonctions de la huntingtine dans le muscle précoces d'une part et présentes également lors d'un stade avancé de différenciation.

Cette fonction ou ces fonctions seraient donc applicables à l'ensemble des muscles, dont le diaphragme. Des défauts fonctionnels des muscles, et en particulier du diaphragme, laisseraient présager non seulement une altération de la force des membres, mais aussi un défaut de respiration, voire de toutes les fonctions physiologiques mettant en jeu le muscle squelettique, ce qui est le cas de la déglutition. Or, la pneumonie est l'une des causes principales de décès chez les patients atteints de la MH (Sorensen et al., 1992). La pneumonie est notamment due à un défaut de déglutition.

La prise en charge des atteintes musculaires est donc primordiale, non seulement vue la cachexie des patients à un stade avancé de la maladie, mais également pour les autres fonctions physiologiques qui sont altérées. L'expression de la huntingtine dans tous les types de muscles montre l'importance de comprendre sa ou ses fonctions.

En vue d'étudier plus en détail le rôle potentiel de la protéine huntingtine totale, j'ai développé des modèles cellulaires dont l'expression de la protéine est fortement abaissée.

La huntingtine a-t-elle donc un rôle dans la fonction du muscle ?

Chapitre II : sans huntingtine, les cellules musculaires sont altérées

Afin de savoir si la huntingtine a un rôle dans la fonction musculaire, j'ai développé trois modèles cellulaires avec forte diminution de l'expression de la huntingtine et j'ai étudié les relâchements de calcium par l'imagerie calcique avec différentes stimulations afin de caractériser les défauts observés. Le premier modèle est un modèle de myotubes murins avec baisse de l'expression de la HTT par utilisation d'un shRNA. J'ai également développé un modèle utilisant des myotubes humains avec le même système de diminution de l'expression de la HTT par shRNA. Enfin, en vue de diminuer plus fortement l'expression de la HTT d'une part et en vue de développer un modèle utilisant un système autre que les shRNA, j'ai développé un modèle murin utilisant des cultures primaires de cellules satellites de la lignée HTT fl/fl. Il s'agit d'une lignée de souris comportant des sites loxP de part et d'autre de l'exon 1 de la *HTT*. J'ai transduit les cellules avec un adénovirus exprimant la Cre recombinase afin de déléter une partie du gène *HTT* et d'aboutir à l'extinction de la protéine. Ce travail met en avant le rôle de la huntingtine dans les relâchements calciques.

2.1 Modèle murin de myotubes avec forte diminution de l'expression de la huntingtine

Des myoblastes murins issus de souris WT sont mis en culture et transduits avec un lentivirus permettant l'expression d'un shRNA dirigé contre la HTT.

Une forte diminution de l'expression de la huntingtine (86%, Figure 56A & B) est obtenue après 48 heures d'expression du shRNA. Ce temps correspond à celui des expériences d'imagerie calcique présentées par la suite.

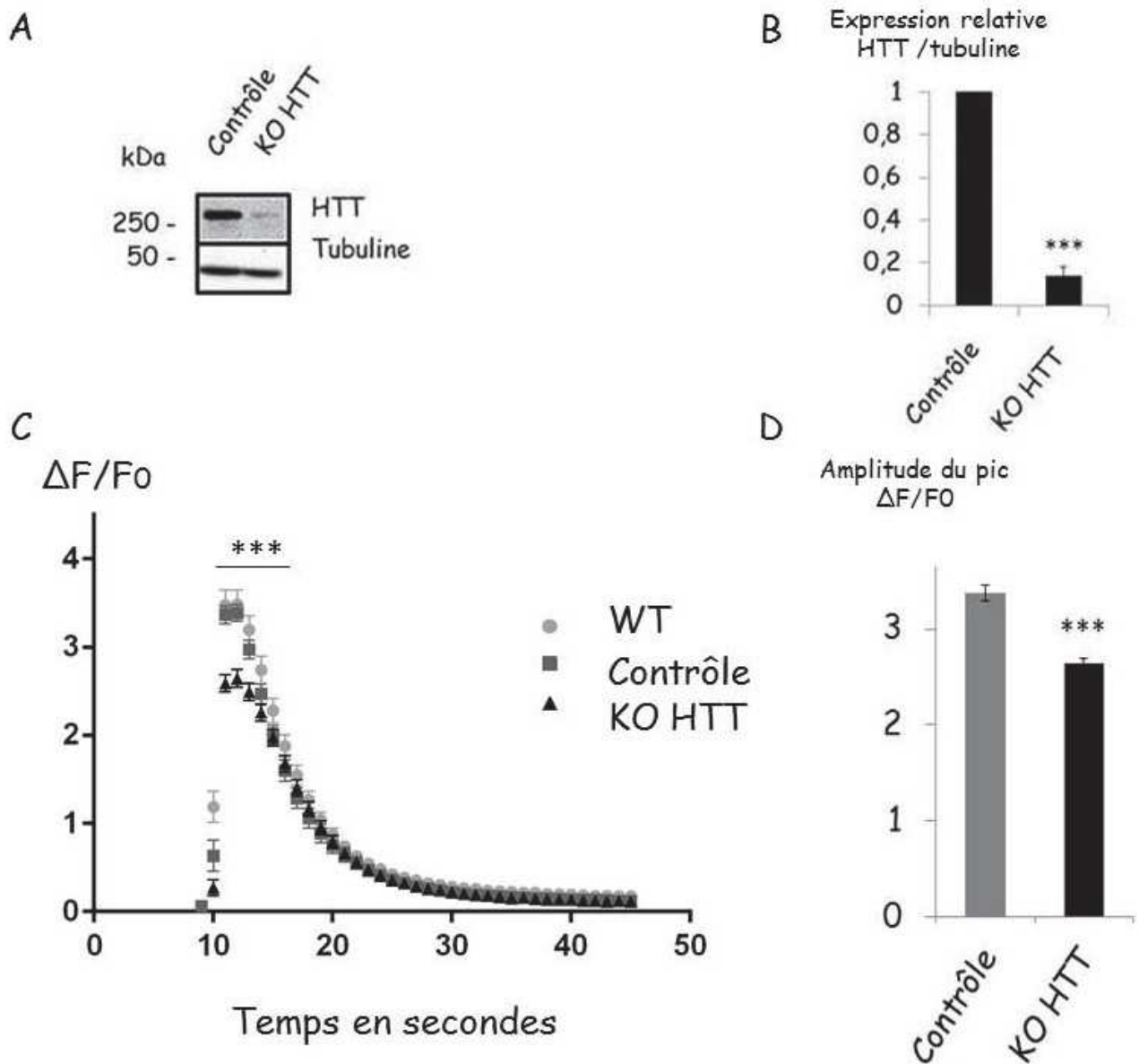


Figure 56 : A : Analyse par western-blot quantitatif de l'expression de la huntingtine de lysats de cellules murines WT transduites avec des shRNA HTT pendant 48 heures, MOI 8.

B : La quantification est réalisée par rapport à la tubuline. L'expression relative est normalisée par rapport au contrôle. Le contrôle est un lysat obtenu avec les mêmes cellules transduites avec un shRNA contrôle (shRNA luciférase), n=3 lysats différents, *** : $p < 0,001$, test de Student.

C : Variation de fluorescence du Fluo-4 sur cellules murines sans virus (WT), avec virus contrôle (Contrôle) et avec shRNA HTT (KO HTT). Stimulation KCl 140mM. WT, n=54 myotubes ; contrôle, n=53 myotubes ; KO HTT, n=51 myotubes, de trois expériences différentes. ***, $p < 0,001$, ANOVA à deux facteurs, après correction de Bonferroni.

D : Moyenne du pic de fluorescence. contrôle : 3,38 (s.e.m +/- 0,094) ; KO HTT : 2,64 (s.e.m +/- 0,099).

J'ai effectué de l'imagerie calcique avec une stimulation KCl 140mM et 2mM de calcium dans le milieu externe. Cette stimulation induit la dépolarisation de la membrane plasmique et une libération très rapide de calcium dans le cytosol (Figure 32). Elle est une mesure classiquement utilisée pour tester l'efficacité du couplage excitation contraction dans des myotubes en culture.

L'amplitude du pic pour les cellules contrôles est de 3,38 (s.e.m +/- 0,094). L'amplitude du pic des cellules avec forte baisse de la HTT est de 2,64 (s.e.m +/- 0,099), soit une diminution de l'amplitude du pic de 21,9%.

Cette expérience d'imagerie calcique met donc en évidence un défaut de relâchements de calcium avec ce modèle murin.

Pour étudier plus spécifiquement les relâchements de calcium, j'ai utilisé un autre modèle.

2.2 Modèle de myotubes humains avec forte diminution de l'expression de la huntingtine

Des myoblastes humains sont mis en culture et transduits avec un lentivirus permettant l'expression du shRNA utilisé précédemment (Figure 57).

Une forte diminution d'expression de la HTT est obtenue (90,1%, Figure 57 A & B).

L'expérience précédente (paragraphe 2.1) montre des défauts des relâchements de calcium. Les défauts peuvent provenir d'une perturbation de l'homéostasie calcique générale et/ou du couplage excitation contraction (notamment du couplage physique entre le DHPR et le RyR1) et/ou du récepteur de la ryanodine. Pour déterminer l'origine des défauts. J'ai effectué une première stimulation KCl 140mM avec 2mM de calcium dans le milieu externe, comme précédemment, afin de savoir si les mêmes défauts sont retrouvés dans ce modèle. J'ai ensuite effectué une stimulation avec KCl 140mM sans calcium externe, afin de s'assurer que les variations de calcium cytosoliques ne sont pas dues à un influx de calcium extracellulaire. Enfin, les relâchements de calcium peuvent être altérés suite à un défaut du récepteur de la ryanodine. J'ai donc utilisé une stimulation directe du RyR1 par 4 CmC 500µM.

Les variations de fluorescence sont obtenues pour chacune des trois stimulations sont présentées sur la Figure 57 C, E et G.

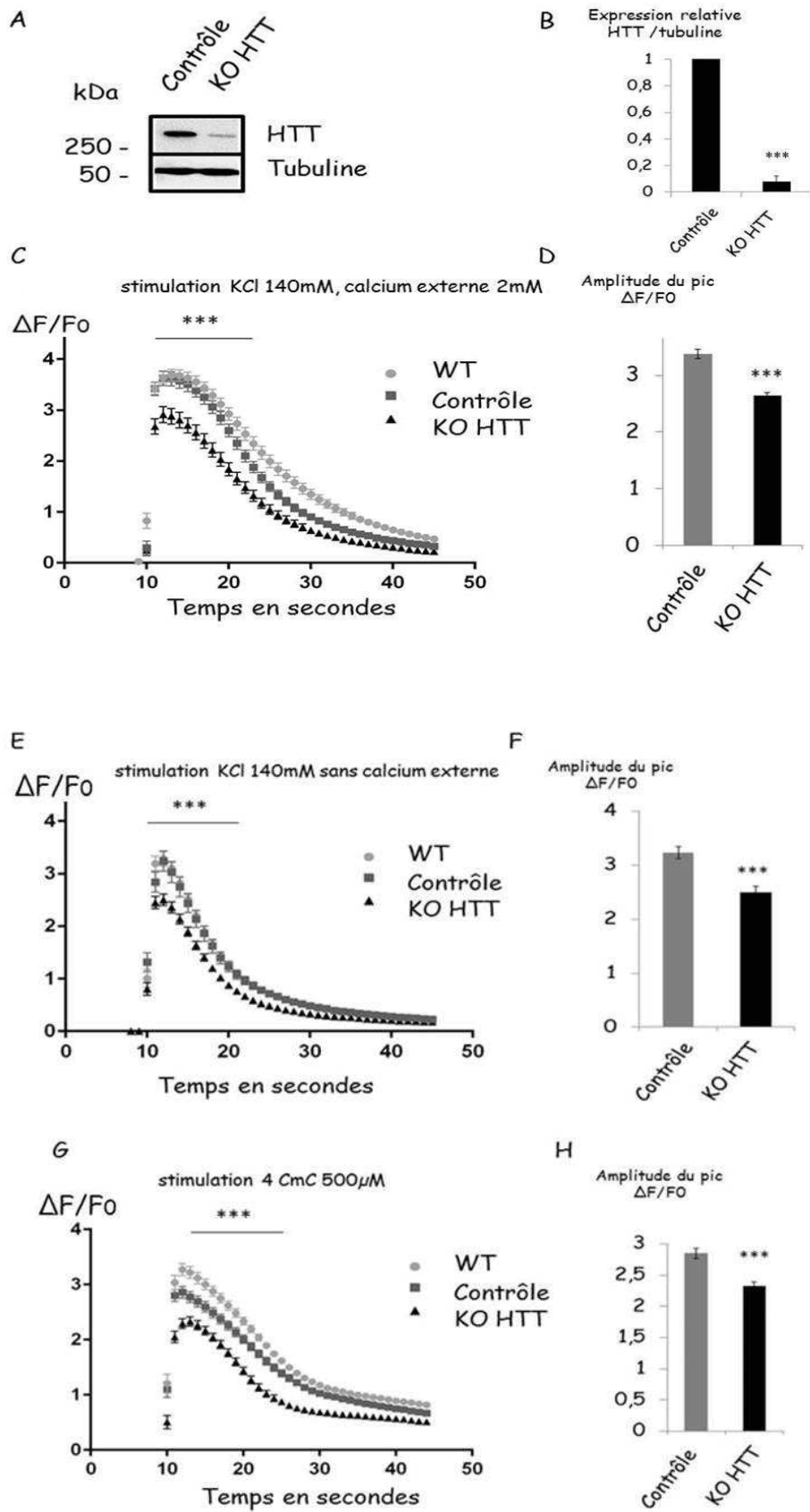


Figure 57 : Analyse par western-blot et analyse d'imagerie calcique

Figure 57 : A : Analyse par western-blot quantitatif de l'expression de la huntingtine de lysats de cellules humaines transduites avec des shRNA HTT pendant 48 heures, MOI 8.

B : La quantification est réalisée par rapport à la tubuline. L'expression relative est normalisée par rapport au contrôle. Le contrôle est un lysat obtenu avec les mêmes cellules transduites avec un shRNA contrôle (shRNA luciférase), n=3 lysats différents, *** : p<0,001, test de Student.

C : Variation de fluorescence du Fluo-4 sur cellules humaines sans virus (WT), avec virus contrôle (Contrôle) et avec shRNA HTT (KO HTT). Stimulation KCl 140mM. WT, n=58 myotubes ; contrôle, n=53 myotubes ; KO HTT, n=57 myotubes, de trois expériences différentes. ***, p<0,001, ANOVA à deux facteurs, après correction de Bonferroni.

D : Moyenne du pic de fluorescence.

E : Variation de fluorescence du Fluo-4 sur cellules humaines sans virus (WT), avec virus contrôle (Contrôle) et avec shRNA HTT (KO HTT). Stimulation KCl 140mM sans calcium externe. WT, n=61 myotubes ; contrôle, n=54 myotubes ; KO HTT, n=79 myotubes, de trois expériences différentes. ***, p<0,001, ANOVA à deux facteurs, après correction de Bonferroni.

F : Moyenne du pic de fluorescence.

G : Variation de fluorescence du Fluo-4 sur cellules humaines sans virus (WT), avec virus contrôle (Contrôle) et avec shRNA HTT (KO HTT). Stimulation 4CmC 500µM. WT, n=54 myotubes ; contrôle, n=51 myotubes ; KO HTT, n=57 myotubes, de trois expériences différentes. ***, p<0,001, ANOVA à deux facteurs, après correction de Bonferroni.

H : Moyenne du pic de fluorescence.

Les résultats d'amplitude du pic et des s.e.m sont récapitulés pour chaque expérience (Figure 57 D, F, H) dans le tableau suivant. La mesure de l'amplitude du pic représente l'effet immédiat de la stimulation.

	Cellules contrôles		Cellules KO HTT		Différentiel
Stimulation	Amplitude du pic	s.e.m	Amplitude du pic	s.e.m	
KCl 140mM avec calcium externe	3,61	0,134	2,90	0,151	-20%
KCl 140mM sans calcium externe	3,23	0,192	2,49	0,110	-18%
4 CmC 500µM	2,85	0,108	2,33	0,087	-23%

Les résultats obtenus montrent une diminution de l'amplitude des relâchements calciques pour les trois stimulations.

Avec baisse d'expression de la HTT, les relâchements de calcium avec et sans calcium extracellulaire, ainsi que par stimulation directe du RyR1 sont altérés.

2.3 Modèle de myotubes murins avec forte diminution de l'expression de la huntingtine (HTT fl/fl et adénovirus Cre)

Les précédents modèles utilisent l'expression de shRNA. L'expression de shRNA peut comporter notamment des cibles non désirées. J'ai donc développé un modèle génétique différent.

Le modèle consiste en l'utilisation d'adénovirus exprimant la Cre recombinase sur des myoblastes murins HTT fl/fl comportant des sites loxP de part et d'autre de l'exon 1 de la *HTT*.

L'expression de la HTT est diminuée de 95,4% (Figure 58A & B).

J'ai effectué les trois stimulations décrites dans le paragraphe 2.2.

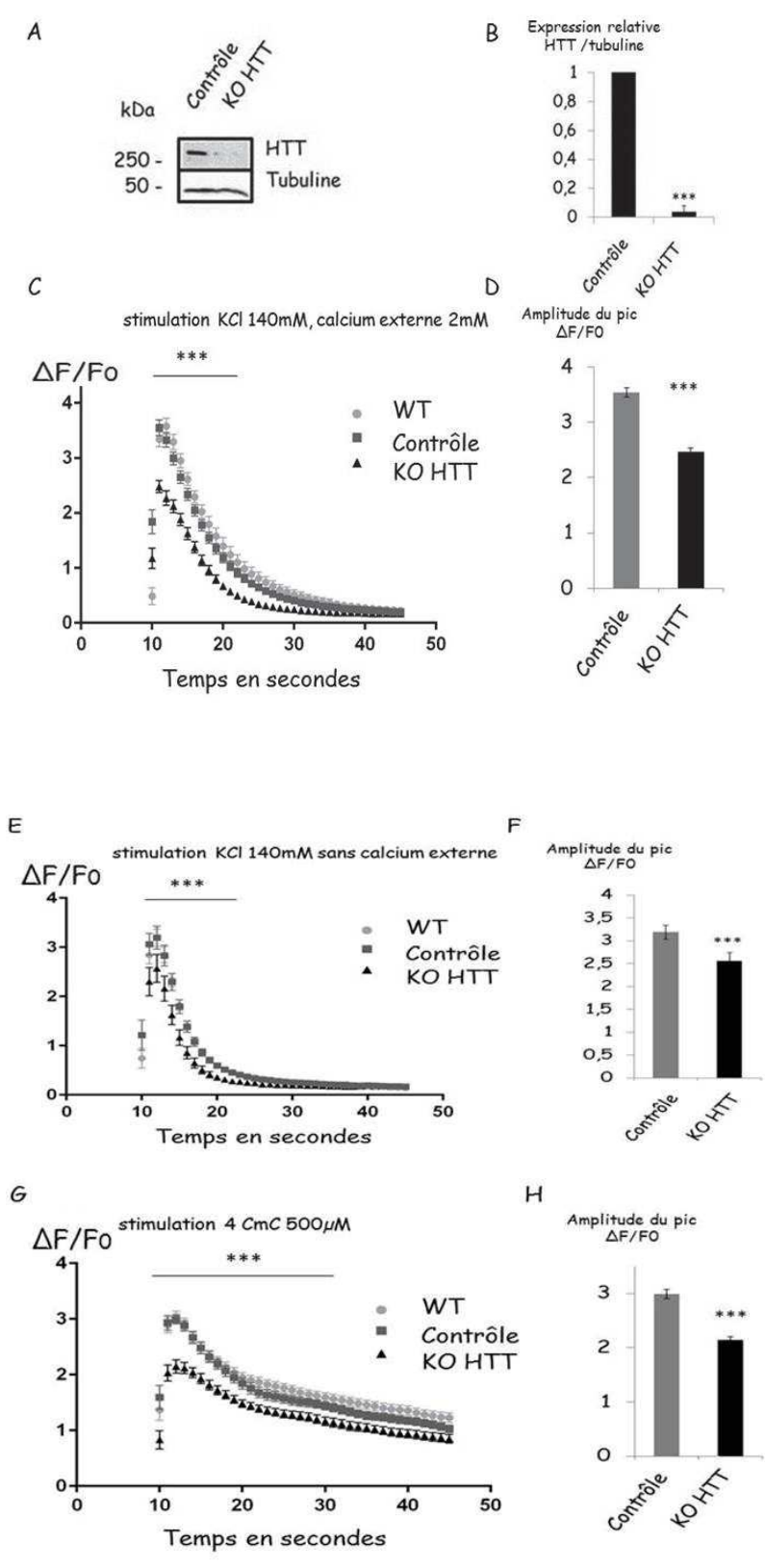


Figure 59 : Analyse par western-blot et analyse d'imagerie calcique

Figure 58 : **A** : Analyse par western-blot quantitatif de l'expression de la huntingtine de lysats de cellules murines HTT fl/fl transduites avec des adénovirus Cre pendant 48 heures, MOI 8.

B : La quantification est réalisée par rapport à la tubuline. L'expression relative est normalisée par rapport au contrôle. Le contrôle est un lysat obtenu avec les mêmes cellules transduites avec un adénovirus contrôle (adv5-GFP), n=3 lysats différents, *** : p<0,001, test de Student.

C : Variation de fluorescence du Fluo-4 sur cellules murines sans virus (WT), avec virus contrôle (Contrôle) et avec shRNA HTT (KO HTT). Stimulation KCl 140mM. WT, n=62 myotubes ; contrôle, n=67 myotubes ; KO HTT, n=54 myotubes, de trois expériences différentes. ***, p<0,001, ANOVA à deux facteurs, après correction de Bonferroni.

D : Moyenne du pic de fluorescence.

E : Variation de fluorescence du Fluo-4 sur cellules murines sans virus (WT), avec virus contrôle (Contrôle) et avec shRNA HTT (KO HTT). Stimulation KCl 140mM sans calcium externe. WT, n=46 myotubes ; contrôle, n=45 myotubes ; KO HTT, n=28 myotubes, de trois expériences différentes. ***, p<0,001, ANOVA à deux facteurs, après correction de Bonferroni.

F : Moyenne du pic de fluorescence.

G : Variation de fluorescence du Fluo-4 sur cellules murines sans virus (WT), avec virus contrôle (Contrôle) et avec shRNA HTT (KO HTT). Stimulation 4CmC 500µM. WT, n=58 myotubes ; contrôle, n=50 myotubes ; KO HTT, n=63 myotubes, de trois expériences différentes. ***, p<0,001, ANOVA à deux facteurs, après correction de Bonferroni.

H : Moyenne du pic de fluorescence.

Les résultats d'amplitude du pic et des s.e.m sont récapitulés pour chaque expérience (Figure 58 D, F, H) dans le tableau suivant.

	Cellules contrôles		Cellules KO HTT		Différentiel
Stimulation	Amplitude du pic	s.e.m	Amplitude du pic	s.e.m	
KCl 140mM avec calcium externe	3,54	0,143	2,47	0,131	-30%
KCl 140mM sans calcium externe	3,19	0,233	2,56	0,284	-28,5%
4 CmC 500µM	2,99	0,084	2,14	0,119	-20%

L'amplitude du pic est abaissée lors des stimulations KCl 140mM avec et sans calcium externe ainsi que par le 4CmC 500 μ M. Cette diminution est de 30% pour la stimulation KCl 140mM avec calcium externe, 20% sans calcium externe et 28,5% avec le 4CmC 500 μ M. La diminution est plus importante pour les stimulations KCl 140mM avec calcium externe et par 4CmC 500 μ M dans ce modèle qu'avec les deux modèles précédents.

L'altération des relâchements de calcium avec forte baisse d'expression de la HTT est confirmée également avec le modèle utilisant les adénovirus exprimant la Cre recombinase sur des cellules HTT fl/fl transduites.

Dans la maladie de Huntington, il y a d'une part une baisse d'expression de la HTT, dont j'ai pu analyser l'effet en imagerie calcique précédemment, et d'autre part l'expression d'une protéine mutée. Il a été montré une altération du relâchement de calcium dans un modèle de la pathologie R6/2 (Braubach et al., 2014). Cette altération est-elle d'un niveau plus important dans les modèles de la pathologie que dans un modèle avec uniquement baisse d'expression de la HTT ?

Afin de répondre à cette question, j'ai utilisé le modèle Q140 de la pathologie. Il s'agit d'un modèle knock-in comprenant 140 répétitions de triplets CAG au niveau de la huntingtine murine, soit sur un allèle, (modèle hétérozygote, Qhtz), soit sur les deux (modèle homozygote, Q/Q).

2.4 Imagerie calcique sur les cellules du modèle murin Q140 de la MH

Sur ce modèle d'étude, une seule stimulation KCl 140mM avec calcium externe a été effectuée (Figure 59).

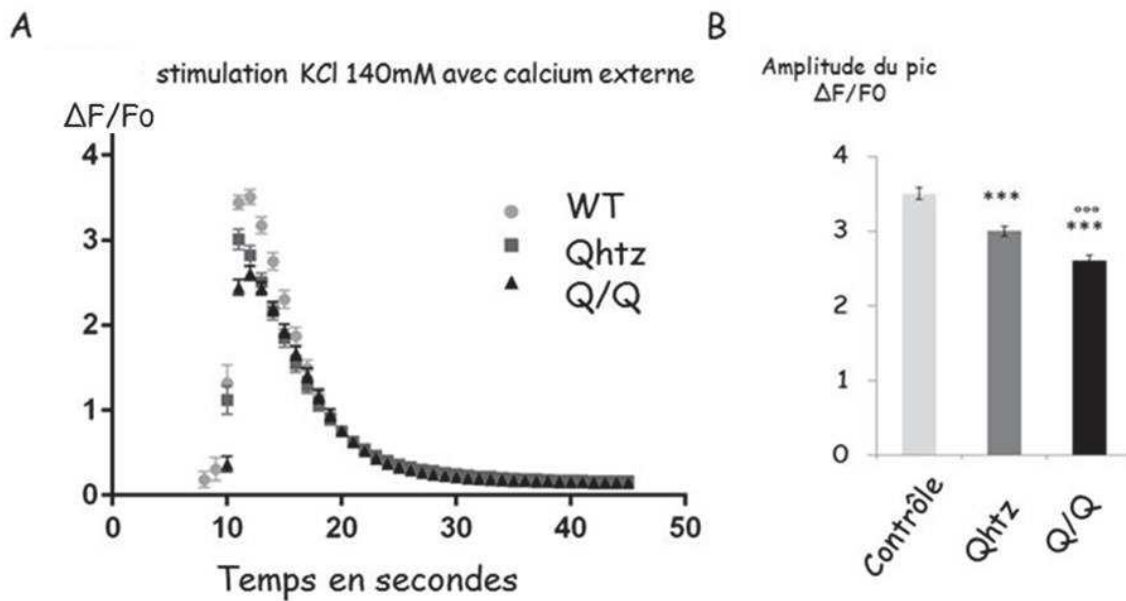


Figure 59 : A : Variation de fluorescence du Fluo-4 sur cellules murines (WT), modèle hétérozygote (Qhtz) et modèle homozygote (Q/Q) de la pathologie. Stimulation KCl 140mM avec calcium externe 2mM. WT, n=52 myotubes ; Qhtz, n=62 myotubes ; Q/Q, n=52 myotubes, de trois expériences différentes. ***, $p < 0,001$, ANOVA à deux facteurs, après correction de Bonferroni.

D : Amplitude du pic de fluorescence. WT : 3,50 (s.e.m +/- 0,088), Qhtz : 3 (s.e.m +/- 0,113) ; Q/Q : 2,60 (s.e.m +/- 0,082).

L'amplitude du pic est diminuée de 15% entre le WT et le modèle hétérozygote (Qhtz) et de 25% entre le WT et le modèle homozygote (Q/Q) (Figure 59B).

Le niveau de diminution de l'amplitude du pic entre le WT et le modèle homozygote est comparable à la diminution observée dans les modèles avec forte baisse de l'expression de la HTT sans expression d'une protéine mutée.

Au total, l'imagerie calcique montre des altérations dans les modèles avec forte diminution de l'expression de la HTT, comme dans le modèle murin de la MH. L'une des stimulations effectuées (4CmC), agit directement sur le récepteur de la ryanodine. Aussi, une étude en Western-blot a été réalisée pour évaluer le niveau d'expression de ce récepteur dans le cas d'une forte diminution de l'expression de la huntingtine.

2.5 Expression du récepteur de la ryanodine avec forte baisse de l'expression de la HTT

Un western-blot quantitatif a été effectué sur lysats de cellules obtenus à l'issue de l'imagerie calcique (Figure 60).

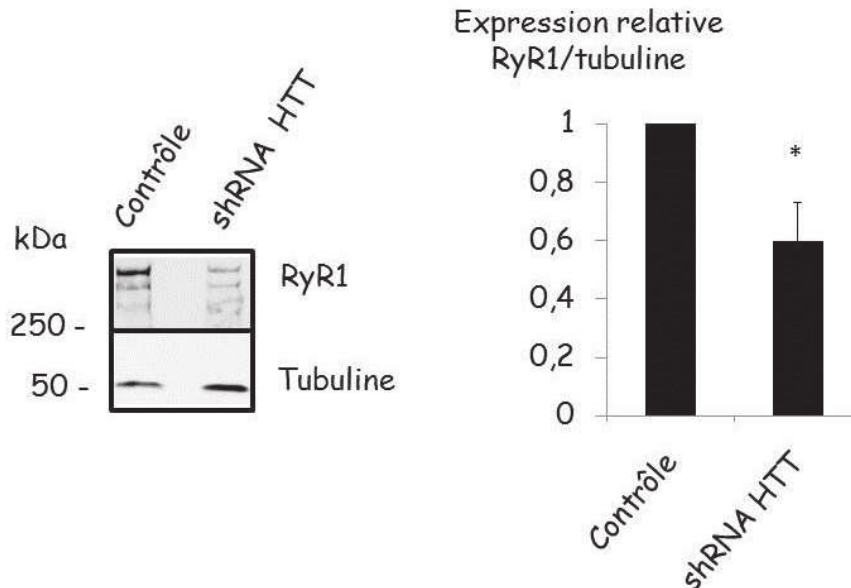


Figure 60 : Analyse par western-blot quantitatif de l'expression du récepteur de la ryanodine sur des lysats de cellules humaines transduites avec des shRNA HTT, à l'issue de l'imagerie calcique. La quantification est réalisée par rapport à la tubuline. L'expression relative est normalisée par rapport au contrôle. Le contrôle est un lysat obtenu avec les mêmes cellules transduites avec un shRNA luciférase, n=4 lysats différents, * : p<0,05, test de Student.

Le récepteur de la ryanodine a une expression diminuée de 40% (s.e.m +/- 0,12) (Figure 60).

2.6 Discussion

Les trois modèles avec baisse d'expression de la HTT montrent une altération des relâchements de calcium de la cellule musculaire.

Les résultats d'imagerie calcique de ce chapitre sont résumés dans le tableau ci-dessous.

	Stimulation KCl 140mM Pic calcique	Stimulation 4 CmC Pic calcique	Stimulation KCl 140mM sans calcium externe Pic calcique	Expression RyR1
Cellules murines WT + shRNA HTT	-22%	X	X	X
Cellules humaines + shRNA HTT	-20%	-18%	-23%	-40%
Cellules murines + adénovirus Cre	-30%	-28,5%	-20%	X
Cellules Q140/+ Cellules Q140/Q140	-15% -25%	X	X	X

Les trois modèles cellulaires sont concordants quant à la diminution du pic calcique obtenu. Le modèle dont la baisse du pic calcique est la plus importante quantitativement est le modèle avec transduction de cellules HTT fl/fl avec des adénovirus exprimant la Cre recombinase. Ce modèle a également la plus forte diminution de l'expression de la huntingtine. Ainsi, l'une des hypothèses est que le défaut de relâchement calcique serait fonction du niveau d'expression de la huntingtine. En effet, une forte diminution entraîne une baisse de relâchement de

calcium jusqu'à 30%. Néanmoins, il se peut que la baisse du pic calcique soit également liée à un effet seuil : une diminution de huntingtine à partir de laquelle les relâchements calciques sont altérés, du fait de l'absence de système compensatoire. Le lien entre quantité de huntingtine totale et baisse de relâchement calcique est également posé avec l'imagerie calcique du modèle pathologique de la MH : Q140 hétérozygote et homozygote. Ce dernier modèle comprend cependant les deux phénomènes : une diminution de l'expression de la huntingtine totale non mutée et l'expression de protéine(s) mutée(s).

Des défauts de relâchements calciques ont été observés dans des études précédentes sur des modèles de la pathologie, en particulier le modèle transgénique R6/2 comportant deux allèles de la HTT non mutée et un allèle avec l'exon1 muté (Braubach et al., 2014). La diminution du pic calcique lors d'une stimulation comparable est de 20% (figure 39, Braubach et al., 2014). Les défauts de relâchements calciques observés dans nos trois modèles avec baisse de l'expression de la protéine totale, sans expression de protéine mutante, sont comparables. Le modèle R6/2 est un modèle comprenant uniquement l'exon1 muté de la protéine. Suite aux résultats de ce chapitre, une hypothèse est donc que les défauts de relâchements calciques sont notamment dus à la forte diminution d'expression de la protéine non mutée.

Les stimulations réalisées ont permis de montrer que les défauts proviennent du relâchement des stocks de calcium contenus dans les citernes de reticulum sarcoplasmique (Figure 61).

Le KCl 140mM va induire une dépolarisation de la membrane plasmique (Figure 61). Sans calcium externe, l'amplitude des pics est diminuée, montrant que les défauts sont notamment intracellulaires.

Avec stimulation par 4 CmC, et activation du RyR1 (Figure 61), la diminution d'amplitude du pic montre un défaut impliquant directement le récepteur de la ryanodine, dont j'ai pu montrer une baisse d'expression. Comment cette baisse de RyR1 peut-elle s'expliquer ?

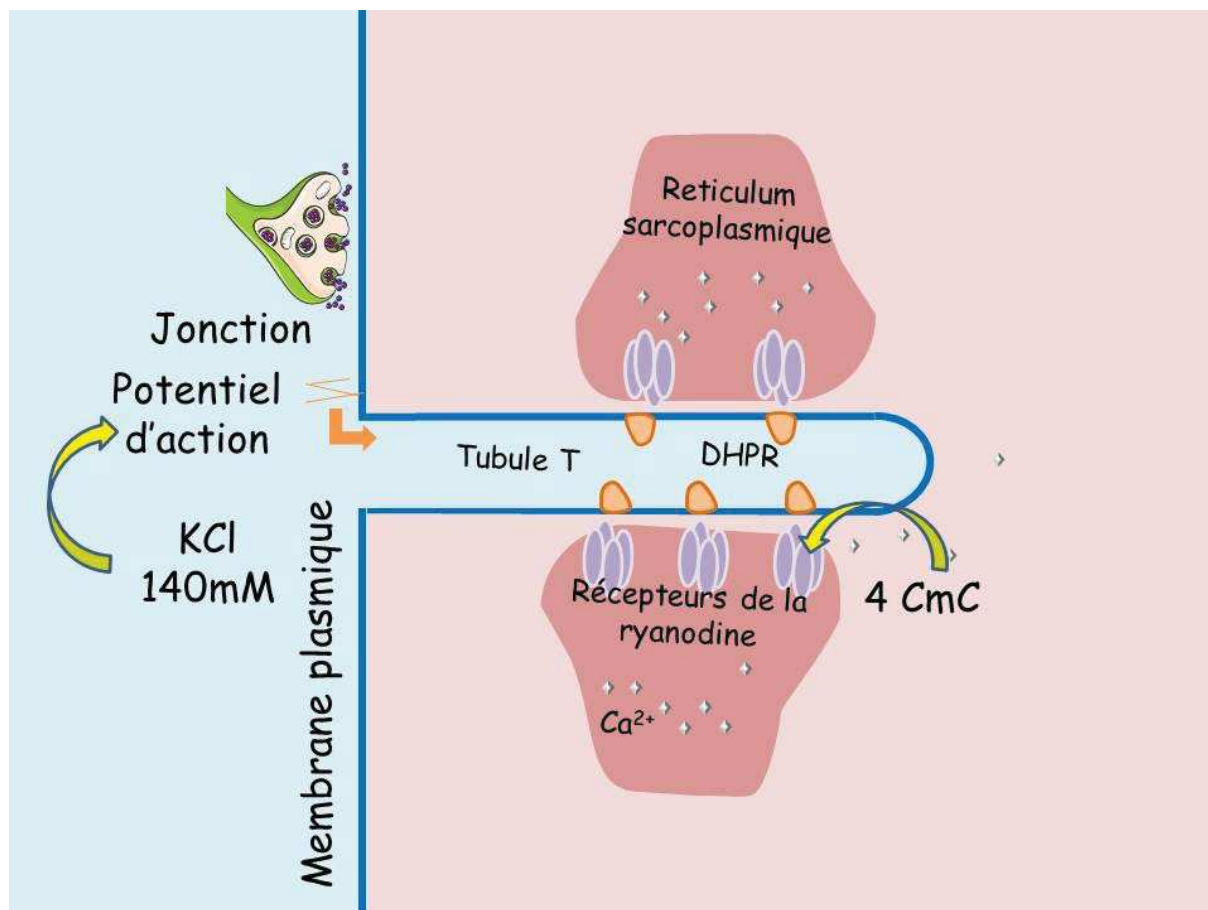


Figure 61 : Stimulations KCl 140mM et 4 CmC 500 μ M et relâchements de calcium.

Au niveau neuronal, le récepteur de la ryanodine est impliqué dans les défauts de relâchements calciques observés dans un modèle de la pathologie, mettant en jeu la protéine HTT mutée (Suzuki et al., 2012). Au niveau musculaire, Braubach et al. (2014) ont observé un niveau identique d'expression du récepteur de la ryanodine sur des homogénats de muscles de souris R6/2 versus WT. Notre modèle avec baisse d'expression de la HTT montre une diminution de l'expression de RyR1. Cette diminution d'expression est corrélée aux diminutions de l'amplitude du pic en imagerie calcique. Ainsi, dans le modèle murin de la pathologie, d'autres mécanismes peuvent entrer en jeu, dus à l'expression d'une protéine mutée.

La diminution d'expression du récepteur de la ryanodine, de 40%, dans notre modèle avec baisse de la HTT, permet d'émettre l'hypothèse d'un lien entre la protéine totale HTT et le récepteur de la ryanodine, l'absence de la première induisant une altération de ce récepteur et un défaut de relâchement calcique.

Différentes hypothèses peuvent être émises quant à la diminution d'expression du récepteur de la ryanodine. Tout d'abord, il peut y avoir une altération transcriptionnelle. En effet, la

huntingtine est décrite au niveau neuronal comme ayant une fonction à ce niveau (Thompson, 2003 ; Zuccato et al., 2003). Ensuite, la huntingtine pourrait avoir une interaction directe avec le récepteur de la ryanodine. L'absence de cette interaction induirait une dégradation du récepteur. Une autre hypothèse serait une interaction indirecte, qui permettrait par exemple le transport du récepteur. L'absence de HTT induirait une modification du transport de cette protéine et une dégradation de celle-ci.

Des défauts de relâchements calciques ont été démontrés sur trois modèles cellulaires mis en place au laboratoire, il est important de savoir quel est le retentissement au niveau physiologique global. La baisse d'expression de la HTT induit-elle un défaut de force musculaire ?

Afin de répondre à cette question, j'ai développé un modèle murin *in vivo*.

Chapitre III : sans huntingtine, le muscle est altéré

Afin de voir l'impact d'une diminution d'expression de la huntingtine au niveau physiologique, j'ai développé deux modèles murins.

J'ai testé la force de ces animaux sur une période de 10 semaines et j'ai analysé le poids des muscles à l'issue de l'expérience. L'histologie musculaire a été réalisée en collaboration avec Diane Giovannini (CHU Grenoble). J'ai effectué les prélèvements et l'analyse quantitative. Enfin, j'ai réalisé les immunomarquages sur fibres dissociées et les western-blots quantitatifs des protéines de la triade.

3.1 Création d'une lignée avec baisse d'expression de la HTT

Les souris issues du croisement de la lignée HTT fl/fl comportant des sites loxP de part et d'autre de l'exon 1 du gène de la *HTT* avec la lignée comportant la Cre recombinase sous dépendance du promoteur muscle spécifique HSA (human skeletal actine) ont été injectées avec du tamoxifène à 6 semaines de vie et sacrifiées 14 semaines après injection.

Une analyse en western-blot quantitatif a été réalisée (Figure 62).

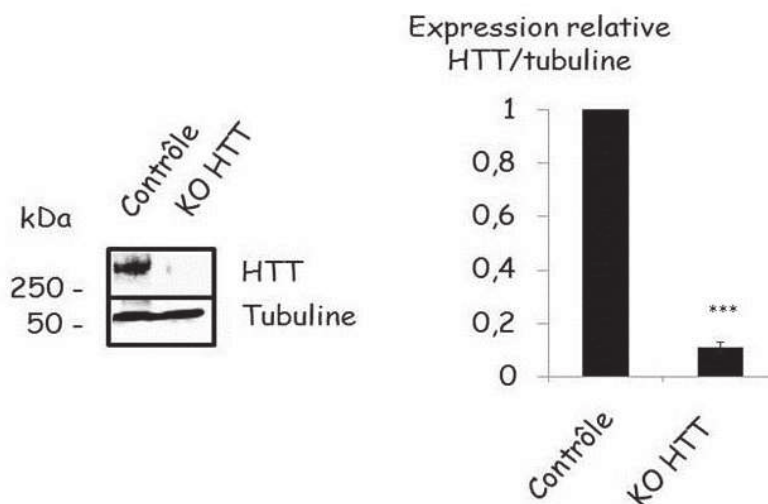


Figure 62 : Analyse par western-blot quantitatif de l'expression de la huntingtine d'homogénats de muscles contrôles (souris HTT fl/fl n'exprimant pas la Cre recombinase injectées avec tamoxifène) et de souris de la nouvelle lignée HTT fl/fl exprimant la Cre recombinase injectées avec tamoxifène. L'expression relative est normalisée par rapport au contrôle. n=3 homogénats différents, *** : p<0,001, test de Student.

La baisse d'expression est de 90%.

3.2 Analyse de force et du poids

La mesure de la force des souris a été réalisée avec des grip tests sur les lots des souris précédentes (Figure 63).

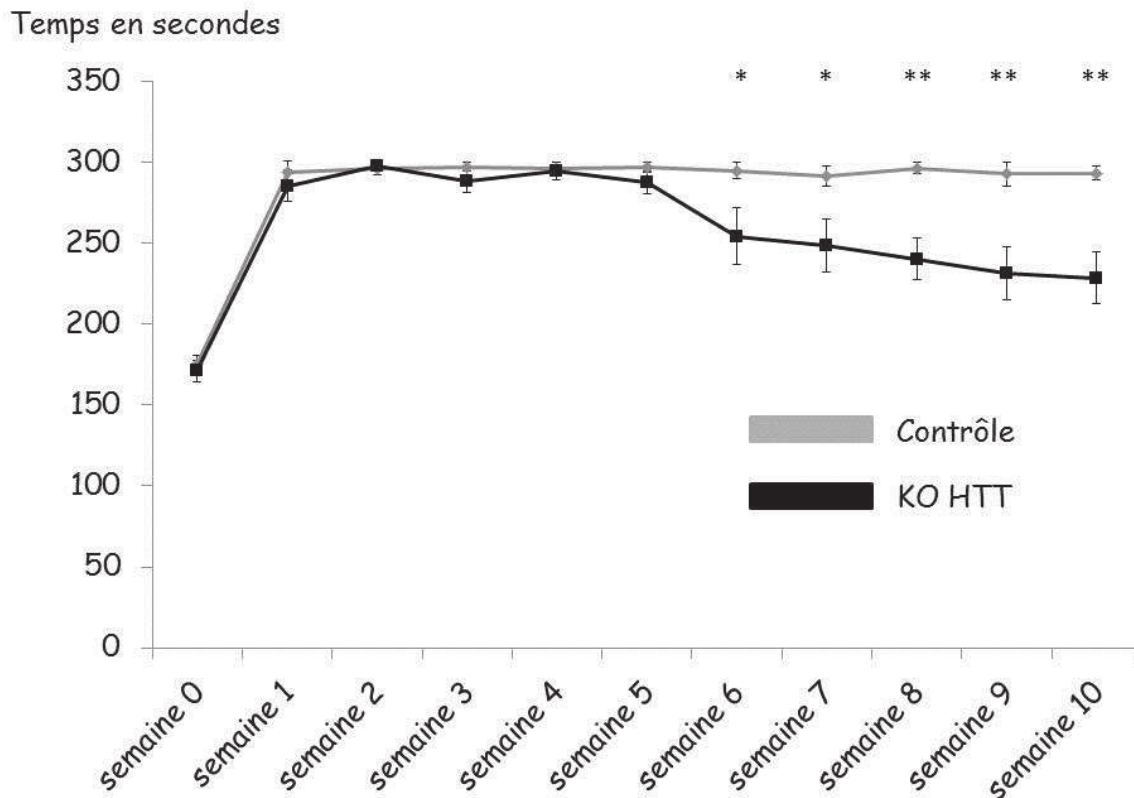


Figure 63 : grip tests avec un lot contrôle (souris HTT fl/fl sans Cre et injectées avec du tamoxifène, n=7 WT) et un lot KO HTT, n=9. La première semaine est l'apprentissage du test lors de l'injection. Le test dure 180 secondes lors de cette période. Puis, le test est porté à 300 secondes. *, p<0,05 ; **, p<0,01, test de Mann Whitney.

L'injection de tamoxifène a eu lieu à 6 semaines de vie et six semaines après injection, une baisse de force est observée. Cette baisse de force s'accroît ensuite légèrement lors des 4 semaines suivantes. Ainsi, 10 semaines après injection, le temps du grip test est diminué de 18% entre le groupe contrôle et le groupe KO HTT.

Cette baisse de force est-elle associée à une diminution de la masse musculaire ?

Différents types de muscles ont été prélevés : quadriceps, gastrocnémien, tibialis anterior, l'extensor digitorum longus (edl, un muscle rapide) et le soleus (un muscle lent) (Figure 64).

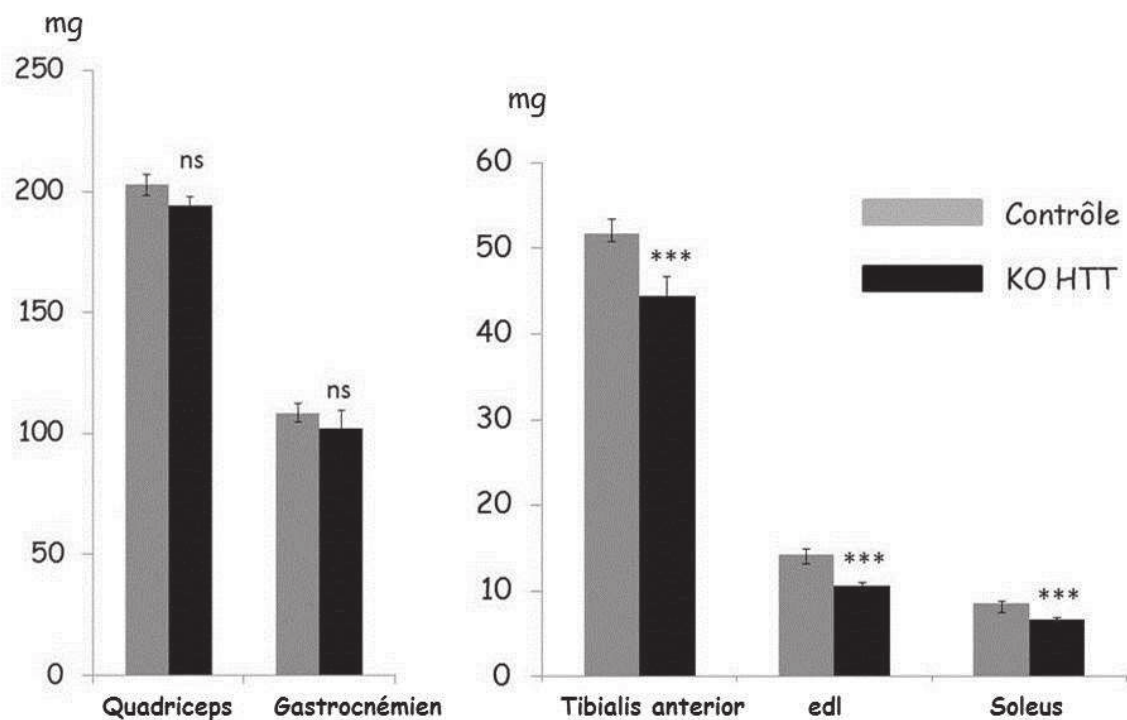


Figure 64 : Poids en mg de 5 types de muscles. Contrôle, n=14, KO HTT, n=18.

Le lot contrôle consiste en l'injection de tamoxifène dans des souris n'exprimant pas la Cre. Contrôle, n=14 ; KO HTT, n=18 ; ns, non significatif ; ***, $p < 0,001$, test de Mann Whitney.

Le poids du quadriceps et du gastrocnémien n'est pas diminué. Les poids moyens du quadriceps des souris souris contrôles et KO HTT sont respectivement de 202,72mg (s.e.m +/- 4,26) et de 194,25 mg (s.e.m. +/- 3,61). Pour le gastrocnémien, les poids WT et KO sont respectivement de 108,54 mg (s.e.m. +/- 3,95) et de 102,15 mg (s.e.m. +/- 7,19).

La masse musculaire est diminuée pour les muscles : tibialis anterior, edl et soleus. Les poids moyens souris contrôles et KO HTT sont respectivement de 51,74 mg (s.e.m. +/- 1,64) et de 44,47 mg (s.e.m. +/- 2,2) pour le tibialis anterior, de 14,21 mg (s.e.m. +/- 0,64) et de 10,61 mg (s.e.m. +/- 0,39) pour l'edl et de 8,51 mg (s.e.m. +/-0,31) et de 6,62 mg (s.e.m. +/-0,3) pour le soleus.

Afin de savoir si la diminution de masse musculaire observée est plus précoce, la masse musculaire du tibialis antérieur a été analysée sur un modèle KO HTT avec injection d'AAV exprimant la Cre recombinase uniquement au niveau du muscle. L'injection a été réalisée à 6 semaines de vie et le prélèvement a eu lieu 6 semaines plus tard.

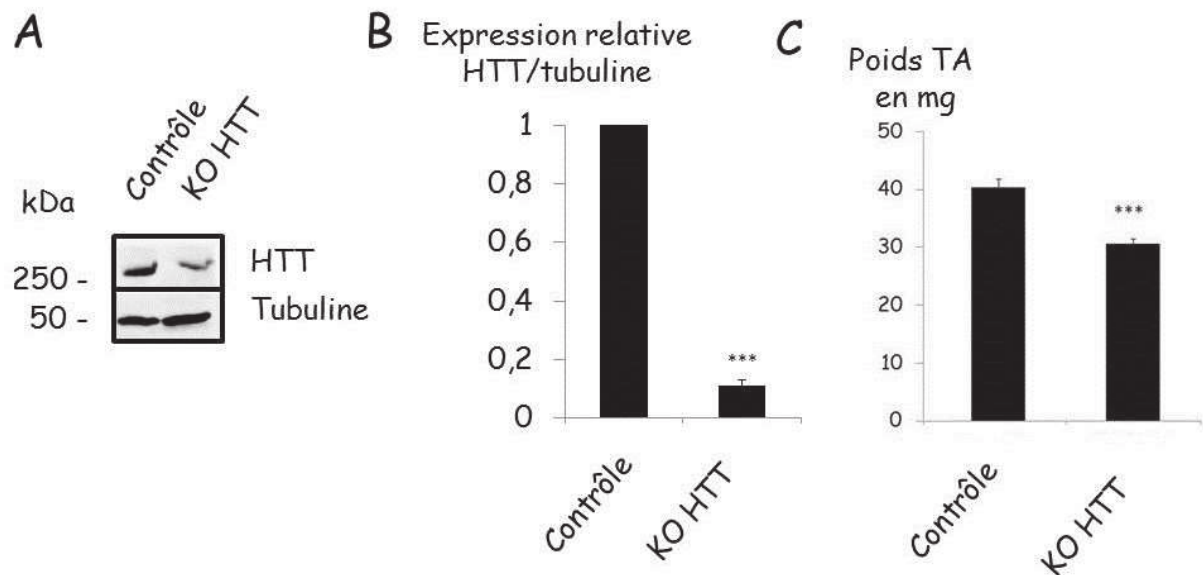


Figure 65 : **A** : Analyse par western-blot quantitatif de l'expression de la huntingtine d'homogénats de muscles contrôles (souris HTT fl/fl n'exprimant pas la Cre recombinase injectées avec AAV contrôle) et de souris de la nouvelle lignée HTT fl/fl injectée avec un AAV exprimant la Cre.

B : L'expression relative est normalisée par rapport au contrôle. n=3 homogénats différents, *** : p<0,001, test de Student.

C : Poids en mg du tibialis anterior (TA). Contrôle, n=6, KO HTT, n=22, ***, p<0,001, test de Mann Whitney.

La baisse d'expression de la HTT obtenue avec ces lots de souris est de l'ordre de 85% dans le tibialis anterior (Figure 65 A & B), six semaines après injection de l'AAV-Cre.

Les poids moyens souris contrôles et KO HTT sont respectivement de 40,36 mg (s.e.m. +/- 1,41) et de 30,64 mg (s.e.m. +/- 0,78). Une diminution de 24 % du poids du tibialis anterior est observée sur des souris âgées de 3 mois et injectées à 6 semaines (Figure 65C).

Cette diminution de poids à 3 mois de vie est corrélée avec le début de baisse de force observée à 3 mois également (Figure 63).

Afin d'évaluer le retentissement au niveau des fibres, j'ai réalisé l'analyse quantitative de l'histologie musculaire des différents marquages effectués par Diane Giovannini – CHU de Grenoble.

3.3 Analyse histologique

Les muscles tibialis anterior (3 souris contrôles et 3 souris KO HTT à 5 mois de vie des lots sur lesquels ont été effectués les grip tests) ont été analysés. Une coloration COX permet de distinguer les fibres de type 1 et 2 (Figure 66A).

J'ai tout d'abord compté le nombre de fibres de type 1 et de fibres de type 2 pour les souris contrôles et les souris KO HTT (Figure 66B).

J'ai ensuite calculé la surface des fibres de type 1 (Figure 66C) et de type 2 (Figure 66D) après sélection de ROI des coupes transversales de muscles.

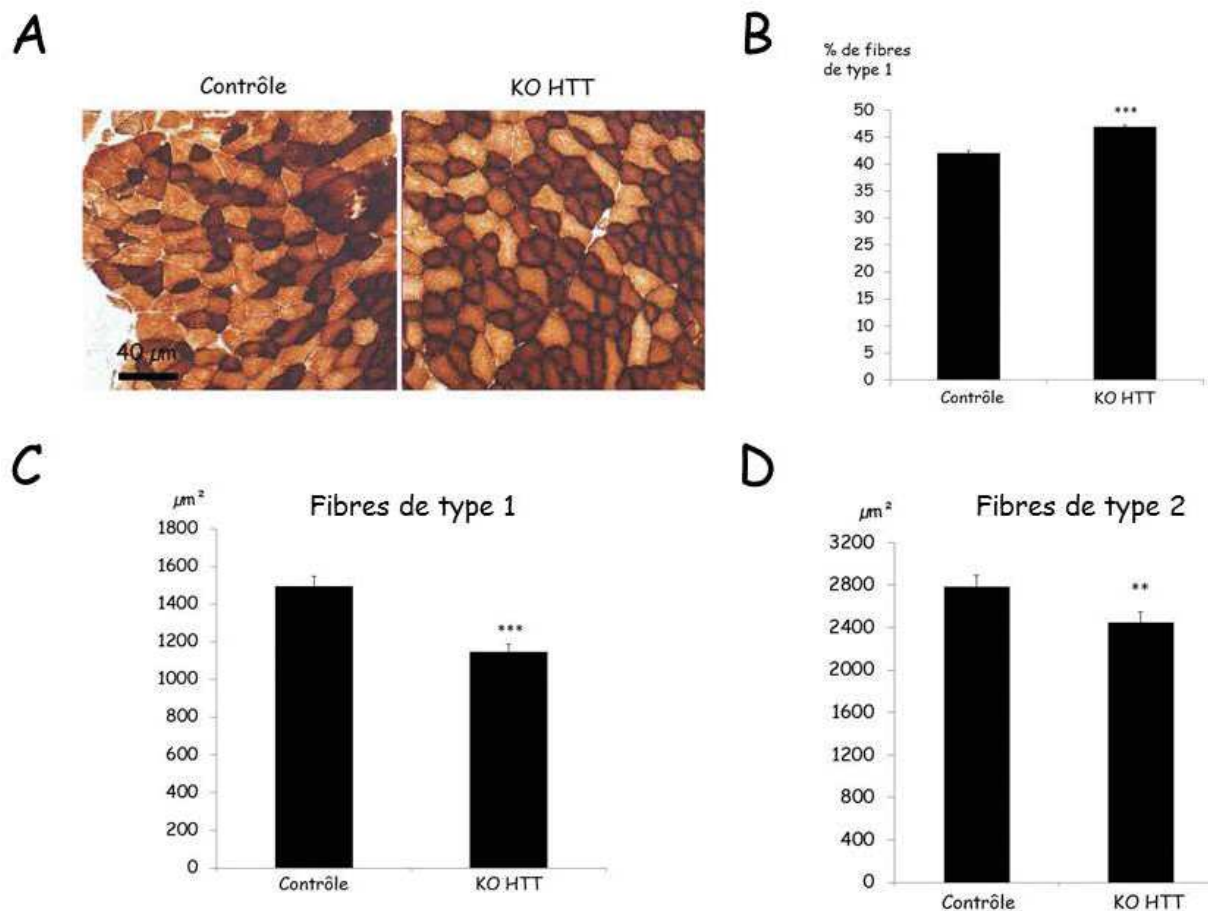


Figure 66 : A : Coupe transversale de tibialis anterior. Coloration COX. Fibres de type 1 (foncé) et de type 2 (clair).

B : Pourcentage de fibres de type 1 de souris contrôles et KO HTT. Contrôle : n=6 ROI, 1436 fibres ; KO HTT, 1235 fibres, n=6 ROI, 3 souris différentes. ***, p<0,001, test de Student.

C : Aire en μm^2 des fibres de type 1. Contrôle, n=111 fibres ; KO HTT, n=135 fibres, 3 souris différentes contrôles et KO HTT. ***, p<0,001, test de Student

D : Aire en μm^2 des fibres de type 2. Contrôle, n=80 fibres ; KO HTT, n=86 fibres, 3 souris différentes contrôles et KO HTT. **, p<0,01, test de Student

La diminution du volume des fibres de type 1 est de 20% (Figure 66C).

La diminution du volume des fibres de type 2 est de 10% (Figure 66D).

Associées à la diminution de la surface des fibres, d'autres anomalies ont été observées en histologie. En particulier, des noyaux internalisés sont présents dans les fibres KO HTT (Figure 67).

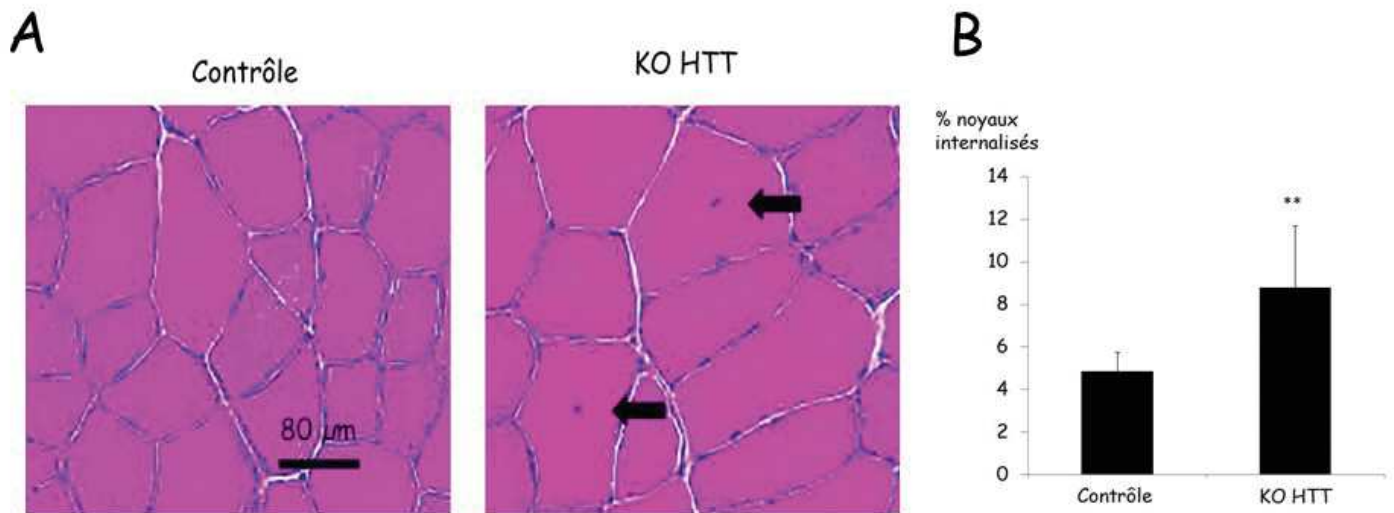


Figure 67 : **A** : Coupe axiale de tibialis anterior. Coloration HES. Présence de noyaux internalisés au centre (KO HTT), flèches noires.
B : Pourcentage de noyaux internalisés dans les fibres de souris contrôle et KO HTT. Contrôle : n=9 ROI, 811 fibres : KO HTT, n=9 ROI 669 fibres, 3 souris différentes contrôles et 3 souris différentes KO HTT. **, $p < 0,01$, test de Student.

Le pourcentage de noyaux internalisés est significativement supérieur dans le modèle KO HTT que dans les WT (Figure 67 B) : 5,1% pour les contrôles et 8,8% pour les KO HTT.

Les défauts fonctionnels mis en évidence (baisse de force, perte de masse musculaire) associés aux défauts d'imagerie calcique des modèles cellulaires du chapitre II posent la question du fonctionnement des protéines de la triade dans le modèle KO HTT développé et notamment de la protéine RyR1. J'ai utilisé le modèle murin KO HTT in vivo que nous avons généré pour savoir si la localisation de cette protéine est altérée.

3.4 Protéines de la triade dans le modèle murin KO HTT *in vivo*

L'immunomarquage du récepteur de la ryanodine a été effectué sur fibres dissociées de l'extensor digitorum longus (edl). Les immunomarquages ne montrent pas d'altération de la localisation du récepteur (Figure 68).

Aucune altération majeure n'est observée en immunofluorescence. L'immunomarquage d'une seule protéine, pour éviter toute réaction croisée, montre en effet un marquage typique du récepteur de la ryanodine (Figure 68).

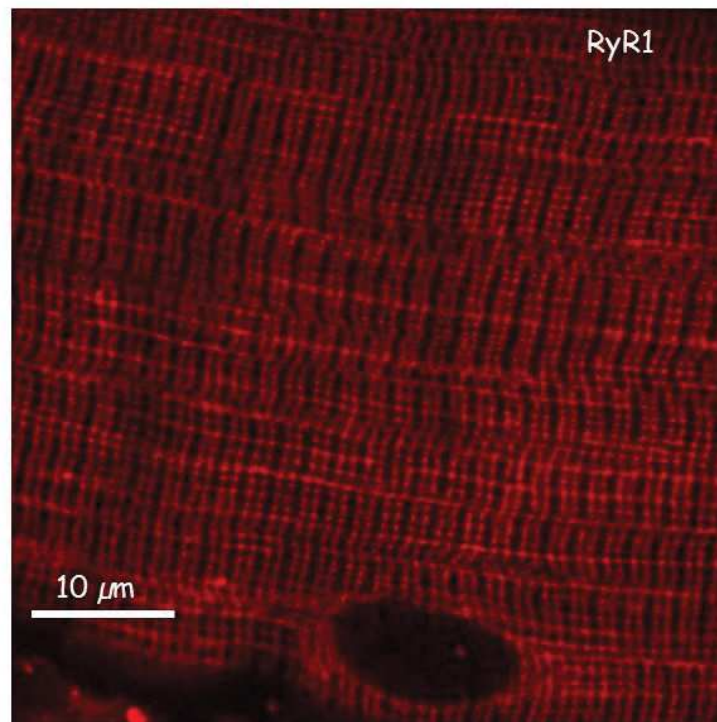


Figure 68 : Immunomarquage de fibres dissociées (muscle edl) de souris KO HTT. Fixation à la PFA 4% et perméabilisation au Triton 1%. Marquage du récepteur de la ryanodine. Les doubles rangées de points sont observées et régulières.

Si la localisation, observée en immunofluorescence, n'apparaît pas modifiée du fait de la forte baisse d'expression de la huntingtine, l'expression de certaines protéines de la triade est affectée.

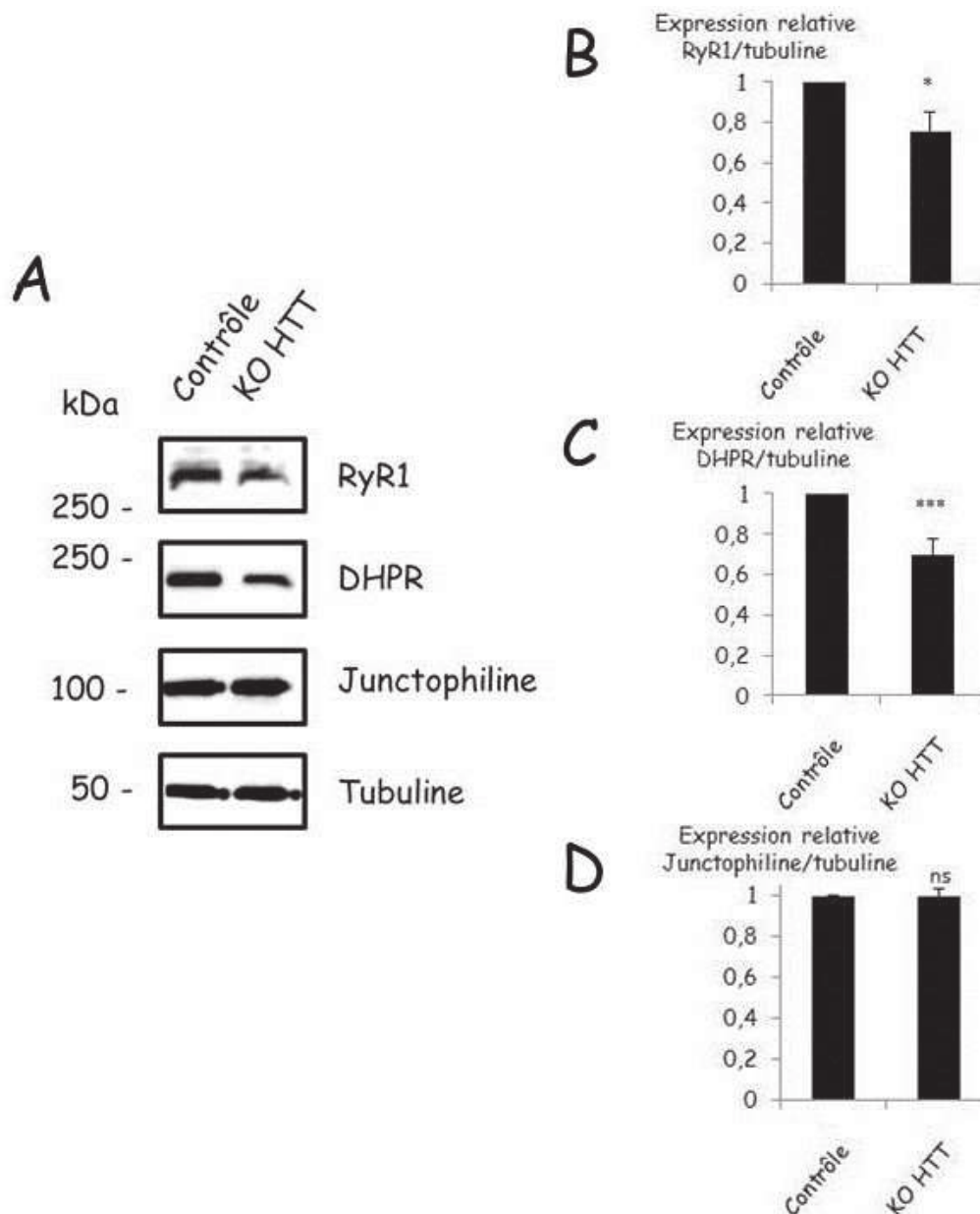


Figure 69 : A : Analyse par western-blot quantitatif de l'expression des protéines de la triade : RyR1, du DHPR $\alpha 1$ et de la junctophiline 1 d'homogénats de muscles contrôles (souris HTT fl/fl n'exprimant pas la Cre recombinase injectées avec du tamoxifène) et de souris de la lignée HTT fl/fl injectées exprimant la Cre recombinase injectées avec du tamoxifène.

B : Quantification par rapport à la tubuline. L'expression relative de RyR1 est normalisée par rapport au contrôle. n=3 homogénats différents, * : $p < 0,05$, test de Student.

C : Quantification par rapport à la tubuline. L'expression relative du DHPR $\alpha 1$ est normalisée par rapport au contrôle. n=3 homogénats différents, *** : $p < 0,001$, test de Student.

D : Quantification par rapport à la tubuline. L'expression relative de la junctophiline 1 est normalisée par rapport au contrôle. n=3 homogénats différents, n.s : non significatif, test de Student.

Une diminution de 33 % du DHPR et une diminution de 25% du récepteur de la ryanodine sont observées (Figures 69 A, B et C). L'expression de la junctophiline 1 n'est pas modifiée.

3.5 Discussion

Le modèle animal avec une baisse de l'expression de la huntingtine dans la totalité des muscles (injection de tamoxifène) montre ainsi une faiblesse musculaire. Cette faiblesse musculaire est également observée avec des modèles murins de la maladie de Huntington (dont le modèle R6/2 et Q140/Q140, Mielcarek et al., 2015). Cette faiblesse musculaire est corrélée à une diminution du relâchement calcique (Chapitre III).

De plus, l'altération de la force est corrélée à une diminution du poids des muscles, en particulier edl, soleus et tibialis anterior. Cette diminution de poids est confirmée dès 6 semaines après baisse de l'expression de la HTT dans le tibialis anterior.

L'analyse histologique montre également une diminution de la surface des fibres. La diminution du poids de ces muscles est donc probablement liée à la diminution de la surface.

Le poids global de la souris et des muscles quadriceps et gastrocnémien n'est en revanche pas significativement diminué. Ceci est observé également dans la littérature dans un modèle murin dont l'expression de la huntingtine est fortement diminuée à l'âge adulte mais dans l'ensemble des tissus (comprenant donc le muscle, le système nerveux central et tous les autres tissus et organes) (Wang et al., 2016). Dans ce modèle, l'injection de tamoxifène est réalisée à l'âge de 4 mois pour certains lots et à l'âge de 8 mois pour d'autres lots. Il n'est pas retrouvé de différence significative de poids (Figure 70).

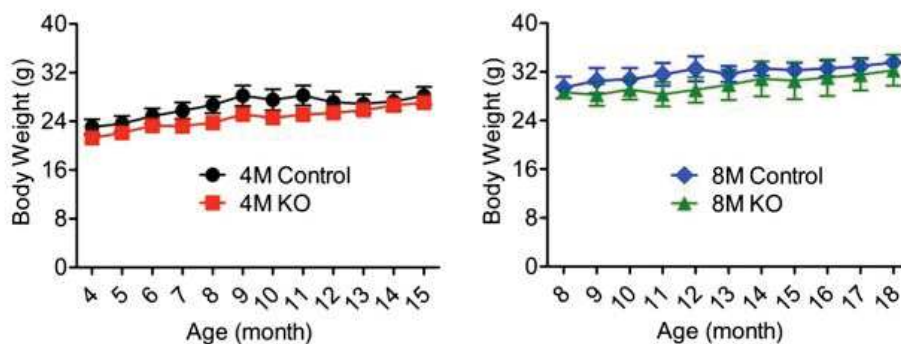


Figure 70 : Poids observé chez des souris avec forte diminution de l'expression de la huntingtine dans la totalité des tissus, à 4 mois de vie (à gauche) et à 8 mois de vie (à droite) (Wang et al., 2016).

La baisse d'expression de la huntingtine uniquement dans les muscles et induite de façon plus précoce (à l'âge de 6 semaines) montre cependant dès l'âge de 3 mois une différence significative du poids de muscles dont le prélèvement est aisément reproductible (soleus, tibialis anterior, edl). En effet, les prélèvements du quadriceps et du gastrocnémien induisent un écart-type plus important. Le phénotype musculaire, lié à la forte baisse d'expression de la huntingtine, est donc présent : baisse de force et baisse de poids. Le niveau de baisse de poids, comme la baisse de force, est de l'ordre de 20%. Par ailleurs, ces défauts sont observés et mesurés relativement précocement, six semaines après injection de tamoxifène. Les défauts musculaires observés chez les modèles murins de la pathologie en particulier de perte de poids sont de l'ordre de 50% pour le tibialis anterior et de 20 à 25% pour le quadriceps (Mielcarek et al., 2015) pour des souris âgées de 12 semaines. Le phénotype musculaire de ces modèles est donc plus marqué que les modèles que nous avons générés. Les modèles de la pathologie comportent en effet deux éléments : la baisse d'expression de la protéine non mutée d'une part et l'expression d'une protéine mutée d'autre part. Les modèles que nous avons générés montrent ainsi qu'une part du phénotype dans la maladie de Huntington est due à la baisse d'expression de la protéine non mutée.

Le phénotype observé est corrélé en histologie avec une baisse du diamètre des fibres mais aussi une modification du ratio de types de fibres et une internalisation nucléaire plus importante. Ces deux dernières caractéristiques sont retrouvées dans les modèles de la pathologie (Hering et al., 2016 ; Kosinski et al., 2007).

Le phénotype musculaire des modèles murins générés est donc corrélé à une baisse de relâchement calcique au niveau cellulaire (Chapitre III). Nous avons montré également une diminution d'expression de l'un des récepteurs de la triade dans le modèle cellulaire humain avec forte baisse de l'expression de la huntingtine. L'altération de l'expression de récepteurs est également confirmée au niveau des modèles *in vivo* avec non seulement une diminution de l'expression du récepteur de la ryanodine, mais également une diminution du DHPR (Figure 70). L'une des questions posées est : y a-t-il une diminution d'expression de toutes les protéines de la triade ? La réponse est non : la junctophiline 1 est exprimée de façon identique dans les modèles avec baisse de HTT versus les contrôles (Figure 69). Cette altération des principaux récepteurs : RyR1 et DHPR est en lien avec la perturbation des relâchements calciques. Cette baisse d'expression des deux récepteurs n'est cependant pas corrélée à une modification de la localisation de ces protéines, comme le montrent les immunomarquages du modèle *in vivo* (Figure 68).

Les trois hypothèses émises en discussion du chapitre II précédent sont reprises ici. Tout d'abord, il peut y avoir une altération transcriptionnelle des récepteurs de la triade avec diminution d'expression. Ensuite, la huntingtine pourrait avoir une interaction directe avec le récepteur de la ryanodine. Enfin, l'absence de HTT induirait une modification du transport des récepteurs de la triade et une dégradation de ceux-ci.

En vue de répondre à l'hypothèse du rôle de la huntingtine dans le trafic de certaines protéines dans le muscle différentes investigations ont été réalisées et des perspectives sont proposées en faveur de cette hypothèse.

IV Perspectives

La baisse d'expression de la HTT dans les myotubes induit des défauts de relâchement de calcium. Associée à ces défauts, il y a une baisse d'expression de RyR1. La HTT pourrait agir au niveau de la transcription de RyR1, ou lors de la stabilisation de la triade ou enfin, au niveau du trafic des protéines dont RyR1. Aucune étude actuelle ne porte sur le trafic de RyR1. J'ai donc choisi d'étudier tout d'abord la HTT elle-même. J'ai émis l'hypothèse qu'en introduisant à nouveau la protéine HTT, les défauts de relâchements de calcium pourraient être restaurés.

Je n'ai pas réussi à produire des lentivirus comportant la protéine HTT entière, celle-ci est en effet trop grande pour être intégrée dans un lentivirus. J'ai donc sélectionné un fragment de cette protéine : le fragment N-terminal comportant les acides aminés 1 à 586. En effet, ce fragment contient notamment les sites de liaison avec des protéines partenaires impliquées dans le transport (Figure 21). Par ailleurs, j'ai également produit des lentivirus avec un fragment C-terminal, celui-ci étant connu pour être toxique (El-Daher et al., 2015).

J'ai étudié les relâchements de calcium dans les myotubes humains après extinction de la protéine endogène par shRNA HTT et expression du fragment N-terminal ou du fragment C-terminal par transduction lentivirale.

4.1 Expression d'un fragment N-terminal de la HTT dans le muscle

Le fragment N-ter (acides aminés 1 à 586) a été choisi car il contient l'exon 1 ainsi que les sites de fixation de protéines comme HAP1 (huntingtin associated protein 1) impliquée dans le complexe nécessaire au trafic vésiculaire.

J'ai réexprimé les fragments, fusionnés à mCherry, dans des myotubes humains (Figure 71) après avoir diminué l'expression de la HTT endogène (à l'aide d'un shRNA HTT qui n'agit pas sur les fragments), puis j'ai caractérisé par imagerie calcique les relâchements de calcium induits par une dépolarisation.

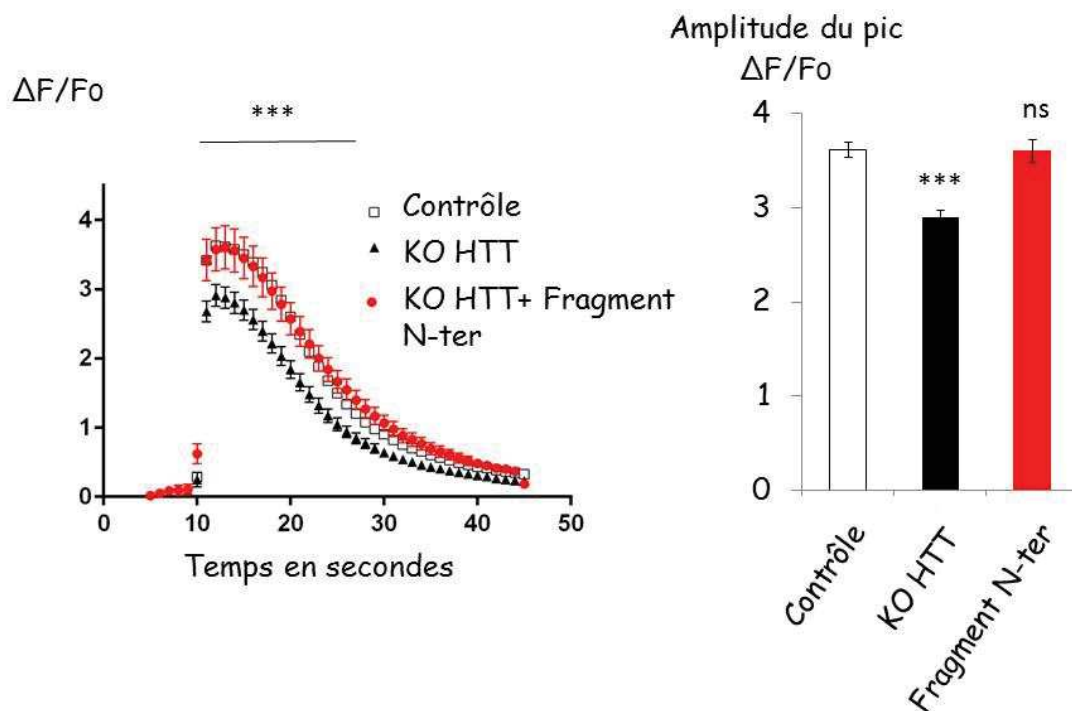


Figure 71 : Variation de fluorescence du Fluo-4 sur cellules humaines avec virus contrôle (contrôle), avec virus shRNA HTT (KO HTT) et avec shRNA HTT + fragment N-ter (KO + fragment N-ter). Stimulation KCl 140mM avec calcium externe 2mM. Contrôle, n=53 myotubes ; KO HTT, n=57 myotubes ; KO + fragment N-ter, n=52 myotubes, de trois expériences différentes. ***, p<0,001, ANOVA à deux facteurs, après correction de Bonferroni.

Moyenne du pic de fluorescence. ***, p<0,001, ns : non significatif, ANOVA à deux facteurs, après correction de Bonferroni.

Cette expérience montre une restauration complète des relâchements de calcium.

Avec forte baisse d'expression de la huntingtine, une diminution de 20% du pic calcique est observée sur ce modèle cellulaire (Figure 71). L'expression de la partie N-ter de la huntingtine (acides aminés 1 à 586) permet de restaurer totalement ce niveau de relâchement calcique (Figure 71). Le niveau optimal d'expression du fragment N-terminal est à l'étude.

En vue d'avancer sur le rôle de la protéine totale, j'ai effectué le même travail avec un fragment C-terminal.

4.2 Expression d'un fragment C-terminal de la HTT dans le muscle

J'ai produit des lentivirus avec un fragment C-terminal de la HTT (allant des acides aminés 2800 à 3144) et j'ai réalisé comme précédemment une analyse en imagerie calcique des relâchements de calcium dans les myotubes humains exprimant uniquement ce fragment après une stimulation par dépolarisation KCl 140mM et calcium externe 2mM (Figure 72).

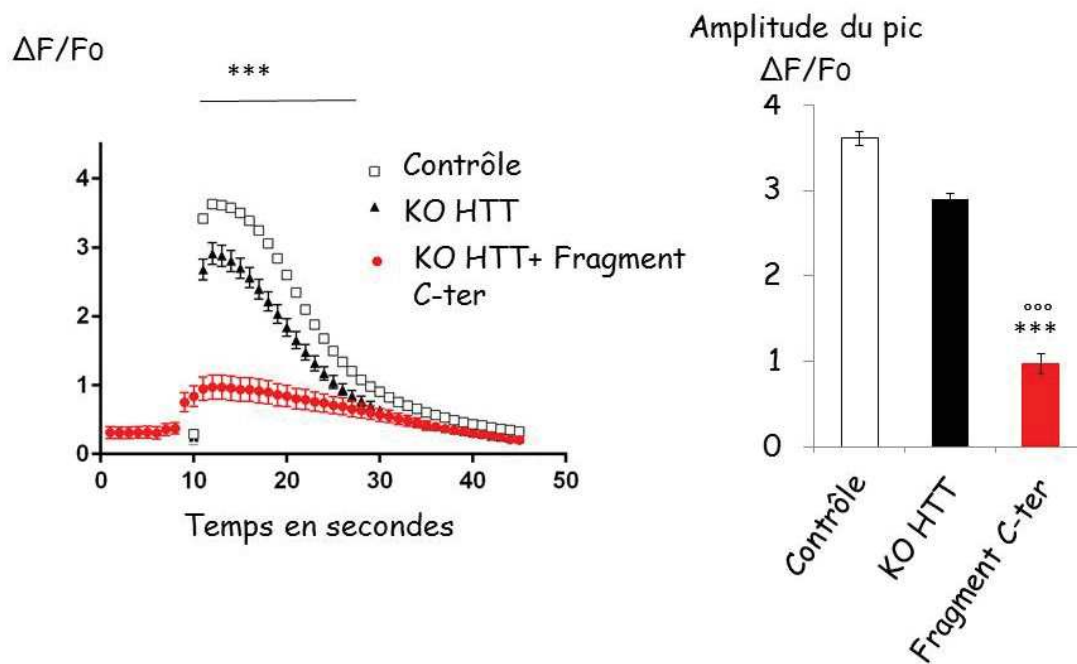


Figure 72 : Variation de fluorescence du Fluo-4 sur cellules humaines avec virus contrôle (contrôle), avec virus shRNA HTT (KO HTT) et avec shRNA HTT + fragment C-ter (KO + fragment C-ter). Stimulation KCl 140mM et calcium externe 2mM. Contrôle, n=53 myotubes ; KO HTT, n=57 myotubes ; KO + fragment N-ter, n=52 myotubes, de trois expériences différentes. ***, p<0,001, ns : non significatif, ANOVA à deux facteurs, après correction de Bonferroni. Moyenne du pic de fluorescence. ***, p<0,001 par rapport au contrôle, °°, p<0,001 par rapport au KO HTT, ANOVA à deux facteurs, après correction de Bonferroni.

Le fragment C-terminal de la HTT exprimé seul dans les myotubes humains, à MOI 8, conduit à une forte diminution du relâchement calcique. La partie C-terminale transduite de la HTT a un effet toxique sur l'homéostasie calcique. Ceci a été montré au niveau neuronal (El Daher et al., 2015). Le niveau d'expression du fragment C-terminal induisant cette toxicité est à l'étude.

Les fragments N-terminaux et C-terminaux de la HTT non mutée produisent un effet fonctionnel sur les myotubes. En particulier, l'effet fonctionnel du fragment N-terminal pourrait être lié à l'hypothèse émise de fonction de trafic de la HTT dans les myotubes. En effet, ce fragment N-terminal comporte les sites de fixation de protéines impliquées dans le complexe de trafic vésiculaire dans les neurones. Ce fragment N-terminal est-il donc mobile ? J'ai testé l'hypothèse de la mobilité du fragment N-terminal de la HTT dans les myotubes. Pour tester cette hypothèse, j'ai débuté l'analyse au spinning disk confocal des mouvements du fragment N-terminal dans des myotubes à 5 jours de différenciation. Les analyses, montrant la mobilité du fragment N-terminal de la HTT, sont à poursuivre.

De plus, lorsque l'expression de la HTT est abaissée, l'expression de RyR1 est abaissée. Dans le cadre de l'hypothèse de trafic intracellulaire, RyR1 pourrait être l'une des vésicules transportées par la HTT. RyR1 est une protéine trop grande pour être intégrée dans un lentivirus et suivre ses mouvements. Nous avons donc choisi une protéine de la triade permettant le suivi des mouvements : la triadine.

Nous avons choisi d'abaisser l'expression de la HTT dans des myotubes et de regarder le trafic de cette protéine.

4.3 Rôle de la huntingtine dans le trafic d'une protéine de la triade : la triadine

Au sein du laboratoire, Muriel Sébastien a mis en place un système d'étude du trafic de la triadine. Il s'agit de réexprimer, grâce à des lentivirus contenant la triadine associée à la GFP, cette protéine dans des cellules murines KO triadine. Les mouvements de la triadine-GFP sont ensuite suivis par imagerie confocale sur cellules vivantes.

En vue de savoir si la HTT a un rôle dans le trafic, nous avons utilisé ce système (avec l'aide de Muriel Sébastien et de Perrine Teyssier Aubin) après avoir diminué fortement l'expression de la huntingtine à l'aide d'un sh RNA HTT ou après avoir transduit les cellules avec un sh RNA contrôle.

La triadine forme alors des clusters. Ces clusters sont des triades qui vont rejoindre leur localisation finale en double rangée de points au cours de la différenciation des myotubes.

J'ai analysé la fraction de mobilité des clusters c'est-à-dire le nombre de mouvements (points mobiles sur points totaux) par ROI (Figure 73).

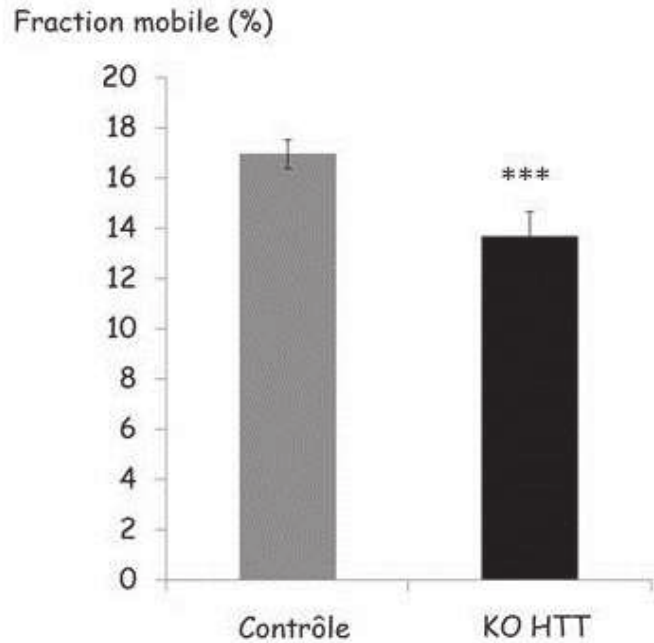


Figure 73 : Fraction mobile (points mobiles/points totaux par ROI) sur des fibres musculaires KO Triadine avec réexpression de la triadine-GFP et sh RNA contrôle (contrôle) ou sh RNA HTT (KO HTT). n=38 ROI contrôles et n=38 ROI KO HTT, *** : $p < 0,001$. Moyenne contrôle : 16,95 et moyenne KO HTT : 13,71.

Une diminution de 20% de la fraction mobile est observée dans ce modèle (Figure 73).
Les analyses de trafic de différentes protéines sont à l'étude.

4.4 Discussion

Nos tentatives pour réexprimer la protéine HTT non mutée dans le muscle sont restées infructueuses, du fait de la taille de la protéine. L'étude de fragments N-terminal et C-terminal de la protéine a pu être mise en place.

Le fragment N-terminal montre un effet fonctionnel : restauration totale du relâchement calcique. L'étude de ce fragment plus en détail et sur d'autres modèles permettrait de voir une piste sur le fonctionnement dans le muscle d'une part et sur une possibilité thérapeutique d'autre part.

Le fragment C-terminal apparaît lui toxique, à MOI 8, au niveau de l'homéostasie calcique musculaire. La toxicité de fragments C-terminaux (plus grands) a précédemment été montrée (El-Daher et al., 2015). Nos résultats sont en accord avec cette publication.

L'étude des mouvements des fragments N-terminal et C-terminal de la HTT non mutée permettraient d'émettre l'hypothèse d'un rôle de trafic dans les myotubes à l'instar de celui observé au niveau neuronal (Figure 74). En effet, ces mouvements pourraient être liés aux microtubules. De plus, les protéines associées à la huntingtine et impliquées dans le trafic neuronal pourraient également être retrouvées au niveau musculaire.

Au niveau neuronal, des molécules transportées par la huntingtine ont pu être identifiées comme le BDNF. En revanche, aucune molécule au niveau musculaire n'a été identifiée.

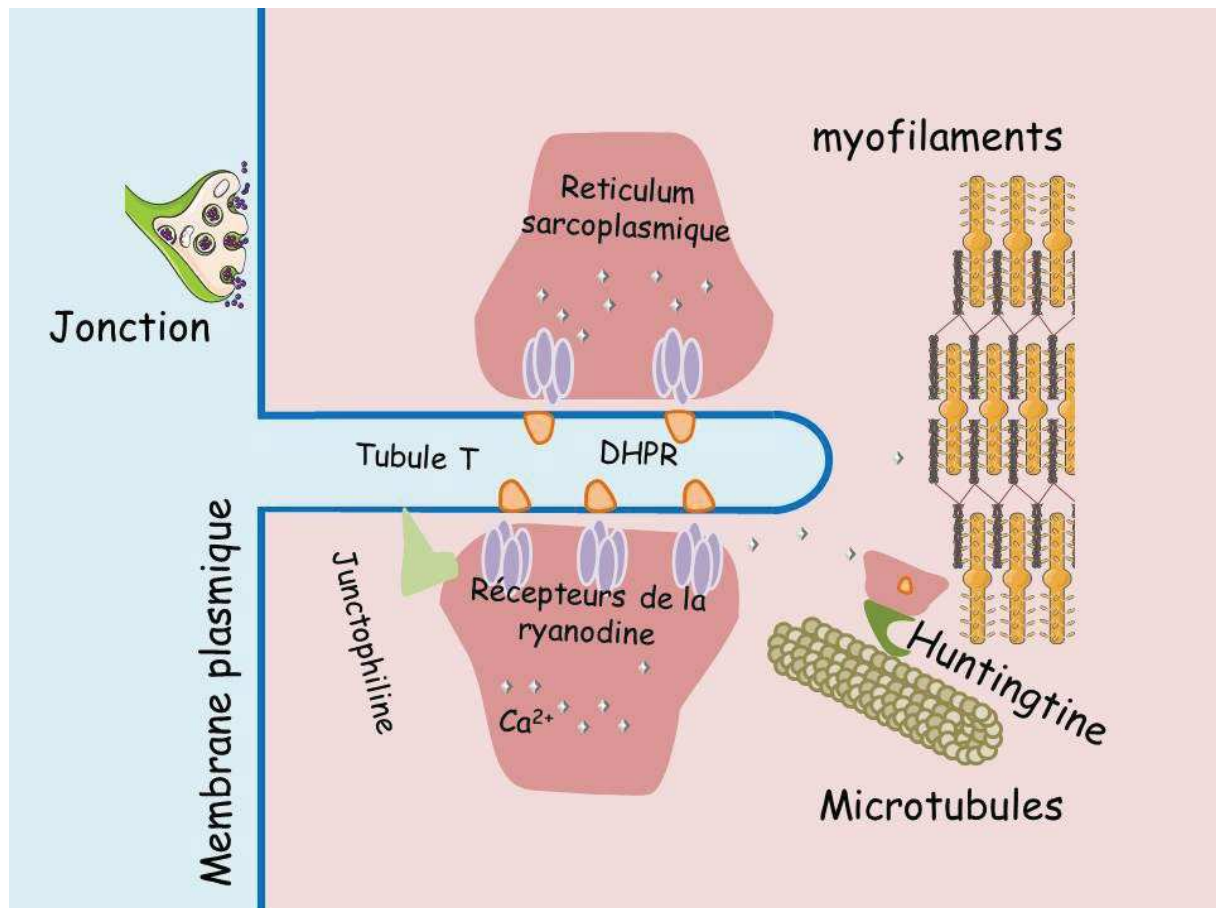


Figure 74 : Hypothèse du rôle de trafic de la huntingtine dans le muscle

Afin de poursuivre ces investigations, les études sur le trafic de protéines des myotubes comme les protéines de la triade pourraient être entreprises. De nouveaux outils doivent être mis en place pour permettre la réalisation de ce travail.

Conclusion générale

Ce travail de thèse a permis de montrer que la huntingtine, protéine dont les fonctions sont décrites essentiellement dans le cerveau, est également indispensable dans le muscle.

Aucune publication à ce jour n'a montré l'expression de cette protéine dans le muscle. Il a donc fallu créer de nouveaux outils adaptés à cette question. Partant, pour ainsi dire, de peu d'éléments bibliographiques de la thématique principale (huntingtine et muscle), ce travail de thèse a permis d'ouvrir plusieurs voies d'étude.

Les résultats obtenus résumés dans la figure 75 suggèrent tout d'abord que la huntingtine peut avoir un rôle dans le trafic musculaire, à l'instar des neurones.

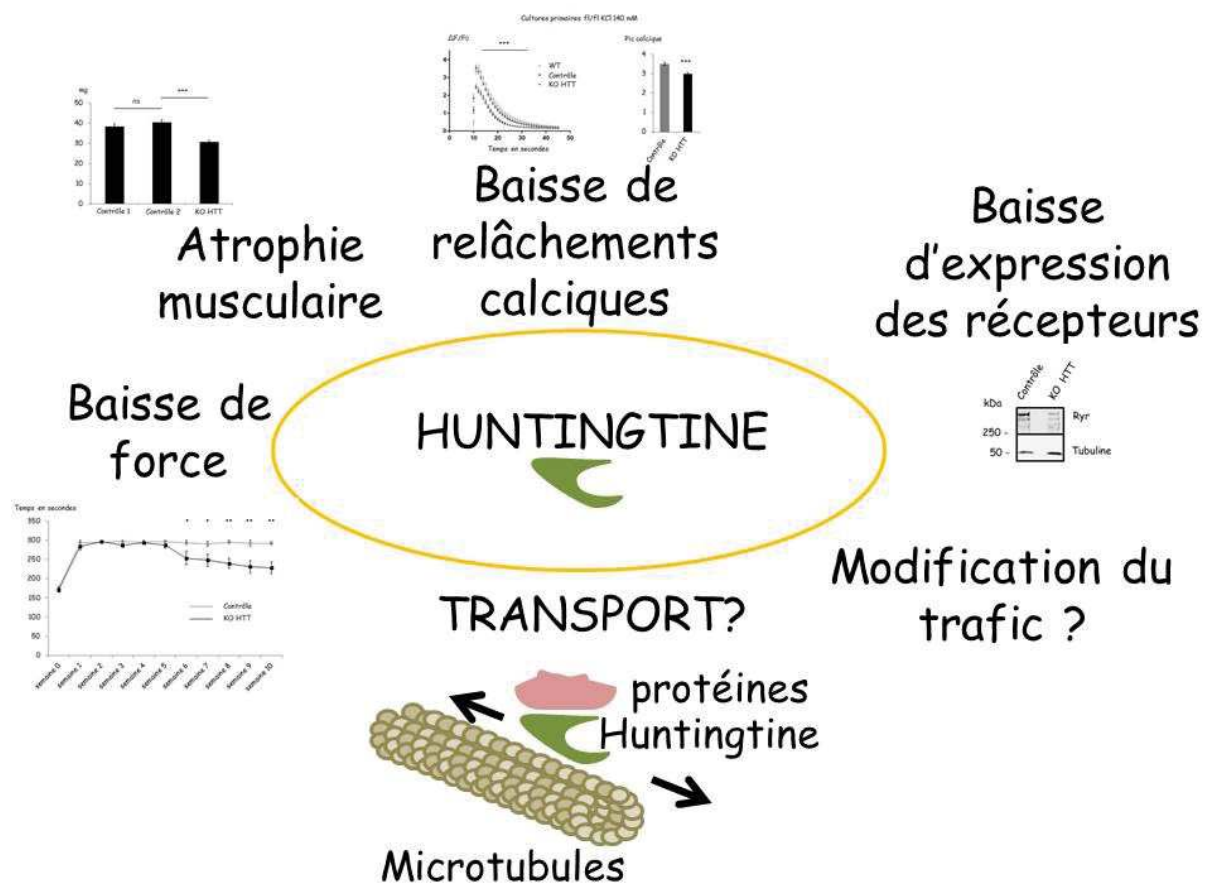


Figure 75 : Sans la huntingtine, nous avons montré qu'une baisse de force était présente, ainsi qu'une atrophie musculaire, une baisse des relâchements calciques, une baisse d'expression des récepteurs principaux de la triade et une modification du trafic de la triadine. La huntingtine pourrait donc être impliquée directement dans le trafic intracellulaire musculaire.

Les recherches actuelles sur le trafic intracellulaire dans les myotubes en sont à leur commencement. De nouveaux outils sont donc à développer pour permettre de comprendre comment les principales protéines de la triade, par exemple, se meuvent au sein du myotube. Un autre élément intéressant est l'augmentation de l'internalisation nucléaire dans nos modèles. Il se peut ainsi que la huntingtine soit liée aux mouvements du noyau.

Une autre voie nécessaire est de trouver l'interactome de la huntingtine dans le muscle. Il est tout à fait possible que des isoformes de HAP1 par exemple soient présentes et permettent la ou les fonctions de la huntingtine dans le muscle. Parmi ces fonctions, nous avons cité le trafic intracellulaire, mais l'autophagie est également une voie d'étude.

Enfin, une dernière voie d'étude est celle de l'approche thérapeutique (Figure 76).

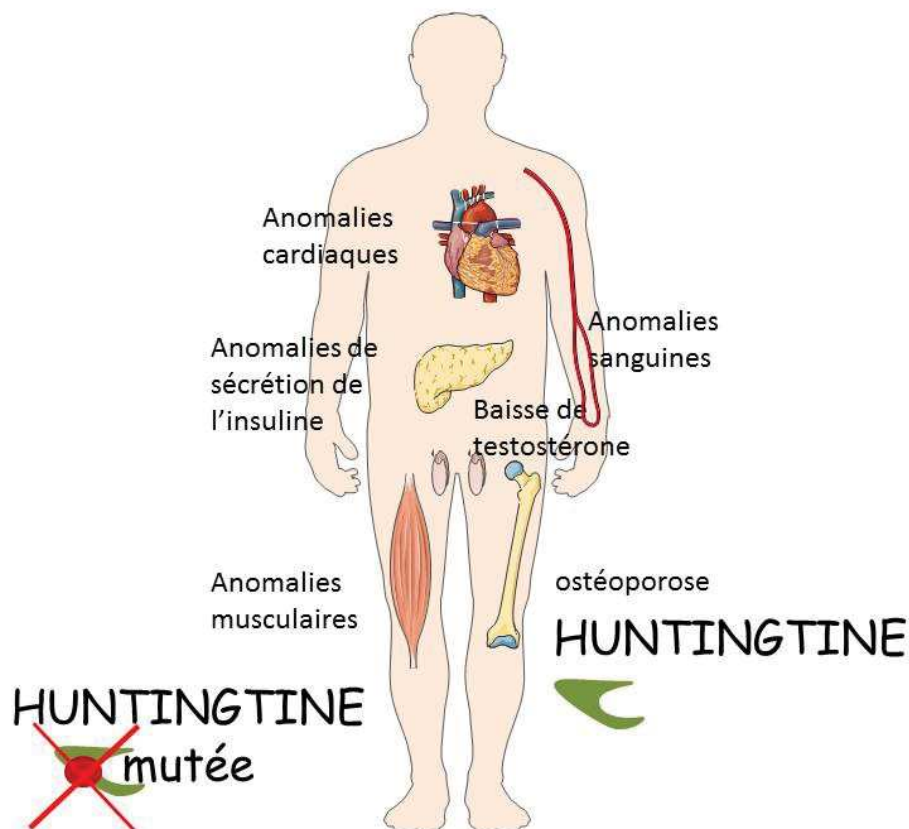


Figure 76 : La thérapie de la maladie de Huntington doit prendre en compte non seulement le corps entier (et pas uniquement le cerveau) et doit se focaliser sur les deux aspects : protéine non mutée à restaurer et protéine mutée à dégrader.

Nos travaux montrent que le phénotype musculaire observé n'est pas directement et uniquement lié à un défaut du système nerveux central. Ainsi, si la thérapeutique veut être

totalemment efficace, il ne suffira pas d'agir uniquement au sein du système nerveux central. Une approche multisystémique est nécessaire (Figure 76).

Enfin, la restauration de la protéine non mutée est une piste thérapeutique intéressante. Elle est tout d'abord nécessaire pour corriger entièrement les défauts observés. Elle pourrait ensuite permettre d'équilibrer la balance entre effet toxique de la protéine mutée et manque de protéine non mutée. De même concernant cette approche, la dégradation de la protéine mutée ne sera peut-être pas suffisante pour permettre une restauration globale.

Comprendre les mécanismes impliquant la huntingtine dans le muscle permettra probablement d'avancer sur les pistes thérapeutiques de cette maladie génétique rare mortelle.

Bibliographie

A

- Abmayr, S.M., and Pavlath, G.K. (2012). Myoblast fusion: lessons from flies and mice. *Development* 139, 641–656.
- Abbruzzese, G., Dall’Agata, D., Morena, M., Spadavecchia, L., Ratto, S., and Favale, E. (1990). Impaired habituation of long-latency stretch reflexes of the wrist muscles in Huntington’s disease. *Mov Disord* 5, 32–35.
- Akhmanova, A., and Steinmetz, M.O. (2015). Control of microtubule organization and dynamics: two ends in the limelight. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16, 711–726.
- Albin, R.L., Reiner, A., Anderson, K.D., Penney, J.B., and Young, A.B. (1990). Striatal and nigral neuron subpopulations in rigid Huntington’s disease: implications for the functional anatomy of chorea and rigidity-akinesia. *Ann Neurol* 27, 357–365.
- Allard, B., Bernengo, J.C., Rougier, O., and Jacquemond, V. (1996). Intracellular Ca²⁺ changes and Ca²⁺-activated K⁺ channel activation induced by acetylcholine at the end-plate of mouse skeletal muscle fibres. *J. Physiol. (Lond.)* 494 (Pt 2), 337–349.
- Alzheimer, A. (1911). Über die anatomische Grundlage der Huntingtonschen Chorea und der choreatischen Bewegungen überhaupt. *Neurol Centralblatt* 30, 891-892.
- Anderson, D.G., Walker, R.H., Connor, M., Carr, J., Margolis, R.L., and Krause, A. (2017). A Systematic Review of the Huntington Disease-Like 2 Phenotype. *J Huntingtons Dis* 6, 37–46.
- Andreassen, O.A., Dedeoglu, A., Stanojevic, V., Hughes, D.B., Browne, S.E., Leech, C.A., Ferrante, R.J., Habener, J.F., Beal, M.F., and Thomas, M.K. (2002). Huntington’s disease of the endocrine pancreas: insulin deficiency and diabetes mellitus due to impaired insulin gene expression. *Neurobiol. Dis.* 11, 410–424.
- Andrich, J., Schmitz, T., Saft, C., Postert, T., Kraus, P., Epplen, J.T., Przuntek, H., and Age-link, M.W. (2002). Autonomic nervous system function in Huntington’s disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* 72, 726–731.
- Ansved, T., Lundin, A., and Anvret, M. (1998). Larger CAG expansions in skeletal muscle compared with lymphocytes in Kennedy disease but not in Huntington disease. *Neurology* 51, 1442–1444.
- Apolinário, T.A., Paiva, C.L.A., and Agostinho, L.A. (2017). REVIEW-ARTICLE Intermediate alleles of Huntington’s disease HTT gene in different populations worldwide: a systematic review. *Genet. Mol. Res.* 16.

- de Aragao, B.C., Rodrigues, H.A., Valadao, P.A.C., Camargo, W., Naves, L.A., Ribeiro, F.M., and Guatimosim, C. (2016). Changes in structure and function of diaphragm neuromuscular junctions from BACHD mouse model for Huntington's disease. *Neurochem Int* 93, 64–72
- Arenas, J., Campos, Y., Ribacoba, R., Martin, M.A., Rubio, J.C., Ablanedo, P., and Cabello, A. (1998). Complex I defect in muscle from patients with Huntington's disease. *Ann Neurol* 43, 397–400.
- Arnulf, I., Nielsen, J., Lohmann, E., Schiefer, J., Schieffer, J., Wild, E., Jennum, P., Konofal, E., Walker, M., Oudiette, D., et al. (2008). Rapid eye movement sleep disturbances in Huntington disease. *Arch. Neurol.* 65, 482–488.
- Avila, G., Lee, E.H., Perez, C.F., Allen, P.D., and Dirksen, R.T. (2003). FKBP12 binding to RyR11 modulates excitation-contraction coupling in mouse skeletal myotubes. *J. Biol. Chem.* 278, 22600–22608.
- Aziz, N.A., van der Burg, J.M.M., Landwehrmeyer, G.B., Brundin, P., Stijnen, T., EHDI Study Group, and Roos, R. a. C. (2008). Weight loss in Huntington disease increases with higher CAG repeat number. *Neurology* 71, 1506–1513.
- Aziz, N.A., Anguelova, G.V., Marinus, J., van Dijk, J.G., and Roos, R. a. C. (2010). Autonomic symptoms in patients and pre-manifest mutation carriers of Huntington's disease. *Eur. J. Neurol.* 17, 1068–1074.

B

- Babonneix L. (1925). Quelques étapes dans l'histoire de la chorée. *Le Monde médical* 35 : 852-67.
- Bakker, A.J., Head, S.I., and Stephenson, D.G. (1996). Measurement of membrane potential and myoplasmic [Ca²⁺] in developing rat myotubes at rest and in response to stimulation. *Cell Calcium* 19, 409–418.
- Baig, S.S., Strong, M., Quarrell, O.W. (2016). The global prevalence of Huntington's disease: a systematic review and discussion. *Neurodegenerative Disease Management*, 6(4), 331-343.
- Baine, F.K., Krause, A., Greenberg, L.J. (2016). The Frequency of Huntington Disease and Huntington Disease-Like 2 in the South African Population. *Neuroepidemiology*, 46(3), 198-202.
- Bär, K.J., Boettger, M.K., Andrich, J., Epplen, J.T., Fischer, F., Cordes, J., Koschke, M., and Agelink, M.W. (2008). Cardiovagal modulation upon postural change is altered in Huntington's disease. *Eur. J. Neurol.* 15, 869–871.

- Barlowe, C. (1998). COPII and selective export from the endoplasmic reticulum. *Biochim. Biophys. Acta* *1404*, 67–76.
- Bates, G. (2003). Huntingtin aggregation and toxicity in Huntington's disease. *Lancet* *361*, 1642–1644.
- 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.
- Baudic, S., Maison, P., Dolbeau, G., Boissé, M.-F., Bartolomeo, P., Dalla Barba, G., Traykov, L., and Bachoud-Lévi, A.-C. (2006). Cognitive impairment related to apathy in early Huntington's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* *21*, 316–321.
- Bauer, P., Laccone, F., Rolfs, A., Wüllner, U., Bösch, S., Peters, H., Liebscher, S., Scheible, M., Epplen, J.T., Weber, B.H.F., et al. (2004). Trinucleotide repeat expansion in SCA17/TBP in white patients with Huntington's disease-like phenotype. *J. Med. Genet.* *41*, 230–232.
- Beard, N.A., Sakowska, M.M., Dulhunty, A.F., and Laver, D.R. (2002). Calsequestrin is an inhibitor of skeletal muscle ryanodine receptor calcium release channels. *Biophys. J.* *82*, 310–320.
- Bechtel, N., Scahill, R.I., Rosas, H.D., Acharya, T., van den Bogaard, S.J.A., Jauffret, C., Say, M.J., Sturrock, A., Johnson, H., Onorato, C.E., et al. (2010). Tapping linked to function and structure in premanifest and symptomatic Huntington disease. *Neurology* *75*, 2150–2160.
- Bell, J. (1934). *Nervous disease and muscular dystrophies. Part I. Huntington's chorea.* Cambridge University Press. 67p.
- Bezprozvanny, I. (2009). Calcium signaling and neurodegenerative diseases. *Trends Mol Med* *15*, 89–100.
- Bianconi, E., Piovesan, A., Facchin, F., Beraudi, A., Casadei, R., Frabetti, F., Perez-Amodio, S. (2013). An estimation of the number of cells in the human body. *Annals of human biology*, *40*(6), 463-471.
- Billings, P.R., Kohn, M.A., de Cuevas, M., Beckwith, J., Alper, J.S., and Natowicz, M.R. (1992). Discrimination as a consequence of genetic testing. *Am. J. Hum. Genet.* *50*, 476–482.
- Blekher, T., Johnson, S.A., Marshall, J., White, K., Hui, S., Weaver, M., Gray, J., Yee, R., Stout, J.C., Beristain, X., et al. (2006). Saccades in presymptomatic and early stages of Huntington disease. *Neurology* *67*, 394–399.

- Blekher, T.M., Yee, R.D., Kirkwood, S.C., Hake, A.M., Stout, J.C., Weaver, M.R., and Foroud, T.M. (2004). Oculomotor control in asymptomatic and recently diagnosed individuals with the genetic marker for Huntington's disease. *Vision Res.* *44*, 2729–2736.
- Block, B.A., Imagawa, T., Campbell, K.P., and Franzini-Armstrong, C. (1988). Structural evidence for direct interaction between the molecular components of the transverse tubule/sarcoplasmic reticulum junction in skeletal muscle. *J. Cell Biol.* *107*, 2587–2600.
- Bodine, S.C., and Baehr, L.M. (2014). Skeletal muscle atrophy and the E3 ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx/atrogen-1. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *307*, E469-484.
- Bohlega, S., Al-Tahan, A., Kambouris, M., and Divakaran, M. (2001). Neurodegenerative Huntington-like disorder. *Mov. Disord.* *16*, 533–534.
- Bombard, Y., Veenstra, G., Friedman, J.M., Creighton, S., Currie, L., Paulsen, J.S., Bottorff, J.L., Hayden, M.R., and Canadian Respond-HD Collaborative Research Group (2009). Perceptions of genetic discrimination among people at risk for Huntington's disease: a cross sectional survey. *BMJ* *338*, b2175.
- Bonaldo, P., and Sandri, M. (2013). Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. *Disease Models & Mechanisms* *6*, 25–39.
- Bonelli, C.M., Bonelli, R.M., Eichinger, M., Suppan, K., Reisecker, F., Leb, G., Obermayer-Pietsch, B.M. (2002). Bone density and bone turnover in Huntington's disease. *Osteoporosis int* *13*: S64-S64.
- Braubach, P., Orynbayev, M., Andronache, Z., Hering, T., Landwehrmeyer, G.B., Lindenberg, K.S., and Melzer, W. (2014). Altered Ca(2+) signaling in skeletal muscle fibers of the R6/2 mouse, a model of Huntington's disease. *J. Gen. Physiol.* *144*, 393–413.
- Buck, E., Zügel, M., Schumann, U., Merz, T., Gump, A.M., Witting, A., Steinacker, J.M., Landwehrmeyer, G.B., Weydt, P., Calzia, E., et al. (2017). High-resolution respirometry of fine-needle muscle biopsies in pre-manifest Huntington's disease expansion mutation carriers shows normal mitochondrial respiratory function. *PLoS ONE* *12*, e0175248
- Buckingham, M. (2006). Myogenic progenitor cells and skeletal myogenesis in vertebrates. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *16*, 525–532.
- van der Burg, J.M.M., Björkqvist, M., and Brundin, P. (2009). Beyond the brain: widespread pathology in Huntington's disease. *Lancet Neurol* *8*, 765–774.
- Busse M.E., Hughes G., Wiles C.M., Rosser A.E. (2008). Use of hand-held dynamometry in the evaluation of lower limb muscle strength in people with Huntington's disease. *J. Neurol.* *255*, 1534–1540 10.1007/s00415-008-0964-x.

C

- Calder, A.J., Keane, J., Young, A.W., Lawrence, A.D., Mason, S., and Barker, R.A. (2010). The relation between anger and different forms of disgust: implications for emotion recognition impairments in Huntington's disease. *Neuropsychologia* 48, 2719–2729.
- Carroll, J.B., Bates, G.P., Steffan, J., Saft, C., and Tabrizi, S.J. (2015). Treating the whole body in Huntington's disease. *Lancet Neurol* 14, 1135–1142.
- Cattaneo, E., Rigamonti, D., Goffredo, D., Zuccato, C., Squitieri, F., and Sipione, S. (2001). Loss of normal huntingtin function: new developments in Huntington's disease research. *Trends Neurosci.* 24, 182–188.
- Caviston, J.P., Zajac, A.L., Tokito, M., and Holzbaur, E.L.F. (2011). Huntingtin coordinates the dynein-mediated dynamic positioning of endosomes and lysosomes. *Mol. Biol. Cell* 22, 478–492.
- Cepeda, C., Wu, N., André, V.M., Cummings, D.M., and Levine, M.S. (2007). The corticostriatal pathway in Huntington's disease. *Prog. Neurobiol.* 81, 253–271.
- Chandler, W.K., Hirota, A., Jong, D.S., and Pape, P.C. (1993). Measurement of calcium release from the sarcoplasmic reticulum into the myoplasm of frog cut muscle fibers. *Jpn. J. Physiol.* 43 Suppl 1, S77-81.
- Charcot, J.M. Malade : Femme de 51 ans. Chorée chronique avec hérédité similaire (chorée de Huntington), 429-441. In : Charcot, J.M. (1889). *Leçons du mardi à la Salpêtrière: Policlinique 1887-88, 1888-89: notes de cours de Blin, Charcot et Colin. Aux bureaux du Progrès médical.*
- Chaturvedi, R.K., Adhiketty, P., Shukla, S., Hennessy, T., Calingasan, N., Yang, L., Starkov, A., Kiaei, M., Cannella, M., Sassone, J., et al. (2009). Impaired PGC-1alpha function in muscle in Huntington's disease. *Hum Mol Genet* 18, 3048–3065.
- Chaturvedi, R.K., Calingasan, N.Y., Yang, L., Hennessey, T., Johri, A., and Beal, M.F. (2010). Impairment of PGC-1alpha expression, neuropathology and hepatic steatosis in a transgenic mouse model of Huntington's disease following chronic energy deprivation. *Hum. Mol. Genet.* 19, 3190–3205.
- Chen, X., Wu, J., Lvovskaya, S., Herndon, E., Supnet, C., and Bezprozvanny, I. (2011). Dantrolene is neuroprotective in Huntington's disease transgenic mouse model. *Mol Neurodegener* 6, 81.
- Ciammola, A., Sassone, J., Alberti, L., Meola, G., Mancinelli, E., Russo, M.A., Squitieri, F., and Silani, V. (2006). Increased apoptosis, Huntingtin inclusions and altered differentiation in muscle cell cultures from Huntington's disease subjects. *Cell Death Differ* 13, 2068–2078.
- Ciammola, A., Sassone, J., Sciacco, M., Mencacci, N.E., Ripolone, M., Bizzi, C., Colciago, C., Moggio, M., Parati, G., Silani, V., et al. (2011). Low anaerobic threshold and increased skeletal muscle lactate production in subjects with Huntington's disease. *Mov. Disord.* 26, 130–137.

Clarke, N.F., Waddell, L.B., Cooper, S.T., Perry, M., Smith, R.L.L., Kornberg, A.J., Muntoni, F., Lillis, S., Straub, V., Bushby, K., et al. (2010). Recessive mutations in RYR11 are a common cause of congenital fiber type disproportion. *Hum. Mutat.* 31, E1544-1550.

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

Cooper, G. (2000). *The Cell : a molecular approach*. Sinauer Associates Inc. Second edition.

Crawford, H.E., Hobbs, N.Z., Keogh, R., Langbehn, D.R., Frost, C., Johnson, H., Landwehrmeyer, B., Reilmann, R., Craufurd, D., Stout, J.C., et al. (2013). Corpus callosal atrophy in premanifest and early Huntington's disease. *J Huntingtons Dis* 2, 517–526.

Cuervo, A.M., and Zhang, S. (2015). Selective autophagy and Huntingtin: learning from disease. *Cell Cycle* 14, 1617–1618.

D

Davenport, C.B., Muncey, E.B. (1916). Huntington's chorea in relation to heredity and eugenics. *American Journal of Psychiatry* 73(2), 195-222.

Deckel, A.W., Elder, R., and Fuhrer, G. (2002). Biphasic developmental changes in Ca²⁺/calmodulin-dependent proteins in R6/2 Huntington's disease mice. *Neuroreport* 13, 707–711

Dehay, B., Weber, C., Trottier, Y., and Bertolotti, A. (2007). Mapping of the epitope of monoclonal antibody 2B4 to the proline-rich region of human Huntingtin, a region critical for aggregation and toxicity. *Biotechnol J* 2, 559–564.

Deleplanque, P. (1895). *Études tératologiques. I. Des Difformités congénitales produites sur le fœtus par la contraction musculaire*. Editeur O. Doin, Paris, planche V.

Dieterich, K., Quijano-Roy, S., Monnier, N., Zhou, J., Fauré, J., Smirnow, D.A., Carlier, R., Laroche, C., Marcorelles, P., Mercier, S., et al. (2013). The neuronal endopeptidase ECEL1 is associated with a distinct form of recessive distal arthrogryposis. *Hum. Mol. Genet.* 22, 1483–1492.

DiFiglia, M., Sapp, E., Chase, K.O., Davies, S.W., Bates, G.P., Vonsattel, J.P., and Aronin, N. (1997). Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science* 277, 1990–1993.

Djoussé, L., Knowlton, B., Cupples, L.A., Marder, K., Shoulson, I., and Myers, R.H. (2002). Weight loss in early stage of Huntington's disease. *Neurology* 59, 1325–1330.

- Dufour, B.D., Smith, C.A., Clark, R.L., Walker, T.R., and McBride, J.L. (2014). Intrajugular vein delivery of AAV9-RNAi prevents neuropathological changes and weight loss in Huntington's disease mice. *Mol Ther* 22, 797–810.
- van Duijn, E., Kingma, E.M., and van der Mast, R.C. (2007). Psychopathology in verified Huntington's disease gene carriers. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 19, 441–448.
- van Duijn, E., Craufurd, D., Hubers, A.A.M., Giltay, E.J., Bonelli, R., Rickards, H., Anderson, K.E., van Walsem, M.R., van der Mast, R.C., Orth, M., et al. (2014). Neuropsychiatric symptoms in a European Huntington's disease cohort (REGISTRY). *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* 85, 1411–1418.
- Dumas, E.M., van den Bogaard, S.J.A., Middelkoop, H.A.M., and Roos, R.A.C. (2013). A review of cognition in Huntington's disease. *Front Biosci (Schol Ed)* 5, 1–18.
- Duyao, M., Ambrose, C., Myers, R., Novelletto, A., Persichetti, F., Frontali, M., Folstein, S., Ross, C., Franz, M., and Abbott, M. (1993). Trinucleotide repeat length instability and age of onset in Huntington's disease. *Nat. Genet.* 4, 387–392.
- Duyao, M.P., Auerbach, A.B., Ryan, A., Persichetti, F., Barnes, G.T., McNeil, S.M., Ge, P., Vonsattel, J.P., Gusella, J.F., and Joyner, A.L. (1995). Inactivation of the mouse Huntington's disease gene homolog Hdh. *Science* 269, 407–410.

E

- von der Ecken, J., Müller, M., Lehman, W., Manstein, D.J., Penczek, P.A., and Raunser, S. (2015). Structure of the F-actin-tropomyosin complex. *Nature* 519, 114–117.
- Eddy, C.M., and Rickards, H.E. (2015). Theory of mind can be impaired prior to motor onset in Huntington's disease. *Neuropsychology* 29, 792–798.
- Edmonds, C. (1966). Huntington's chorea, dysphagia and death. *Med. J. Aust.* 2, 273–274.
- Efremov, R.G., Leitner, A., Aebersold, R., and Raunser, S. (2015). Architecture and conformational switch mechanism of the ryanodine receptor. *Nature* 517, 39–43.
- Ehrnhoefer, D.E., Skotte, N.H., Ladha, S., Nguyen, Y.T.N., Qiu, X., Deng, Y., Huynh, K.T., Engemann, S., Nielsen, S.M., Becanovic, K., et al. (2014). p53 increases caspase-6 expression and activation in muscle tissue expressing mutant huntingtin. *Hum Mol Genet* 23, 717–729.
- El-Daher, M.-T., Hangen, E., Bruyère, J., Poizat, G., Al-Ramahi, I., Pardo, R., Bourg, N., Souquere, S., Mayet, C., Pierron, G., et al. (2015). Huntingtin proteolysis releases non-polyQ fragments that cause toxicity through dynamin 1 dysregulation. *EMBO J.* 34, 2255–2271.
- Elias, S., Thion, M.S., Yu, H., Sousa, C.M., Lasgi, C., Morin, X., and Humbert, S. (2014).

Huntingtin regulates mammary stem cell division and differentiation. *Stem Cell Reports* 2, 491–506.

Engel, A., Franzini-Armstrong, C. (1994). *Myology: basic and clinical* (2 vol.). McGraw-Hill Companies.

Evans, S.J.W., Douglas, I., Rawlins, M.D., Wexler, N.S., Tabrizi, S.J., and Smeeth, L. (2013). Prevalence of adult Huntington's disease in the UK based on diagnoses recorded in general practice records. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* 84, 1156–1160.

F

Farrer, L.A., and Meaney, F.J. (1985a). An anthropometric assessment of Huntington's disease patients and families. *Am. J. Phys. Anthropol.* 67, 185–194.

Farrer, L.A., and Yu, P.L. (1985b). Anthropometric discrimination among affected, at-risk, and not-at-risk individuals in families with Huntington disease. *Am. J. Med. Genet.* 21, 307–316.

Fekete, R., and Jankovic, J. (2014). Upper facial chorea in Huntington disease. *J Clin Mov Disord* 1, 7.

Ferns, M., Deiner, M., and Hall, Z. (1996). Agrin-induced acetylcholine receptor clustering in mammalian muscle requires tyrosine phosphorylation. *J. Cell Biol.* 132, 937–944.

Fourest-Lieuvin, A., Rendu, J., Osseni, A., Pernet-Gallay, K., Rossi, D., Oddoux, S., Brocard, J., Sorrentino, V., Marty, I., and Fauré, J. (2012). Role of triadin in the organization of reticulum membrane at the muscle triad. *J. Cell. Sci.* 125, 3443–3453.

Fosset, M., Jaimovich, E., Delpont, E., and Lazdunski, M. (1983). [3H]nitrendipine receptors in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 258, 6086–6092.

Franzini-Armstrong, C., Kenney, L.J., and Varriano-Marston, E. (1987). The structure of calsequestrin in triads of vertebrate skeletal muscle: a deep-etch study. *J. Cell Biol.* 105, 49–56.

Fu, Y., and Hong, T. (2016). BIN1 regulates dynamic t-tubule membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 1863, 1839–1847.

G

- Gaburjakova, M., Gaburjakova, J., Reiken, S., Huang, F., Marx, S.O., Rosemblyt, N., and Marks, A.R. (2001). FKBP12 binding modulates ryanodine receptor channel gating. *J. Biol. Chem.* *276*, 16931–16935.
- Gafni, J., and Ellerby, L.M. (2002). Calpain activation in Huntington's disease. *J. Neurosci.* *22*, 4842–4849.
- Gafni, J., Hermel, E., Young, J.E., Wellington, C.L., Hayden, M.R., and Ellerby, L.M. (2004). Inhibition of calpain cleavage of huntingtin reduces toxicity: accumulation of calpain/caspase fragments in the nucleus. *J. Biol. Chem.* *279*, 20211–20220.
- Garbino, A., van Oort, R.J., Dixit, S.S., Landstrom, A.P., Ackerman, M.J., and Wehrens, X.H.T. (2009). Molecular evolution of the junctophilin gene family. *Physiol. Genomics* *37*, 175–186.
- García, J., Tanabe, T., and Beam, K.G. (1994). Relationship of calcium transients to calcium currents and charge movements in myotubes expressing skeletal and cardiac dihydropyridine receptors. *J. Gen. Physiol.* *103*, 125–147.
- García, J., and Beam, K.G. (1994). Measurement of calcium transients and slow calcium current in myotubes. *J. Gen. Physiol.* *103*, 107–123.
- Gauthier, L.R., Charrin, B.C., Borrell-Pagès, M., Dompierre, J.P., Rangone, H., Cordelières, F.P., De Mey, J., MacDonald, M.E., Lessmann, V., Humbert, S., et al. (2004). Huntingtin controls neurotrophic support and survival of neurons by enhancing BDNF vesicular transport along microtubules. *Cell* *118*, 127–138.
- Gelman, A., Rawet-Slobodkin, M., and Elazar, Z. (2015). Huntingtin facilitates selective autophagy. *Nat. Cell Biol.* *17*, 214–215.
- des Georges, A., Clarke, O.B., Zalk, R., Yuan, Q., Condon, K.J., Grassucci, R.A., Hendrickson, W.A., Marks, A.R., and Frank, J. (2016). Structural Basis for Gating and Activation of RyR1. *Cell* *167*, 145–157.e17.
- Georgiou-Karistianis, N., Stout, J.C., Domínguez D, J.F., Carron, S.P., Ando, A., Churchyard, A., Chua, P., Bohanna, I., Dymowski, A.R., Poudel, G., et al. (2014). Functional magnetic resonance imaging of working memory in Huntington's disease: cross-sectional data from the IMAGE-HD study. *Hum Brain Mapp* *35*, 1847–1864.
- Gizatullina, Z.Z., Lindenberg, K.S., Harjes, P., Chen, Y., Kosinski, C.M., Landwehrmeyer, B.G., Ludolph, A.C., Striggow, F., Zierz, S., and Gellerich, F.N. (2006). Low stability of Huntington muscle mitochondria against Ca²⁺ in R6/2 mice. *Ann Neurol* *59*, 407–411
- Godin, J.D., Colombo, K., Molina-Calavita, M., Keryer, G., Zala, D., Charrin, B.C., Dietrich, P., Volvert, M.-L., Guillemot, F., Dragatsis, I., et al. (2010). Huntingtin is required for

mitotic spindle orientation and mammalian neurogenesis. *Neuron* 67, 392–406.

- Goh, A.M.Y., Chiu, E., Yastrubetskaya, O., Erwin, C., Williams, J.K., Juhl, A.R., Paulsen, J.S., and I-Respond-Hd Investigators Of The Huntington Study Group (2013). Perception, experience, and response to genetic discrimination in Huntington's disease: the Australian results of The International RESPOND-HD study. *Genet Test Mol Biomarkers* 17, 115–121.
- Goldberg, Y.P., Nicholson, D.W., Rasper, D.M., Kalchman, M.A., Koide, H.B., Graham, R.K., Bromm, M., Kazemi-Esfarjani, P., Thornberry, N.A., Vaillancourt, J.P., et al. (1996). Cleavage of huntingtin by apopain, a proapoptotic cysteine protease, is modulated by the polyglutamine tract. *Nat. Genet.* 13, 442–449.
- Golding, C.V.P., Danchaivijitr, C., Hodgson, T.L., Tabrizi, S.J., and Kennard, C. (2006). Identification of an oculomotor biomarker of preclinical Huntington disease. *Neurology* 67, 485–487.
- Gonzalez-Freire, M., Semba, R.D., Ubaida-Mohien, C., Fabbri, E., Scalzo, P., Højlund, K., Dufresne, C., Lyashkov, A., and Ferrucci, L. (2017). The Human Skeletal Muscle Proteome Project: a reappraisal of the current literature. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 8, 5–18.
- Gordon, A.M., Quinn, L., Reilmann, R., and Marder, K. (2000). Coordination of prehensile forces during precision grip in Huntington's disease. *Exp. Neurol.* 163, 136–148.
- Grandmougin, T., Bourdet, C., Gurruchaga, J.M. (1997). De la danse de Saint Guy à la chorée de Huntington: rappels sur l'émergence d'un concept médical. *MS. Médecine sciences* 13(6-7), 850-854.
- Grumati, P., Coletto, L., Sabatelli, P., Cescon, M., Angelin, A., Bertaggia, E., Blaauw, B., Urciuolo, A., Tiepolo, T., Merlini, L., et al. (2010). Autophagy is defective in collagen VI muscular dystrophies, and its reactivation rescues myofiber degeneration. *Nat. Med.* 16, 1313–1320.
- Grumati, P., Coletto, L., Sandri, M., and Bonaldo, P. (2011). Autophagy induction rescues muscular dystrophy. *Autophagy* 7, 426–428.
- Guerrero-Hernandez, A., Avila, G., and Rueda, A. (2014). Ryanodine receptors as leak channels. *Eur J Pharmacol* 739, 26–38.

H

- Haines, J.L., and Conneally, P.M. (1986). Causes of death in Huntington disease as reported on death certificates. *Genet. Epidemiol.* 3, 417–423.

- Hall, J.G. (2009). Pena-Shokeir phenotype (fetal akinesia deformation sequence) revisited. *Birth Defects Res. Part A Clin. Mol. Teratol.* 85, 677–694.
- Hall, J.G. (2014). Arthrogryposis (multiple congenital contractures): diagnostic approach to etiology, classification, genetics, and general principles. *Eur J Med Genet* 57, 464–472.
- Hall, J.G., and Kiefer, J. (2016). Arthrogryposis as a Syndrome: Gene Ontology Analysis. *Mol Syndromol* 7, 101–109.
- Hall, Z.W., and Sanes, J.R. (1993). Synaptic structure and development: the neuromuscular junction. *Cell* 72 *Suppl*, 99–121.
- Haremak, T., Deglincerti, A., and Brivanlou, A.H. (2015). Huntingtin is required for ciliogenesis and neurogenesis during early *Xenopus* development. *Dev. Biol.* 408, 305–315.
- Harper PS: The epidemiology of Huntington's disease; in Bates G, Harper PS, Jones L (eds): *Huntington's Disease*, ed 3 Oxford, Oxford University Press, 2002.
- Harper, P.S., Gevers, S., de Wert, G., Creighton, S., Bombard, Y., and Hayden, M.R. (2004). Genetic testing and Huntington's disease: issues of employment. *Lancet Neurol* 3, 249–252.
- Hart, E., Middelkoop, H., Jurgens, C.K., Witjes-Ané, M.-N.W., and Roos, R.A.C. (2011). Seven-year clinical follow-up of premanifest carriers of Huntington's disease. *PLoS Curr* 3, RRN1288.
- Hartelius, L., Jonsson, M., Rickeberg, A., and Laakso, K. (2010). Communication and Huntington's disease: qualitative interviews and focus groups with persons with Huntington's disease, family members, and carers. *Int J Lang Commun Disord* 45, 381–393.
- Hashimoto, T., and Yanagisawa, N. (1994). A comparison of the regularity of involuntary muscle contractions in vascular chorea with that in Huntington's chorea, hemiballism and parkinsonian tremor. *J Neurol Sci* 125, 87–94.
- Hayden, M.R., MacGregor, J.M., and Beighton, P.H. (1980). The prevalence of Huntington's chorea in South Africa. *S. Afr. Med. J.* 58, 193–196.
- Heathfield, K.W. (1973). Huntington's chorea: a centenary review. *Postgrad Med J* 49, 32–45.
- Heemskerk, A.-W., and Roos, R.A.C. (2012). Aspiration pneumonia and death in Huntington's disease. *PLoS Curr* 4, RRN1293.
- Her, L.-S., and Goldstein, L.S.B. (2008). Enhanced sensitivity of striatal neurons to axonal transport defects induced by mutant huntingtin. *J. Neurosci.* 28, 13662–13672.
- Her, L.-S., Lin, J.-Y., Fu, M.-H., Chang, Y.-F., Li, C.-L., Tang, T.-Y., Jhang, Y.-L., Chang, C.-Y., Shih, M.-C., Cheng, P.-H., et al. (2015). The Differential Profiling of Ubiquitin-Proteasome and Autophagy Systems in Different Tissues before the Onset of Huntington's Disease Models. *Brain Pathol* 25, 481–490.
- Hering, T., Braubach, P., Landwehrmeyer, G.B., Lindenberg, K.S., and Melzer, W. (2016). Fast-to-Slow Transition of Skeletal Muscle Contractile Function and Corresponding Changes in Myosin Heavy and Light Chain Formation in the R6/2 Mouse Model of

Huntington's Disease. PLoS ONE 11, e0166106.

- Hermel, E., Gafni, J., Propp, S.S., Leavitt, B.R., Wellington, C.L., Young, J.E., Hackam, A.S., Logvinova, A.V., Peel, A.L., Chen, S.F., et al. (2004). Specific caspase interactions and amplification are involved in selective neuronal vulnerability in Huntington's disease. *Cell Death Differ.* 11, 424–438.
- Hicks, S.L., Robert, M.P.A., Golding, C.V.P., Tabrizi, S.J., and Kennard, C. (2008). Oculomotor deficits indicate the progression of Huntington's disease. *Prog. Brain Res.* 171, 555–558.
- Hinckelmann, M.-V., Virlogeux, A., Niehage, C., Poujol, C., Choquet, D., Hoflack, B., Zala, D., and Saudou, F. (2016). Self-propelling vesicles define glycolysis as the minimal energy machinery for neuronal transport. *Nat Commun* 7, 13233.
- Hirata, Y., Brotto, M., Weisleder, N., Chu, Y., Lin, P., Zhao, X., Thornton, A., Komazaki, S., Takeshima, H., Ma, J., et al. (2006). Uncoupling store-operated Ca²⁺ entry and altered Ca²⁺ release from sarcoplasmic reticulum through silencing of junctophilin genes. *Biophys. J.* 90, 4418–4427.
- Hodgson, J.G., Agopyan, N., Gutekunst, C.A., Leavitt, B.R., LePiane, F., Singaraja, R., Smith, D.J., Bissada, N., McCutcheon, K., Nasir, J., et al. (1999). A YAC mouse model for Huntington's disease with full-length mutant huntingtin, cytoplasmic toxicity, and selective striatal neurodegeneration. *Neuron* 23, 181–192.
- Holmes, S.E., O'Hearn, E., Rosenblatt, A., Callahan, C., Hwang, H.S., Ingersoll-Ashworth, R.G., Fleisher, A., Stevanin, G., Brice, A., Potter, N.T., et al. (2001). A repeat expansion in the gene encoding junctophilin-3 is associated with Huntington disease-like 2. *Nat. Genet.* 29, 377–378.
- Homberg, V., and Lange, H.W. (1990). Central motor conduction to hand and leg muscles in Huntington's disease. *Mov Disord* 5, 214–218.
- Homberg, V., and Huttunen, J. (1994). Muscle tone in Huntington's disease. *J Neurol Sci* 121, 147–154.
- Hoppitt, T., Pall, H., Calvert, M., Gill, P., Yao, G., Ramsay, J., James, G., Conduit, J., and Sackley, C. (2011). A systematic review of the incidence and prevalence of long-term neurological conditions in the UK. *Neuroepidemiology* 36, 19–28.
- Hoth, K.F., Paulsen, J.S., Moser, D.J., Tranel, D., Clark, L.A., and Bechara, A. (2007). Patients with Huntington's disease have impaired awareness of cognitive, emotional, and functional abilities. *J Clin Exp Neuropsychol* 29, 365–376.
- Howell, W.H., Fulton J. (1949). Textbook of Physiology, edited by J. F. Fulton, Philadelphia, W. B. Saunders Company, 545.
- Hubers, A.A., van Duijn, E., Roos, R.A., Craufurd, D., Rickards, H., Landwehrmeyer, G.B., & REGISTRY investigators of the European Huntington's Disease Network. (2013). Suicidal ideation in a European Huntington's disease population. *Journal of affective disorders*, 151(1), 248-258.

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.

Huntington, G. (1872). *Medical and Surgical Reporter*. On Chorea, 320-321.

Huttunen, J., and Homberg, V. (1990). EMG responses in leg muscles to postural perturbations in Huntington's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 53, 55–62.

J

Jankovic, J., Kenney, C., Grafe, S., Goertelmeyer, R., and Comes, G. (2009). Relationship between various clinical outcome assessments in patients with blepharospasm. *Mov. Disord.* 24, 407–413.

Janssen, I., Heymsfield, S.B., Wang, Z.M., and Ross, R. (2000). Skeletal muscle mass and distribution in 468 men and women aged 18-88 yr. *J. Appl. Physiol.* 89, 81–88.

K

Kabbara, A.A., and Allen, D.G. (1999). Measurement of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ content in intact amphibian skeletal muscle fibres with 4-chloro-m-cresol. *Cell Calcium* 25, 227–235.

Kakizawa, S., Moriguchi, S., Ikeda, A., Iino, M., and Takeshima, H. (2008). Functional cross-talk between cell-surface and intracellular channels mediated by junctophilins essential for neuronal functions. *Cerebellum* 7, 385–391.

Kambouris, M., Bohlega, S., Al-Tahan, A., and Meyer, B.F. (2000). Localization of the gene for a novel autosomal recessive neurodegenerative Huntington-like disorder to 4p15.3. *Am. J. Hum. Genet.* 66, 445–452.

Kanzato, N., Saito, M., Horikiri, T., Komine, Y., Nakagawa, M., and Matsuzaki, T. (1998). Atypical rigid form of Huntington's disease: a case with peripheral amyotrophy and congenital defects of a lower limb. *Intern Med* 37, 978–981.

Khairallah, R.J., Shi, G., Sbrana, F., Prosser, B.L., Borroto, C., Mazaitis, M.J., Hoffman, E.P., Mahurkar, A., Sachs, F., Sun, Y., et al. (2012). Microtubules underlie dysfunction in duchenne muscular dystrophy. *Sci Signal* 5, ra56.

Kim, Y.J., Yi, Y., Sapp, E., Wang, Y., Cuiffo, B., Kegel, K.B., Qin, Z.H., Aronin, N., and DiFiglia, M. (2001). Caspase 3-cleaved N-terminal fragments of wild-type and mutant huntingtin are present in normal and Huntington's disease brains, associate with mem-

branes, and undergo calpain-dependent proteolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 12784–12789.

Klein, A., Lillis, S., Munteanu, I., Scoto, M., Zhou, H., Quinlivan, R., Straub, V., Manzur, A.Y., Roper, H., Jeannet, P.-Y., et al. (2012). Clinical and genetic findings in a large cohort of patients with ryanodine receptor 1 gene-associated myopathies. *Hum. Mutat.* 33, 981–988.

Kobal, J., Melik, Z., Cankar, K., Bajrovic, F.F., Meglic, B., Peterlin, B., and Zaletel, M. (2010). Autonomic dysfunction in presymptomatic and early symptomatic Huntington's disease. *Acta Neurol. Scand.* 121, 392–399.

Kosinski, C.M., Schlangen, C., Gellerich, F.N., Gizatullina, Z., Deschauer, M., Schiefer, J., Young, A.B., Landwehrmeyer, G.B., Toyka, K.V., Sellhaus, B., et al. (2007). Myopathy as a first symptom of Huntington's disease in a Marathon runner. *Mov Disord* 22, 1637–1640.

Krause, A., Mitchell, C., Essop, F., Tager, S., Temlett, J., Stevanin, G., Ross, C., Rudnicki, D., and Margolis, R. (2015). Junctophilin 3 (JPH3) expansion mutations causing Huntington disease like 2 (HDL2) are common in South African patients with African ancestry and a Huntington disease phenotype. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 168, 573–585.

L

Labadorf, A.T., and Myers, R.H. (2015). Evidence of Extensive Alternative Splicing in Post Mortem Human Brain HTT Transcription by mRNA Sequencing. *PLoS ONE* 10, e0141298.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.

Lafargue, G., and Sirigu, A. (2002). Sensation of effort is altered in Huntington's disease. *Neuropsychologia* 40, 1654–1661.

Lalić, N.M., Marić, J., Svetel, M., Jotić, A., Stefanova, E., Lalić, K., Dragasević, N., Milicić, T., Lukić, L., and Kostić, V.S. (2008). Glucose homeostasis in Huntington disease: abnormalities in insulin sensitivity and early-phase insulin secretion. *Arch. Neurol.* 65, 476–480.

Lamb, G.D., and Stephenson, D.G. (1996). Effects of FK506 and rapamycin on excitation-contraction coupling in skeletal muscle fibres of the rat. *J. Physiol. (Lond.)* 494 (Pt 2), 569–576.

Lamb, G.D. (2000). Excitation-contraction coupling in skeletal muscle: comparisons with cardiac muscle. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 27, 216–224.

- Landstrom, A.P., Beavers, D.L., and Wehrens, X.H.T. (2014). The junctophilin family of proteins: from bench to bedside. *Trends Mol Med* 20, 353–362.
- Lanner, J.T., Georgiou, D.K., Joshi, A.D., and Hamilton, S.L. (2010). Ryanodine Receptors: Structure, Expression, Molecular Details, and Function in Calcium Release. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2, a003996–a003996.
- Lanska, D.J. (2000). George Huntington (1850-1916) and hereditary chorea. *J Hist Neurosci* 9, 76–89.
- Lanska, D.J., Lanska, M.J., Lavine, L., and Schoenberg, B.S. (1988a). Conditions associated with Huntington’s disease at death. A case-control study. *Arch. Neurol.* 45, 878–880.
- Lanska, D.J., Lavine, L., Lanska, M.J., and Schoenberg, B.S. (1988b). Huntington’s disease mortality in the United States. *Neurology* 38, 769–772.
- Laqu rri re, A., Maluenda, J., Camus, A., Fontenas, L., Dieterich, K., Nolent, F., Zhou, J., Monnier, N., Latour, P., Gentil, D., et al. (2014). Mutations in CNTNAP1 and ADCY6 are responsible for severe arthrogryposis multiplex congenita with axoglial defects. *Hum. Mol. Genet.* 23, 2279–2289.
- Larsen, I.U., Vinther-Jensen, T., Nielsen, J.E., Gade, A., and Vogel, A. (2016). Social Cognition, Executive Functions and Self-Report of Psychological Distress in Huntington’s Disease. *PLoS Curr* 8.
- Lecker, S.H., Goldberg, A.L., and Mitch, W.E. (2006). Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *J. Am. Soc. Nephrol.* 17, 1807–1819.
- Lee, A.L., Ung, H.M., Sands, L.P., and Kikis, E.A. (2017). A new *Caenorhabditis elegans* model of human huntingtin 513 aggregation and toxicity in body wall muscles. *PLoS ONE* 12, e0173644.
- Lekoubou, A., Echouffo-Tcheugui, J.B., and Kengne, A.P. (2014). Epidemiology of neurodegenerative diseases in sub-Saharan Africa: a systematic review. *BMC Public Health* 14, 653.
- Linsley, J.W., Hsu, I.-U., Wang, W., and Kuwada, J.Y. (2017). Transport of the alpha subunit of the L-type calcium channel through the sarcoplasmic reticulum occurs prior to localization to triads and requires the beta subunit but not Stac3 in skeletal muscles. *Traffic*.
- Lodi, R., Schapira, A.H., Manners, D., Styles, P., Wood, N.W., Taylor, D.J., and Warner, T.T. (2000). Abnormal in vivo skeletal muscle energy metabolism in Huntington’s disease and dentatorubropallidolusian atrophy. *Ann Neurol* 48, 72–76.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Luthi-Carter, R., Hanson, S.A., Strand, A.D., Bergstrom, D.A., Chun, W., Peters, N.L., Woods, A.M., Chan, E.Y., Kooperberg, C., Krainc, D., et al. (2002). Dysregulation of

gene expression in the R6/2 model of polyglutamine disease: parallel changes in muscle and brain. *Hum Mol Genet* 11, 1911–1926.

M

- Mangiarini, L., Sathasivam, K., Seller, M., Cozens, B., Harper, A., Hetherington, C., Lawton, M., Trotter, Y., Leach, H., Davies, S.W., et al. (1996). Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell* 87, 493–506.
- Margolis, R.L., O’Hearn, E., Rosenblatt, A., Willour, V., Holmes, S.E., Franz, M.L., Callahan, C., Hwang, H.S., Troncoso, J.C., and Ross, C.A. (2001). A disorder similar to Huntington’s disease is associated with a novel CAG repeat expansion. *Ann. Neurol.* 50, 373–380.
- Margolis, R.L. (1993), [2012]. Huntington Disease-Like 2. In *GeneReviews*(®), R.A. Pagon, M.P. Adam, H.H. Ardinger, S.E. Wallace, A. Amemiya, L.J. Bean, T.D. Bird, N. Ledbetter, H.C. Mefford, R.J. Smith, et al., eds. (Seattle (WA): University of Washington, Seattle), p.
- Marques Sousa, C., and Humbert, S. (2013). Huntingtin: here, there, everywhere! *J Huntingtons Dis* 2, 395–403.
- Marik, P.E., and Kaplan, D. (2003). Aspiration pneumonia and dysphagia in the elderly. *Chest* 124, 328–336.
- Markianos, M., Panas, M., Kalfakis, N., and Vassilopoulos, D. (2005). Plasma testosterone in male patients with Huntington’s disease: relations to severity of illness and dementia. *Ann. Neurol.* 57, 520–525.
- Martin, A. (1923). History of dancing mania. *Am J Clin Med* 30: 265-71.
- Martin, B., Golden, E., Keselman, A., Stone, M., Mattson, M.P., Egan, J.M., and Maudsley, S. (2008). Therapeutic perspectives for the treatment of Huntington’s disease: treating the whole body. *Histol. Histopathol.* 23, 237–250.
- Martin, D.D.O., Heit, R.J., Yap, M.C., Davidson, M.W., Hayden, M.R., and Berthiaume, L.G. (2014). Identification of a post-translationally myristoylated autophagy-inducing domain released by caspase cleavage of huntingtin. *Hum. Mol. Genet.* 23, 3166–3179.
- Marty, I., Robert, M., Villaz, M., De Jongh, K., Lai, Y., Catterall, W.A., and Ronjat, M. (1994). Biochemical evidence for a complex involving dihydropyridine receptor and ryanodine receptor in triad junctions of skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 2270–2274.
- Marty, I. (2015). Triadin regulation of the ryanodine receptor complex. *J. Physiol. (Lond.)* 593, 3261–3266.

- Marty, I., and Fauré, J. (2016). Excitation-Contraction Coupling Alterations in Myopathies. *J Neuromuscul Dis* 3, 443–453.
- Mehanna, R., and Jankovic, J. (2010). Respiratory problems in neurologic movement disorders. *Parkinsonism Relat. Disord.* 16, 628–638.
- Menalled, L.B., and Chesselet, M.-F. (2002). Mouse models of Huntington's disease. *Trends Pharmacol. Sci.* 23, 32–39.
- 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.
- Menalled, L., and Brunner, D. (2014). Animal models of Huntington's disease for translation to the clinic: best practices. *Mov. Disord.* 29, 1375–1390.
- McGuire, J.R., Rong, J., Li, S.-H., and Li, X.-J. (2006). Interaction of Huntingtin-associated protein-1 with kinesin light chain: implications in intracellular trafficking in neurons. *J. Biol. Chem.* 281, 3552–3559.
- Mielcarek, M., Inuabasi, L., Bondulich, M K., Muller, T., Osborne, G.F., Franklin, S.A., Protti, A. (2014a). Dysfunction of the CNS-heart axis in mouse models of Huntington's disease. *PLoS Genet*, 10(8), e1004550.
- Mielcarek, M., Bondulich, M.K., Inuabasi, L., Franklin, S.A., Muller, T., and Bates, G.P. (2014b). The Huntington's disease-related cardiomyopathy prevents a hypertrophic response in the R6/2 mouse model. *PLoS One* 9, e108961
- Mielcarek, M. (2015a). Huntington's disease is a multi-system disorder. *Rare Dis* 3, e1058464.
- Mielcarek, M., Toczek, M., Smeets, C.J.L.M., Franklin, S.A., Bondulich, M.K., Jolinon, N., Muller, T., Ahmed, M., Dick, J.R.T., Piotrowska, I., et al. (2015b). HDAC4-myogenin axis as an important marker of HD-related skeletal muscle atrophy. *PLoS Genet.* 11, e1005021.
- Mielcarek, M., Smolenski, R.T., and Isalan, M. (2017). Transcriptional Signature of an Altered Purine Metabolism in the Skeletal Muscle of a Huntington's Disease Mouse Model. *Front Physiol* 8, 127
- Mihm, M.J., Amann, D.M., Schanbacher, B.L., Altschuld, R.A., Bauer, J.A., and Hoyt, K.R. (2007). Cardiac dysfunction in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. *Neurobiol. Dis.* 25, 297–308.
- Miranda, Â., Lavrador, R., Júlio, F., Januário, C., Castelo-Branco, M., and Caetano, G. (2016). Classification of Huntington's disease stage with support vector machines: A study on oculomotor performance. *Behav Res Methods* 48, 1667–1677.
- Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A.M., and Klionsky, D.J. (2008). Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 451, 1069–1075.

- Mochel, F., Charles, P., Seguin, F., Barritault, J., Coussieu, C., Perin, L., Le Bouc, Y., Gervais, C., Carcelain, G., Vassault, A., et al. (2007). Early energy deficit in Huntington disease: identification of a plasma biomarker traceable during disease progression. *PLoS ONE* 2, e647.
- Moffitt, H., McPhail, G.D., Woodman, B., Hobbs, C., and Bates, G.P. (2009). Formation of polyglutamine inclusions in a wide range of non-CNS tissues in the HdhQ150 knock-in mouse model of Huntington's disease. *PLoS One* 4, e8025
- Molero, A.E., Arteaga-Bracho, E.E., Chen, C.H., Gulinello, M., Winchester, M.L., Pichamoorthy, N., Gokhan, S., Khodakhah, K., and Mehler, M.F. (2016). Selective expression of mutant huntingtin during development recapitulates characteristic features of Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, 5736–5741.
- Monnier, N., Procaccio, V., Stieglitz, P., and Lunardi, J. (1997). Malignant-hyperthermia susceptibility is associated with a mutation of the alpha 1-subunit of the human dihydropyridine-sensitive L-type voltage-dependent calcium-channel receptor in skeletal muscle. *Am. J. Hum. Genet.* 60, 1316–1325.
- Monnier, N., and Lunardi, J. (2000). [Biology of malignant hyperthermia: a disease of the calcium channels of the skeletal muscle]. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* 58, 147–156.
- Monnier, N., Romero, N.B., Lerala, J., Landrieu, P., Nivoche, Y., Fardeau, M., and Lunardi, J. (2001). Familial and sporadic forms of central core disease are associated with mutations in the C-terminal domain of the skeletal muscle ryanodine receptor. *Hum. Mol. Genet.* 10, 2581–2592.
- Monnier, N., Ferreira, A., Marty, I., Labarre-Vila, A., Mezin, P., and Lunardi, J. (2003). A homozygous splicing mutation causing a depletion of skeletal muscle RYR11 is associated with multi-minicore disease congenital myopathy with ophthalmoplegia. *Hum. Mol. Genet.* 12, 1171–1178.
- Monnier, N., Marty, I., Faure, J., Castiglioni, C., Desnuelle, C., Sacconi, S., Estournet, B., Ferreira, A., Romero, N., Laquerriere, A., et al. (2008). Null mutations causing depletion of the type 1 ryanodine receptor (RYR11) are commonly associated with recessive structural congenital myopathies with cores. *Hum. Mutat.* 29, 670–678.
- Montoya, A., Pelletier, M., Menear, M., Duplessis, E., Richer, F., and Lepage, M. (2006a). Episodic memory impairment in Huntington's disease: a meta-analysis. *Neuropsychologia* 44, 1984–1994.
- Montoya, A., Price, B.H., Menear, M., and Lepage, M. (2006b). Brain imaging and cognitive dysfunctions in Huntington's disease. *J Psychiatry Neurosci* 31, 21–29.
- Moore, R.C., Xiang, F., Monaghan, J., Han, D., Zhang, Z., Edström, L., Anvret, M., and Prusiner, S.B. (2001). Huntington disease phenocopy is a familial prion disease. *Am. J. Hum. Genet.* 69, 1385–1388.

Moresi, V., Williams, A.H., Meadows, E., Flynn, J.M., Potthoff, M.J., McAnally, J., Shelton, J.M., Backs, J., Klein, W.H., Richardson, J.A., et al. (2010). Myogenin and class II HDACs control neurogenic muscle atrophy by inducing E3 ubiquitin ligases. *Cell* *143*, 35–45.

Morgan, J.E., and Partridge, T.A. (2003). Muscle satellite cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *35*, 1151–1156.

Mort, M., Carlisle, F.A., Waite, A.J., Elliston, L., Allen, N.D., Jones, L., and Hughes, A.C. (2015). Huntingtin Exists as Multiple Splice Forms in Human Brain. *J Huntingtons Dis* *4*, 161–171.

Myers, R.H. (2004). Huntington’s disease genetics. *NeuroRx* *1*, 255–262.

N

Nasir, J., Floresco, S.B., O’Kusky, J.R., Diewert, V.M., Richman, J.M., Zeisler, J., Borowski, A., Marth, J.D., Phillips, A.G., and Hayden, M.R. (1995). Targeted disruption of the Huntington’s disease gene results in embryonic lethality and behavioral and morphological changes in heterozygotes. *Cell* *81*, 811–823.

Nehl, C., Paulsen, J.S., and Huntington Study Group (2004). Cognitive and psychiatric aspects of Huntington disease contribute to functional capacity. *J. Nerv. Ment. Dis.* *192*, 72–74.

Nicolini, F., and Politis, M. (2014). Neuroimaging in Huntington’s disease. *World J Radiol* *6*, 301–312.

Nishi, M., Hashimoto, K., Kuriyama, K., Komazaki, S., Kano, M., Shibata, S., and Takeshima, H. (2002). Motor discoordination in mutant mice lacking junctophilin type 3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *292*, 318–324.

Nóbrega, A.C., Rodrigues, B., and Melo, A. (2008). Is silent aspiration a risk factor for respiratory infection in Parkinson’s disease patients? *Parkinsonism Relat. Disord.* *14*, 646–648.

O

Ochaba, J., Lukacsovich, T., Csikos, G., Zheng, S., Margulis, J., Salazar, L., Mao, K., Lau, A.L., Yeung, S.Y., Humbert, S., et al. (2014). Potential function for the Huntingtin protein as a scaffold for selective autophagy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *111*, 16889–16894.

- Oddoux, S., Brocard, J., Schweitzer, A., Szentesi, P., Giannesini, B., Brocard, J., Fauré, J., Pernet-Gallay, K., Bendahan, D., Lunardi, J., et al. (2009). Triadin deletion induces impaired skeletal muscle function. *J. Biol. Chem.* *284*, 34918–34929.
- Oddoux, S., Zaal, K.J., Tate, V., Kenea, A., Nandkeolyar, S.A., Reid, E., Liu, W., and Ralston, E. (2013). Microtubules that form the stationary lattice of muscle fibers are dynamic and nucleated at Golgi elements. *J. Cell Biol.* *203*, 205–213.
- Okun, M.S. (2003). Huntington's disease: what we learned from the original essay. *Neurologist* *9*, 175–179.
- Ørbeck, A.L. (1959). An early description of Huntington's chorea. *Medical history*, *3*(02), 165-168.
- Orth, M., Cooper, J.M., Bates, G.P., and Schapira, A.H.V. (2003). Inclusion formation in Huntington's disease R6/2 mouse muscle cultures. *J Neurochem* *87*, 1–6.
- Osseni, A., Sébastien, M., Sarrault, O., Baudet, M., Couté, Y., Fauré, J., Fourest-Lieuvin, A., and Marty, I. (2016). Triadin and CLIMP-63 form a link between triads and microtubules in muscle cells. *J. Cell. Sci.* *129*, 3744–3755.
- Oster, E., Dorsey, E.R., Bausch, J., Shinaman, A., Kayson, E., Oakes, D., Shoulson, I., Quaid, K., and Huntington Study Group PHAROS Investigators (2008). Fear of health insurance loss among individuals at risk for Huntington disease. *Am. J. Med. Genet. A* *146A*, 2070–2077.
- Otti, D.V., Hödl, A.K., Bonelli, C.M., Strele, A., Obermeyer-Pietsch, B., Kapfhammer, H.P., Bonelli, R.M. (2007). Osteoporosis in Huntington's disease. *Proceedings of the 2nd International Congress of Biological Psychiatry*.

P

- Paolini, C., Quarta, M., D'Onofrio, L., Reggiani, C., and Protasi, F. (2011). Differential effect of calsequestrin ablation on structure and function of fast and slow skeletal muscle fibers. *J. Biomed. Biotechnol.* *2011*, 634075.
- Pardo, R., Molina-Calavita, M., Poizat, G., Keryer, G., Humbert, S., and Saudou, F. (2010). pARIS-HTT: an optimised expression platform to study huntingtin reveals functional domains required for vesicular trafficking. *Mol Brain* *3*, 17.
- Patton, K., Thibodeau. (2010). *Anthony's textbook of anatomy & physiology*. Anthony's textbook of anatomy & physiology. Elsevier 1224pp.

- Paulsen, J.S., Nehl, C., Hoth, K.F., Kanz, J.E., Benjamin, M., Conybeare, R., McDowell, B., and Turner, B. (2005). Depression and stages of Huntington's disease. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 17, 496–502.
- Paulsen, J.S., Langbehn, D.R., Stout, J.C., Aylward, E., Ross, C.A., Nance, M., et al., Duff, K. (2008). Detection of Huntington's disease decades before diagnosis: the Predict-HD study. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 79(8), 874-880.
- Paulsen, J.S. (2009). Functional imaging in Huntington's disease. *Exp. Neurol.* 216, 272–277.
- Paulsen, J.S. (2011). Cognitive impairment in Huntington disease: diagnosis and treatment. *Curr Neurol Neurosci Rep* 11, 474–483.
- Paulsen, J.S., Long, J.D., Johnson, H.J., Aylward, E.H., Ross, C.A., Williams, J.K., Nance, M.A., Erwin, C.J., Westervelt, H.J., Harrington, D.L., et al. (2014). Clinical and Biomarker Changes in Premanifest Huntington Disease Show Trial Feasibility: A Decade of the PREDICT-HD Study. *Front Aging Neurosci* 6, 78.
- Penziner, E., Williams, J.K., Erwin, C., Bombard, Y., Wallis, A., Beglinger, L.J., Hayden, M.R., and Paulsen, J.S. (2008). Perceptions of discrimination among persons who have undergone predictive testing for Huntington's disease. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 147, 320–325.
- Pichot, A. (1999). Histoire de la notion de gène. Flammarion : Paris. 344p.
- Poreau, B. (2014). Mécanisme physiopathologique et spectre clinique liés aux mutations d'ECEL1, un gène majeur d'arthrogrypose. Thèse d'exercice de médecine : CHU Grenoble. 86p. [HTTps://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01254570/document](https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01254570/document)
- Poreau, B. (2016a). De Pierre-Joseph Van Beneden à la médecine et l'écologie contemporaines: l'histoire du commensalisme. Vrin : Paris. 206p.
- Poreau, B. (2016b). Progressive and self-limiting neurodegenerative disorders in Africa: a new prominent field of research led by South Africa but without strong health policy. *Pan African Medical Journal*, 23(1).
- Preisig, D.F., Kulic, L., Kruger, M., Wirth, F., McAfoose, J., Spani, C., Gantenbein, P., Derungs, R., Nitsch, R.M., and Welt, T. (2016). High-speed video gait analysis reveals early and characteristic locomotor phenotypes in mouse models of neurodegenerative movement disorders. *Behav Brain Res* 311, 340–353.
- Pringsheim, T., Wiltshire, K., Day, L., Dykeman, J., Steeves, T., and Jette, N. (2012). The incidence and prevalence of Huntington's disease: a systematic review and meta-analysis. *Mov. Disord.* 27, 1083–1091.
- Protasi, F., Paolini, C., and Dainese, M. (2009). Calsequestrin-1: a new candidate gene for malignant hyperthermia and exertional/environmental heat stroke. *J. Physiol. (Lond.)* 587, 3095–3100.

Q

Qi, Y., Ogunbunmi, E.M., Freund, E.A., Timerman, A.P., and Fleischer, S. (1998). FK-binding protein is associated with the ryanodine receptor of skeletal muscle in vertebrate animals. *J. Biol. Chem.* 273, 34813–34819.

Quigley, J. (2017). Juvenile Huntington's Disease: Diagnostic and Treatment Considerations for the Psychiatrist. *Curr Psychiatry Rep* 19, 9.

R

Ramaswamy, S., McBride, J.L., and Kordower, J.H. (2007). Animal models of Huntington's disease. *ILAR J* 48, 356–373.

Rangone, H., Humbert, S., and Saudou, F. (2004). Huntington's disease: how does huntingtin, an anti-apoptotic protein, become toxic? *Pathol. Biol.* 52, 338–342.

Rasmussen, A., Macias, R., Yescas, P., Ochoa, A., Davila, G., and Alonso, E. (2000). Huntington disease in children: genotype-phenotype correlation. *Neuropediatrics* 31, 190–194.

Rawlins, M.D., Wexler, N.S., Wexler, A.R., Tabrizi, S.J., Douglas, I., Evans, S.J.W., and Smeeth, L. (2016). The Prevalence of Huntington's Disease. *Neuroepidemiology* 46, 144–153.

Reyes, A., Cruickshank, T., Ziman, M., and Nosaka, K. (2014). Pulmonary function in patients with Huntington's disease. *BMC Pulm Med* 14, 89.

Ribaï, P., Nguyen, K., Hahn-Barma, V., Gourfinkel-An, I., Vidailhet, M., Legout, A., Dodé, C., Brice, A., and Dürr, A. (2007). Psychiatric and cognitive difficulties as indicators of juvenile huntington disease onset in 29 patients. *Arch. Neurol.* 64, 813–819.

Ribchester, R.R., Thomson, D., Wood, N.I., Hinks, T., Gillingwater, T.H., Wishart, T.M., Court, F.A., and Morton, A.J. (2004). Progressive abnormalities in skeletal muscle and neuromuscular junctions of transgenic mice expressing the Huntington's disease mutation. *Eur J Neurosci* 20, 3092–3114.

Robbins, A.O., Ho, A.K., and Barker, R.A. (2006). Weight changes in Huntington's disease. *Eur. J. Neurol.* 13, e7.

- Romero, N.B., Herasse, M., Monnier, N., Leroy, J.P., Fischer, D., Ferreira, A., Viollet, L., Eymard, B., Laforêt, P., Monges, S., et al. (2005). Clinical and histopathological aspects of central core disease associated and non-associated with RYR11 locus. *Acta Myol* 24, 70–73.
- Roos, R.A.C. (2010). Huntington's disease: a clinical review. *Orphanet J Rare Dis* 5, 40.
- Rosenblatt, A. (2007a). Neuropsychiatry of Huntington's disease. *Dialogues Clin Neurosci* 9, 191–197.
- Rosenblatt, A. (2007b). Understanding the psychiatric prodrome of Huntington disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* 78, 913.
- Rossi, D., Vezzani, B., Galli, L., Paolini, C., Toniolo, L., Pierantozzi, E., Spinozzi, S., Barone, V., Pegoraro, E., Bello, L., et al. (2014). A mutation in the CASQ1 gene causes a vacuolar myopathy with accumulation of sarcoplasmic reticulum protein aggregates. *Hum. Mutat.* 35, 1163–1170.
- Rossi, D., Barone, V., Giacomello, E., Cusimano, V., and Sorrentino, V. (2008). The sarcoplasmic reticulum: an organized patchwork of specialized domains. *Traffic* 9, 1044–1049.
- Roux-Buisson, N., Cacheux, M., Fourest-Lieuvin, A., Fauconnier, J., Brocard, J., Denjoy, I., Durand, P., Guicheney, P., Kyndt, F., Leenhardt, A., et al. (2012). Absence of triadin, a protein of the calcium release complex, is responsible for cardiac arrhythmia with sudden death in human. *Hum. Mol. Genet.* 21, 2759–2767.
- Rowe, K.C., Paulsen, J.S., Langbehn, D.R., Duff, K., Beglinger, L.J., Wang, C., O'Rourke, J.J.F., Stout, J.C., and Moser, D.J. (2010). Self-paced timing detects and tracks change in prodromal Huntington disease. *Neuropsychology* 24, 435–442.
- Rüb, U., Vonsattel, J.P.V., Heinsen, H., and Korf, H.-W. (2015). The Neuropathology of Huntington's disease: classical findings, recent developments and correlation to functional neuroanatomy. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 217, 1–146.
- Rüb, U., Seidel, K., Heinsen, H., Vonsattel, J.P., den Dunnen, W.F., and Korf, H.W. (2016). Huntington's disease (HD): the neuropathology of a multisystem neurodegenerative disorder of the human brain. *Brain Pathol.* 26, 726–740.
- Rui, Y.-N., Xu, Z., Patel, B., Chen, Z., Chen, D., Tito, A., David, G., Sun, Y., Stimming, E.F., Bellen, H.J., et al. (2015a). Huntingtin functions as a scaffold for selective macroautophagy. *Nat. Cell Biol.* 17, 262–275.
- Rui, Y.-N., Xu, Z., Patel, B., Cuervo, A.M., and Zhang, S. (2015b). HTT/Huntingtin in selective autophagy and Huntington disease: A foe or a friend within? *Autophagy* 11, 858–860.
- Ruzo, A., Ismailoglu, I., Popowski, M., Haremaki, T., Croft, G.F., Deglincerti, A., and Brivanlou, A.H. (2015). Discovery of novel isoforms of huntingtin reveals a new hominid-specific exon. *PLoS ONE* 10, e0127687.

S

- Saft, C., Zange, J., Andrich, J., Müller, K., Lindenberg, K., Landwehrmeyer, B., Vorgerd, M., Kraus, P.H., Przuntek, H., and Schöls, L. (2005). Mitochondrial impairment in patients and asymptomatic mutation carriers of Huntington's disease. *Mov. Disord.* *20*, 674–679.
- Sanberg, P.R., Fibiger, H.C., and Mark, R.F. (1981). Body weight and dietary factors in Huntington's disease patients compared with matched controls. *Med. J. Aust.* *1*, 407–409.
- Samsó, M. (2015). 3D Structure of the Dihydropyridine Receptor of Skeletal Muscle. *Eur J Transl Myol* *25*, 4840.
- Sassone, J., Colciago, C., Cislighi, G., Silani, V., and Ciammola, A. (2009). Huntington's disease: the current state of research with peripheral tissues. *Exp. Neurol.* *219*, 385–397.
- Sathasivam, K., Hobbs, C., Turmaine, M., Mangiarini, L., Mahal, A., Bertaux, F., Wanker, E.E., Doherty, P., Davies, S.W., and Bates, G.P. (1999a). Formation of polyglutamine inclusions in non-CNS tissue. *Hum Mol Genet* *8*, 813–822.
- Saudou, F., and Humbert, S. (2016). The Biology of Huntingtin. *Neuron* *89*, 910–926.
- Scahill, R.I., Hobbs, N.Z., Say, M.J., Bechtel, N., Henley, S.M.D., Hyare, H., Langbehn, D.R., Jones, R., Leavitt, B.R., Roos, R.A.C., et al. (2013). Clinical impairment in pre-manifest and early Huntington's disease is associated with regionally specific atrophy. *Hum Brain Mapp* *34*, 519–529.
- Schapira, A.H. (1999). Mitochondrial involvement in Parkinson's disease, Huntington's disease, hereditary spastic paraplegia and Friedreich's ataxia. *Biochim Biophys Acta* *1410*, 159–170.
- Schiaffino, S., and Reggiani, C. (2011). Fiber Types in Mammalian Skeletal Muscles. *Physiological Reviews* *91*, 1447–1531.
- Schilling, G., Becher, M.W., Sharp, A.H., Jinnah, H.A., Duan, K., Kotzok, J.A., Slunt, H.H., Ratovitski, T., Cooper, J.K., Jenkins, N.A., et al. (1999). Intranuclear inclusions and neuritic aggregates in transgenic mice expressing a mutant N-terminal fragment of huntingtin. *Hum. Mol. Genet.* *8*, 397–407.
- Schroeder, A.M., Wang, H.B., Park, S., Jordan, M.C., Gao, F., Coppola, G., Fishbein, M.C., Roos, K.P., Ghiani, C.A., and Colwell, C.S. (2016). Cardiac Dysfunction in the BACHD Mouse Model of Huntington's Disease. *PLoS ONE* *11*, e0147269.

- Seixas, A.I., Holmes, S.E., Takeshima, H., Pavlovich, A., Sachs, N., Pruitt, J.L., Silveira, I., Ross, C.A., Margolis, R.L., and Rudnicki, D.D. (2012). Loss of junctophilin-3 contributes to Huntington disease-like 2 pathogenesis. *Ann. Neurol.* *71*, 245–257.
- Sharp, A.H., Loev, S.J., Schilling, G., Li, S.H., Li, X.J., Bao, J., Wagster, M.V., Kotzok, J.A., Steiner, J.P., and Lo, A. (1995). Widespread expression of Huntington's disease gene (IT15) protein product. *Neuron* *14*, 1065–1074.
- She, P., Zhang, Z., Marchionini, D., Diaz, W.C., Jetton, T.J., Kimball, S.R., Vary, T.C., Lang, C.H., and Lynch, C.J. (2011). Molecular characterization of skeletal muscle atrophy in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. *Am J Physiol Endocrinol Metab* *301*, E49-61.
- Shen, X., Franzini-Armstrong, C., Lopez, J.R., Jones, L.R., Kobayashi, Y.M., Wang, Y., Kerriker, W.G.L., Caswell, A.H., Potter, J.D., Miller, T., et al. (2007). Triadins modulate intracellular Ca(2+) homeostasis but are not essential for excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* *282*, 37864–37874.
- Silverthorn, D. U. (2007). *Physiologie humaine: une approche intégrée*. Pearson Education France.
- Solomon, A.C., Stout, J.C., Johnson, S.A., Langbehn, D.R., Aylward, E.H., Brandt, J., Ross, C.A., Beglinger, L., Hayden, M.R., Kieburtz, K., et al. (2007). Verbal episodic memory declines prior to diagnosis in Huntington's disease. *Neuropsychologia* *45*, 1767–1776.
- Sørensen, S.A., and Fenger, K. (1992). Causes of death in patients with Huntington's disease and in unaffected first degree relatives. *J. Med. Genet.* *29*, 911–914.
- Sorrentino, V. (2011). Sarcoplasmic reticulum: structural determinants and protein dynamics. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *43*, 1075–1078.
- Squitieri, F., Falleni, A., Cannella, M., Orobello, S., Fulceri, F., Lenzi, P., and Fornai, F. (2010). Abnormal morphology of peripheral cell tissues from patients with Huntington disease. *J Neural Transm (Vienna)* *117*, 77–83.
- Stevanin, G., Fujigasaki, H., Lebre, A.-S., Camuzat, A., Jeannequin, C., Dode, C., Takahashi, J., San, C., Bellance, R., Brice, A., et al. (2003). Huntington's disease-like phenotype due to trinucleotide repeat expansions in the TBP and JPH3 genes. *Brain* *126*, 1599–1603.
- Stevanin, G., and Brice, A. (2008). Spinocerebellar ataxia 17 (SCA17) and Huntington's disease-like 4 (HDL4). *Cerebellum* *7*, 170–178.
- Stout, J.C., Paulsen, J.S., Queller, S., Solomon, A.C., Whitlock, K.B., Campbell, J.C., Carlozzi, N., Duff, K., Beglinger, L.J., Langbehn, D.R., et al. (2011). Neurocognitive signs in prodromal Huntington disease. *Neuropsychology* *25*, 1–14.
- Stoy, N., and McKay, E. (2000). Weight loss in Huntington's disease. *Ann. Neurol.* *48*, 130–131.

- Strand, A.D., Aragaki, A.K., Shaw, D., Bird, T., Holton, J., Turner, C., Tapscott, S.J., Tabrizi, S.J., Schapira, A.H., Kooperberg, C., et al. (2005). Gene expression in Huntington's disease skeletal muscle: a potential biomarker. *Hum Mol Genet* 14, 1863–1876.
- Suzuki, M., Nagai, Y., Wada, K., and Koike, T. (2012). Calcium leak through ryanodine receptor is involved in neuronal death induced by mutant huntingtin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 429, 18–23.
- Szpyt, J., Lorenzon, N., Perez, C.F., Norris, E., Allen, P.D., Beam, K.G., and Samso, M. (2012). Three-Dimensional Localization of the α and β Subunits and of the II-III Loop in the Skeletal Muscle L-type Ca^{2+} Channel. *Journal of Biological Chemistry* 287, 43853–43861.

T

- Tabrizi, S.J., Langbehn, D.R., Leavitt, B.R., Roos, R.A., Durr, A., Craufurd, D., Kennard, C., Hicks, S.L., Fox, N.C., Scahill, R.I., et al. (2009). Biological and clinical manifestations of Huntington's disease in the longitudinal TRACK-HD study: cross-sectional analysis of baseline data. *Lancet Neurol* 8, 791–801.
- Tabrizi, S.J., Scahill, R.I., Owen, G., Durr, A., Leavitt, B.R., Roos, R.A., Borowsky, B., Landwehrmeyer, B., Frost, C., Johnson, H., et al. (2013). Predictors of phenotypic progression and disease onset in premanifest and early-stage Huntington's disease in the TRACK-HD study: analysis of 36-month observational data. *Lancet Neurol* 12, 637–649.
- Takeshima, H., Iino, M., Takekura, H., Nishi, M., Kuno, J., Minowa, O., Takano, H., and Noda, T. (1994). Excitation-contraction uncoupling and muscular degeneration in mice lacking functional skeletal muscle ryanodine-receptor gene. *Nature* 369, 556–559.
- Tang, T.-S., Tu, H., Chan, E.Y.W., Maximov, A., Wang, Z., Wellington, C.L., Hayden, M.R., and Bezprozvanny, I. (2003). Huntingtin and huntingtin-associated protein 1 influence neuronal calcium signaling mediated by inositol-(1,4,5) triphosphate receptor type 1. *Neuron* 39, 227–239.
- Tang, T.-S., Slow, E., Lupu, V., Stavrovskaya, I.G., Sugimori, M., Llinás, R., Kristal, B.S., Hayden, M.R., and Bezprozvanny, I. (2005). Disturbed Ca^{2+} signaling and apoptosis of medium spiny neurons in Huntington's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 2602–2607.
- Tang, T.-S., Guo, C., Wang, H., Chen, X., and Bezprozvanny, I. (2009). Neuroprotective effects of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor C-terminal fragment in a Huntington's disease mouse model. *J. Neurosci.* 29, 1257–1266.
- Thompson, L.M. (2003). An expanded role for wild-type huntingtin in neuronal transcription.

Nat. Genet. 35, 13–14.

Thompson, J.C., Poliakoff, E., Sollom, A.C., Howard, E., Craufurd, D., and Snowden, J.S. (2010). Automaticity and attention in Huntington's disease: when two hands are not better than one. *Neuropsychologia* 48, 171–178.

Tidball, J.G. (2011). Mechanisms of muscle injury, repair, and regeneration. *Compr Physiol* 1, 2029–2062.

Tijsskens, P., Jones, L.R., and Franzini-Armstrong, C. (2003). Junctin and calsequestrin over-expression in cardiac muscle: the role of junctin and the synthetic and delivery pathways for the two proteins. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 35, 961–974.

Toyoshima, Y., Yamada, M., Onodera, O., Shimohata, M., Inenaga, C., Fujita, N., Morita, M., Tsuji, S., and Takahashi, H. (2004). SCA17 homozygote showing Huntington's disease-like phenotype. *Ann. Neurol.* 55, 281–286.

Toyoshima, Y., Onodera, O., Yamada, M., Tsuji, S., and Takahashi, H. (1993) [2012]. Spinocerebellar Ataxia Type 17. In *GeneReviews*(®), R.A. Pagon, M.P. Adam, H.H. Ardinger, S.E. Wallace, A. Amemiya, L.J. Bean, T.D. Bird, N. Ledbetter, H.C. Mefford, R.J. Smith, et al., eds. (Seattle (WA): University of Washington, Seattle), p.

Trejo, A., Boll, M.-C., Alonso, M.E., Ochoa, A., and Velásquez, L. (2005). Use of oral nutritional supplements in patients with Huntington's disease. *Nutrition* 21, 889–894.

Trejo, A., Tarrats, R.M., Alonso, M.E., Boll, M.-C., Ochoa, A., and Velásquez, L. (2004). Assessment of the nutrition status of patients with Huntington's disease. *Nutrition* 20, 192–196.

Tukamoto, T., Nukina, N., Ide, K., and Kanazawa, I. (1997). Huntington's disease gene product, huntingtin, associates with microtubules in vitro. *Brain Res Mol Brain Res* 51, 8–14.

Twelvetrees, A.E., Yuen, E.Y., Arancibia-Carcamo, I.L., MacAskill, A.F., Rostaing, P., Lumb, M.J., Humbert, S., Triller, A., Saudou, F., Yan, Z., et al. (2010). Delivery of GABAARs to synapses is mediated by HAP1-KIF5 and disrupted by mutant huntingtin. *Neuron* 65, 53–65.

U

Unified Huntington's Disease Rating Scale: reliability and consistency. (1996). Huntington Study Group. *Mov. Disord.* 11, 136–142.

- Unmack Larsen, I., Vinther-Jensen, T., Gade, A., Nielsen, J.E., and Vogel, A. (2015). Assessing impairment of executive function and psychomotor speed in premanifest and manifest Huntington's disease gene-expansion carriers. *J Int Neuropsychol Soc* *21*, 193–202.
- Ursu, S.-F., Alekov, A., Mao, N.-H., and Jurkat-Rott, K. (2012). ClC1 chloride channel in myotonic dystrophy type 2 and ClC1 splicing in vitro. *Acta Myol* *31*, 144–153.

V

- Valadão, P.A.C., de Aragão, B.C., Andrade, J.N., Magalhães-Gomes, M.P.S., Foureaux, G., Joviano-Santos, J.V., Nogueira, J.C., Ribeiro, F.M., Tapia, J.C., and Guatimosim, C. (2017). Muscle atrophy is associated with cervical spinal motoneuron loss in BACHD mouse model for Huntington's disease. *Eur. J. Neurosci.* *45*, 785–796.
- Valor, L.M. (2015). Transcription, epigenetics and ameliorative strategies in Huntington's Disease: a genome-wide perspective. *Mol. Neurobiol.* *51*, 406–423.
- Van Raamsdonk, J.M., Murphy, Z., Selva, D.M., Hamidizadeh, R., Pearson, J., Petersén, A., Björkqvist, M., Muir, C., Mackenzie, I.R., Hammond, G.L., et al. (2007). Testicular degeneration in Huntington disease. *Neurobiol. Dis.* *26*, 512–520.
- Varani, K., Abbracchio, M.P., Cannella, M., Cislighi, G., Giallonardo, P., Mariotti, C., Cattabriga, E., Cattabeni, F., Borea, P.A., Squitieri, F., et al. (2003). Aberrant A2A receptor function in peripheral blood cells in Huntington's disease. *FASEB J.* *17*, 2148–2150.
- Varani, K., Bachoud-Lévi, A.-C., Mariotti, C., Tarditi, A., Abbracchio, M.P., Gasperi, V., Borea, P.A., Dolbeau, G., Gellera, C., Solari, A., et al. (2007). Biological abnormalities of peripheral A(2A) receptors in a large representation of polyglutamine disorders and Huntington's disease stages. *Neurobiol. Dis.* *27*, 36–43.
- Verny, C., Bachoud-Lévi, A.-C., Durr, A., Goizet, C., Azulay, J.-P., Simonin, C., Tranchant, C., Calvas, F., Krystkowiak, P., Charles, P., et al. (2017). A randomized, double-blind, placebo-controlled trial evaluating cysteamine in Huntington's disease. *Mov. Disord.*
- van Vugt, J.P.P., Piet, K.K.E., Vink, L.J., Siesling, S., Zwinderman, A.H., Middelkoop, H.A.M., and Roos, R.A.C. (2004). Objective assessment of motor slowness in Huntington's disease: clinical correlates and 2-year follow-up. *Mov. Disord.* *19*, 285–297.

W

- Wagers, A.J., and Conboy, I.M. (2005). Cellular and molecular signatures of muscle regeneration: current concepts and controversies in adult myogenesis. *Cell* *122*, 659–667.

- 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. U.S.A.* *113*, 3359–3364.
- Warby, S.C., Graham, R.K., and Hayden, M.R. (1993). Huntington Disease. In *GeneReviews®*, R.A. Pagon, M.P. Adam, H.H. Ardinger, S.E. Wallace, A. Amemiya, L.J. Bean, T.D. Bird, N. Ledbetter, H.C. Mefford, R.J. Smith, et al., eds. (Seattle (WA): University of Washington, Seattle), p.
- Waters, C.W., Varuzhanyan, G., Talmadge, R.J., and Voss, A.A. (2013). Huntington disease skeletal muscle is hyperexcitable owing to chloride and potassium channel dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A* *110*, 9160–9165.
- Watt, S., and Bhimji, S. (2017). Malignant Hyperthermia. In *StatPearls*, (Treasure Island (FL): StatPearls Publishing).
- Wendt, H. (1960). [Wrong attitudes from the psychiatric viewpoint]. *Z Arztl Fortbild (Jena)* *54*, 1146–1150.
- Wexler, A., Wild, E.J., and Tabrizi, S.J. (2016). George Huntington: a legacy of inquiry, empathy and hope. *Brain* *139*, 2326–2333.
- Wheeler, V.C., White, J.K., Gutekunst, C.A., Vrbanc, V., Weaver, M., Li, X.J., Li, S.H., Yi, H., Vonsattel, J.P., Gusella, J.F., et al. (2000). Long glutamine tracts cause nuclear localization of a novel form of huntingtin in medium spiny striatal neurons in HdhQ92 and HdhQ111 knock-in mice. *Hum. Mol. Genet.* *9*, 503–513.
- Wilmshurst, J.M., Lillis, S., Zhou, H., Pillay, K., Henderson, H., Kress, W., Müller, C.R., Ndong, A., Cloke, V., Cullup, T., et al. (2010). RYR11 mutations are a common cause of congenital myopathies with central nuclei. *Ann. Neurol.* *68*, 717–726.
- Wilson, H., De Micco, R., Niccolini, F., and Politis, M. (2017). Molecular Imaging Markers to Track Huntington’s Disease Pathology. *Front Neurol* *8*, 11.
- Wood, N.I., Sawiak, S.J., Buonincontri, G., Niu, Y., Kane, A.D., Carpenter, T.A., Giussani, D.A., and Morton, A.J. (2012). Direct evidence of progressive cardiac dysfunction in a transgenic mouse model of Huntington’s disease. *J Huntingtons Dis* *1*, 57–64.
- Wong, Y.C., and Holzbaur, E.L.F. (2014). The regulation of autophagosome dynamics by huntingtin and HAP1 is disrupted by expression of mutant huntingtin, leading to defective cargo degradation. *J. Neurosci.* *34*, 1293–1305.
- Wu, J., Yan, Z., Li, Z., Qian, X., Lu, S., Dong, M., Zhou, Q., and Yan, N. (2016). Structure of the voltage-gated calcium channel Ca(v)1.1 at 3.6 Å resolution. *Nature* *537*, 191–196.

X

Xiang, F., Almqvist, E.W., Huq, M., Lundin, A., Hayden, M.R., Edström, L., Anvret, M., and Zhang, Z. (1998). A Huntington disease-like neurodegenerative disorder maps to chromosome 20p. *Am. J. Hum. Genet.* *63*, 1431–1438.

Y

Yalitho, T.C., and Jankovic, J. (2011). The many faces of hemifacial spasm: differential diagnosis of unilateral facial spasms. *Mov. Disord.* *26*, 1582–1592.

Yan, Z., Bai, X., Yan, C., Wu, J., Li, Z., Xie, T., Peng, W., Yin, C., Li, X., Scheres, S.H.W., et al. (2015). Structure of the rabbit ryanodine receptor RyR11 at near-atomic resolution. *Nature* *517*, 50–55.

Yanagisawa, N. (1992). The spectrum of motor disorders in Huntington's disease. *Clin Neurol Neurosurg* *94 Suppl*, S182-184.

Z

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

Zalk, R., Clarke, O.B., des Georges, A., Grassucci, R.A., Reiken, S., Mancina, F., Hendrickson, W.A., Frank, J., and Marks, A.R. (2015). Structure of a mammalian ryanodine receptor. *Nature* *517*, 44–49.

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.

Zeron, M.M., Hansson, O., Chen, N., Wellington, C.L., Leavitt, B.R., Brundin, P., Hayden, M.R., and Raymond, L.A. (2002). Increased sensitivity to N-methyl-D-aspartate receptor-mediated excitotoxicity in a mouse model of Huntington's disease. *Neuron* *33*, 849–860.

- Zhang, L., Kelley, J., Schmeisser, G., Kobayashi, Y.M., and Jones, L.R. (1997). Complex formation between junctin, triadin, calsequestrin, and the ryanodine receptor. Proteins of the cardiac junctional sarcoplasmic reticulum membrane. *J. Biol. Chem.* 272, 23389–23397.
- Zhang, H., Li, Q., Graham, R.K., Slow, E., Hayden, M.R., and Bezprozvanny, I. (2008). Full length mutant huntingtin is required for altered Ca²⁺ signaling and apoptosis of striatal neurons in the YAC mouse model of Huntington's disease. *Neurobiol. Dis.* 31, 80–88.
- Zielonka, D., Piotrowska, I., Mielcarek, M. (2014a). Cardiac dysfunction in Huntington's Disease. *Exp Clin Cardiol* 20:2547-2554.
- Zielonka, D., Piotrowska, I., Marcinkowski, J.T., and Mielcarek, M. (2014b). Skeletal muscle pathology in Huntington's disease. *Front Physiol* 5, 380.
- Zielonka, D., Mielcarek, M., and Landwehrmeyer, G.B. (2015). Update on Huntington's disease: advances in care and emerging therapeutic options. *Parkinsonism Relat. Disord.* 21, 169–178.
- Zuccato, C., Tartari, M., Crotti, A., Goffredo, D., Valenza, M., Conti, L., Cataudella, T., Leavitt, B.R., Hayden, M.R., Timmusk, T., et al. (2003). Huntingtin interacts with REST/NRSF to modulate the transcription of NRSE-controlled neuronal genes. *Nat. Genet.* 35, 76–83.

Sites internet :

[HTTp://library.med.utah.edu/WebPath](http://library.med.utah.edu/WebPath).

www.orphanet.fr

[HTTp://clinicaltrials.gov](http://clinicaltrials.gov)

[HTTp://www.predict-hd.net](http://www.predict-hd.net)

Annexe

Projet à des fins d'expérimentation animale

1.1. Référence Dossier 2016053008307403

1.2. **Titre du projet** Mise en place et caractérisation d'un modèle murin n'exprimant plus la huntingtine dans le muscle

Nombre d'années 5

Nombre de mois 0

Nombre de jours 0

Dès que le projet est autorisé Oui

3. Informations Administratives et Réglementaires

3.1. L'Etablissement Utilisateur

3.1.1. Agrément de l'Etablissement Utilisateur (EU) où seront utilisés les animaux

La maladie de Huntington est une maladie rare neurodégénérative pour laquelle aucun traitement n'est à ce jour découvert. La pathologie est principalement décrite par des signes neurologiques, psychiatriques et moteurs, mais elle touche l'ensemble des organes, dont les muscles. Les patients sont en effet atteints d'une fonte musculaire majeure au stade terminal. Cette maladie est génétique et est liée à la fois à la baisse de la protéine normale (la huntingtine) et à l'expression d'une protéine mutée. La huntingtine est retrouvée dans l'ensemble des cellules, elle n'est pas spécifique des neurones. Elle est notamment exprimée dans le muscle. L'absence totale de protéine chez la souris est létale dès la naissance. Afin d'étudier le rôle de cette protéine dans le muscle, nous voulons développer et caractériser deux modèles murins dans lesquels la protéine huntingtine est absente uniquement des muscles. Nous pourrions comprendre l'impact de la huntingtine en étudiant la force musculaire et la structure des muscles de ces modèles. Le modèle murin est le plus adapté car il n'est pas possible de remplacer ce modèle par les modèles in vitro pour étudier la force musculaire globale ainsi que la structure à l'échelle des fibres. Le suivi de l'état de santé des animaux sera quotidien pour permettre une intervention rapide si les signes de souffrance sont détectés. 240 animaux sont nécessaires pour la mise en place et la caractérisation du modèle. Ce nombre d'animaux a été calculé afin de ne pas compromettre la validité statistique des résultats. L'état

de santé des animaux sera suivi quotidiennement : contrôle visuel, mesure du poids des animaux, et une surveillance particulière de la respiration des souris. La fréquence de la surveillance sera adaptée à la situation de chaque souris. Les critères d'observation proposés seront évalués dans les premières phases du projet, et pourront être modifiés si besoin. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée si des signes de souffrance apparaissent.

Nom de l'Etablissement Utilisateur Institut des Neurosciences de Grenoble (GIN), Inserm U1216

Numéro d'agrément B 38 516 10008

Date de délivrance de l'agrément 17.03.2013

3.3. Le Projet

3.3.1. Objectif du projet

Conception des procédures expérimentales et des projets Oui

Application de procédures expérimentales aux animaux Oui

Soins aux animaux Oui

Mise à mort des animaux Oui

Justifié d'un point de vue scientifique Oui

Informations concernant cette (ces) justification(s)

Notre objectif est de comprendre les mécanismes impliquant la huntingtine dans le muscle, caractériser les défauts dans le modèle avec extinction de la protéine et développer un moyen pour corriger ces défauts. Ce projet est financé en partie par l'AFM-Téléthon.

3.3.2. Description du projet

Le projet vise à mieux comprendre le phénotype moteur de la maladie de Huntington et à mieux cerner les fonctions de la huntingtine (HTT) dans le muscle. La maladie de Huntington est une maladie génétique multisystémique neurodégénérative rare comprenant des altérations psychiatriques, cognitives et motrices. Cette pathologie est due à l'expansion de triplets CAG au sein du gène de la Huntingtine. Le type de transmission est autosomique dominant.

Il en résulte d'une part une diminution de la production de la protéine normale et d'autre part la production d'une protéine mutée. La protéine huntingtine normale a de nombreuses fonctions dont le trafic vésiculaire neuronal de BDNF, mais est également impliquée dans la mitose et dans la ciliogenèse. Le but du projet est de déterminer les fonctions de la protéine dans le muscle, les manifestations cliniques à un stade avancé de la maladie étant prononcées.

Or, l'absence totale de huntingtine chez la souris étant létale, un modèle murin permettant l'analyse de la fonction musculaire est nécessaire.

Nous développerons deux modèles murins.

1) Le premier modèle consiste en l'extinction de la huntingtine ciblée sur un seul muscle (tibialis anterior) par injection d'AAV-Cre dans ce muscle chez des souris HTT floxées.

2) Le second modèle consiste en l'extinction de la huntingtine dans l'ensemble des muscles squelettiques par injection de tamoxifène dans des souris HSA-Cre-Ert2 floxées pour induire la Cre-recombinase uniquement dans les muscles squelettiques (promoteur HAS-Cre-Ert2).

Pour chaque modèle, trois types d'expérience seront menés à deux temps différents (3 mois et 6 mois): étude de la baisse de la protéine huntingtine par Western-Blot quantitatif, étude de la morphologie des fibres musculaires par histologie et étude des protéines du complexe de relâchement du calcium (nécessaire au couplage excitation contraction) par immunofluorescence.

Enfin, la force musculaire, corrélée au poids, sera étudiée sur le second modèle par des méthodes non invasives et non douloureuses. Cette donnée est très importante et sera mise en rapport avec les études cellulaires d'extinction de la huntingtine déjà réalisées par notre équipe.

3.3.3. Précisez, le cas échéant, la (ou les) méthode(s) de mise à mort prévue(s)

Euthanasie au CO₂ ou par dislocation cervicale.

Les muscles seront prélevés à l'issue pour congélation en vue de la réalisation d'homogénats.

Perfusion transcardiaque de PFA4% après injection de pentobarbital à 150mg/kg pour l'histologie ainsi que l'immunofluorescence

3.3.5. Stratégie d'expérimentation ou d'observation et approche statistique utilisée afin de réduire au minimum le nombre d'animaux, la douleur, la souffrance et l'angoisse infligées, et l'impact environnemental, le cas échéant – si une étude statistique est prévue, indiquez

3.4. Les Animaux

3.4.2. Espèces animales ou types d'animaux utilisés et justifiez les tests choisis :

Pour chacun des deux modèles, trois types d'expérience nécessitant les muscles entiers (Western-blot, histologie, immunofluorescence) à deux temps différents sont menés. Pour chaque type d'expérience, un lot de 10 souris contrôles et de 10 souris avec baisse de huntingtine est nécessaire.

Le nombre d'animaux est limité au nombre minimum nécessaire afin d'avoir une chance d'au moins 80% de détecter une différence significative (risque β standard en statistique déterminant la puissance statistique minimale requise) et un risque d'erreur α fixé à 5% et donc de ne pas compromettre les objectifs du projet. Ce nombre a été déterminé objectivement pour chaque expérience à l'aide d'un test statistique d'estimation de la taille

d'échantillon optimale.

(ANOVA à un facteur, test paramétrique ou Mann-Whitney, test non paramétrique).

Les souffrances seront évaluées par un suivi visuel des animaux. Concernant la première procédure, du paracétamol sera administré (200mg/kg) après l'injection. Si des difficultés motrices, liées à l'injection amènent à des difficultés d'alimentation, la nourriture hydratée sera proposée pour faciliter celle-ci. Concernant la seconde procédure, il n'est pas attendu d'atrophie majeure (Wang et al., PNAS, 2016), le KO inductible total n'ayant montré aucun signe de myopathie sévère. Ainsi, le suivi quotidien des animaux consistera en un contrôle visuel, mesure du poids des animaux, et une surveillance particulière de la respiration des souris. Si une dégradation rapide est néanmoins observée, la fréquence de la surveillance sera augmentée. Les critères d'observation proposés seront évalués dans les premières phases du projet, et pourront être modifiés si besoin. Les points limite proposés sont une perte de poids supérieure à 20% avec prostration de l'animal et une difficulté respiratoire. Les animaux seront euthanasiés lorsque les points limite définis seront atteints.

3.4.1. Justifiez d'avoir recours à des animaux pour atteindre les objectifs du projet

Les modèles cellulaires que nous utilisons actuellement ne permettent pas de répondre à des questions physiologiques poussées car il n'est pas possible de reproduire la structure du muscle en culture. De plus, en vue de la mise en place d'une thérapeutique, un modèle animal est requis.

Souris (*Mus musculus*) Oui

3.4.3. Justifiez la pertinence de l'(des) espèce(s) choisie(s)

La souris est l'espèce adéquate car elle est le mammifère pour lequel il existe un degré de similitude important avec le muscle humain et qu'il est possible de le modifier génétiquement.

3.4.8. Catégorie des animaux utilisés dans le projet :

Animaux génétiquement altérés

Animaux génétiquement modifiés

3.4.9. Origine des animaux tenus en captivité :

Les animaux destinés à être utilisés dans les procédures expérimentales appartenant aux espèces dont la liste est fixée réglementairement sont-ils élevés à cette fin et proviennent-ils d'éleveurs ou de fournisseurs agréés ? Oui

de flore sauvage par le contrôle et leur commerce ? Non

3.4.5. S'agit-il de spécimens de primates non humains ? Non

3.4.6. S'agit-il d'animaux capturés dans la nature ? Non

3.4.7. S'agit-il d'animaux d'espèces domestiques, errants ou vivant à l'état sauvage ? Non

Animaux tenus en captivité (domestiques ou non domestiques) Oui

Animaux génétiquement altérés Oui

Création d'une lignée Oui

Maintien d'une lignée établie et/ou utilisation Oui

Phénotype dommageable Oui

Nombre d'établissements éleveur ou fournisseur agréés fournissant tout ou partie des animaux du projet : 1

Animaux fournis Mus musculus

Votre propre établissement utilisateur fournit-il tout ou partie des animaux du projet ? Oui

Un autre établissement utilisateur fournit-il tout ou partie des animaux du projet ? Non

Les animaux sont-ils des animaux réutilisés d'un projet précédent? Non

Animaux utilisés

4. Procédures Expérimentales

4.1. Objet(s) visé(s) par les procédures expérimentales

3.4.10. Nombre d'animaux utilisés dans le projet 240

Justification de ce nombre pour chacune des espèces animales utilisées

Pour chacun des deux modèles, 6 lots sont nécessaires (3 types d'expérience avec 2 temps différents) composés chacun de 10 souris contrôles et 10 souris avec baisse de huntingtine pour atteindre la puissance statistique décrite au paragraphe 3.3.5. Au total, 120 souris sont nécessaires par modèle, soit 240 souris au total. Au vu de la publication réalisée utilisant le même protocole (Joubert et al., Human Molecular Genetics, 2013), aucun décès n'est attendu suite à l'injection localisée, il en est de même du modèle murin avec injection de tamoxifène (Wang et al., PNAS, 2016).

3.4.11. Indiquez à quel(s) stade(s) de développement les animaux seront utilisés et le justifier

Les animaux seront utilisés à l'âge adulte, à partir de 2 mois.

3.4.12. Indiquer le sexe des animaux et le justifier

Utilisation de mâles et de femelles.

3.4.13. Indiquer pour chaque espèce les points limites adaptés, suffisamment prédictifs et précoces pour permettre de limiter la douleur à son minimum, sans remettre en cause les résultats du projet :

Concernant la première procédure, une surveillance quotidienne visuelle après l'injection sera effectuée. Du paracétamol sera administré (200mg/kg) après l'injection. La nourriture hydratée sera proposée pour faciliter l'alimentation. Concernant la seconde procédure, il n'est pas attendu d'atrophie majeure (Wang et al., PNAS, 2016), le KO inductible total n'ayant

montré aucun signe de myopathie sévère. Il n'y a pas de perte de poids qui a été relevée par rapport aux souris contrôles (Wang et al., PNAS, 2016). Ainsi, le suivi quotidien des animaux consistera en un contrôle visuel, mesure du poids des animaux, et une surveillance particulière de la respiration des souris. Si une dégradation rapide est néanmoins observée, la fréquence de la surveillance sera augmentée. Les critères d'observation proposés seront évalués dans les premières phases du projet, et pourront être modifiés si besoin. Les points limite proposés sont une perte de poids supérieure à 20% avec prostration de l'animal et une difficulté respiratoire. Les animaux seront euthanasiés si les points limite définis sont atteints.

A - La recherche fondamentale Oui

Description des procédures

Procédure

Nombre de procédures 2

Nom de la procédure

Invalidation du gène HTT par injection d'AAV-Cre

Proposition de classification de la procédure selon le degré de sévérité Classe modérée

Pertinence et justification de la procédure expérimentale

Les 6 lots de souris seront anesthésiés par Isoflurane (maintien 2%, débitmètre O2 : 2L/min). L'injection se fera sous hotte de confinement (PSMII). Les virus injectés seront des AAV sérotype 8 (Généthon) avec le promoteur desmine et exprimant la Cre recombinase. 15µl de virus (3.10^9 particules) ou de PBS stérile seront injectés. L'injection se fera dans chaque patte avec une seringue à insuline au niveau du tibialis antérieur, muscle aisément repérable. A l'issue de l'injection, du paracétamol (200mg/kg) sera distribué. Les animaux seront euthanasiés à 3 mois et à 6 mois après injection virale pour étude en Western-Blot quantitative de la baisse de Huntingtine, histologie et immunofluorescence dans ce muscle. Les animaux seront euthanasiés comme décrit au paragraphe 3.3.3.

Devenir des animaux à la fin de cette procédure expérimentale

Procédure

Indiquez le nombre de lots et le nombre d'animaux par lot, et les justifier

6 lots sont nécessaires (3 analyses : western-blot, histologie et immunofluorescence ; deux temps 3 mois et 6 mois) avec 10 souris contrôle et 10 souris avec baisse de huntingtine pour atteindre la puissance statistique décrite au paragraphe 3.3.5. Au total, 120 souris sont nécessaires. Au vu de la publication réalisée utilisant le même protocole (Joubert et al., Human Molecular Genetics, 2013), aucun décès n'est attendu suite à l'injection localisée.

Indiquez le cas échéant les méthodes pour réduire ou supprimer la douleur, la souffrance et

l'angoisse (liste des médications - anesthésiques, analgésiques, anti-inflammatoires...en précisant les doses, voies, durées et fréquences d'administration), y compris le raffinement des conditions d'hébergement, d'élevage et de soins :

Une anesthésie générale des animaux sera effectuée par isoflurane (maintien à 2%, débitmètre 02 à 2L/min) pour permettre une injection précise dans le muscle (tibialis antérieur). Un suivi quotidien des animaux (entre 1 et 4/jour) sera réalisé. De la nourriture hydratée sera placée dans les cages afin de faciliter leur alimentation et leur hydratation même sans présence de difficultés motrices. Le suivi des observations sera consigné dans un registre.

Indiquez le cas échéant les dispositions prises en vue de réduire, d'éviter et d'atténuer toute forme de souffrance des animaux de la naissance à la mort :

De la nourriture hydratée sera mise à disposition des animaux directement dans la cage afin de pallier une difficulté dans l'alimentation et l'hydratation. Le suivi régulier des animaux permettra de détecter une éventuelle souffrance afin la fin du protocole expérimental, et les animaux qui atteindront un des points limite définis seront euthanasiés, mais néanmoins utilisés si possible dans les analyses.

Mise à mort Oui

Précisez les animaux concernés

Tous

Nom de la procédure

Invalidation du gène HTT par injection de tamoxifène

Proposition de classification de la procédure selon le degré de sévérité Classe modérée

Description détaillée de la procédure expérimentale

Pertinence et justification de la procédure expérimentale

Les animaux utilisés expriment d'une part le gène de la HTT avec deux sites loxP situés de part et d'autre d'un exon crucial, et d'autre part la recombinaise Cre sous l'influence d'un promoteur HSA – ERT2. Le promoteur HSA-Cre-ERT2 permet l'expression de la recombinaise Cre uniquement dans le muscle squelettique, après induction par le tamoxifène. Pour induire l'expression de la Cre puis une recombinaison, 5 injections intrapéritonéales de 100µl tamoxifène seront réalisées, une par jour. Le tamoxifène (réf Sigma, T5648) est dilué dans de l'éthanol puis émulsionné dans de l'huile de tournesol (réf Sigma, T5007) (éthanol/huile en mélange 10/90) à la concentration choisie pour avoir 10mg/ml.

La création de ce modèle est nécessaire pour permettre l'étude de la force musculaire.

La force musculaire des souris sera évaluée par grip test tout au long de la procédure (deux fois par semaine).

Le test reproduit une situation physiologique non douloureuse : mesure du temps pendant lequel les souris restent accrochées sur une grille positionnée à l'envers (temps maximal du test 5 min). Le poids sera systématiquement mesuré avant chaque grip test.

Trois types d'expériences seront effectuées à 2 temps différents après euthanasie : étude de la protéine en western-blot, histologie et immunofluorescence (prélèvements de l'ensemble des muscles pour chaque type d'expériences).

Au total, 6 lots sont nécessaires.

Ce protocole permet de compléter le protocole n°1. En effet, il s'agit d'étudier la physiologie musculaire globale alors que le protocole n°1 permet l'étude d'un muscle en particulier. Si des animaux atteignent le point limite avant la fin du protocole, ils seront euthanasiés, et leurs muscles prélevés pour les analyses ultérieures.

Indiquez le nombre de lots et le nombre d'animaux par lot, et les justifier

Chaque lot comportera 20 souris, afin de pouvoir réaliser une analyse statistique décrite au paragraphe 3.3.5.

Un groupe contrôle (10 souris du même âge n'exprimant pas la Cre) sera utilisé pour chaque lot, et recevra la même dose de tamoxifène. Les trois types d'expériences (Western-blot, pour l'histologie et pour l'immunomarquage) seront réalisés à deux temps après les injections de tamoxifène (3 mois et 6 mois). Sur chaque souris l'ensemble des muscles seront prélevés pour les études en Western-blot, pour l'histologie et pour l'immunomarquage. Il y aura donc au total 6 lots (3 types d'expériences *2 temps) de 20 souris, soit 120 souris.

Indiquez le cas échéant les méthodes pour réduire ou supprimer la douleur, la souffrance et l'angoisse (liste des médications -anesthésiques, analgésiques, anti-inflammatoires...en précisant les doses, voies, durées et fréquences d'administration), y compris le raffinement des conditions d'hébergement, d'élevage et de soins :

Devenir des animaux à la fin de cette procédure expérimentale

Il n'est pas attendu d'atrophie majeure ni de perte de poids importante (Wang et al., PNAS, 2016), le KO inductible total n'ayant montré aucun signe de myopathie sévère. Ainsi, le suivi quotidien des animaux consistera en un contrôle visuel, mesure du poids des animaux, et une surveillance particulière de la respiration des souris. Si une dégradation rapide est néanmoins observée, la fréquence de la surveillance sera augmentée. Les critères d'observation proposés seront évalués dans les premières phases du projet, et pourront être modifiés si besoin. Les points limite proposés sont une perte de poids supérieure à 20% avec prostration de l'animal et une difficulté respiratoire. Les animaux seront euthanasiés si les points limite définis sont atteints.

Indiquez le cas échéant les dispositions prises en vue de réduire, d'éviter et d'atténuer toute forme de souffrance des animaux de la naissance à la mort :

De la nourriture hydratée sera mise à disposition des animaux directement dans la cage afin de pallier toute difficulté dans l'alimentation et l'hydratation. Le suivi régulier des animaux permettra de détecter une éventuelle souffrance afin la fin du protocole expérimental, et les animaux qui atteindront un des points limite définis seront euthanasiés, mais néanmoins utilisés si possible dans les analyses.

Indiquez le cas échéant les raisons scientifiques justifiant une dérogation aux conditions d'hébergement des animaux :

Dispositions prises pour éviter tout double emploi injustifié des procédures expérimentales, le cas échéant :

Le protocole n°1 permet une étude structurale et morphologique d'un muscle dit mixte (composé de fibres lentes et rapides) avec une efficacité de recombinaison importante et vient compléter les études cellulaires entreprises par notre équipe. Le protocole n°2 avec extinction dans l'ensemble des muscles permet d'étudier le retentissement sur la physiologie globale de l'animal. De plus, il permet l'étude de muscles exclusivement de fibres lentes ou exclusivement de fibres rapides. Les deux protocoles sont complémentaires.

Mise à mort Oui

Précisez les animaux concernés

Tous

AVIS DU COMITÉ D'ÉTHIQUE

(à transmettre au secrétariat autorisation de projet :
autorisation-projet@recherche.gouv.fr)

Date 8/06/2016

Référence du dossier: 2016053008307403

Titre du Projet: Mise en place et caractérisation d'un modèle murin n'exprimant plus la huntingtine dans le muscle

1- Avis éthique sur le projet : Favorable
 Défavorable

Motif(s) en cas d'avis défavorable :

2- Proposition de reclassement des procédures expérimentales selon le degré de gravité indiqué par le responsable de projet : oui non

Procédure(s) reclassée(s) et proposition de reclassement :

- o procédure n° :
reclassement :
(le bloc Procédure(s) reclassée(s) et proposition de reclassement est à reproduire le cas échéant)

3- En application de l'article R.214-120 du décret n°2013-118 du 1^{er} février 2013, le projet devra t'il bénéficier d'une appréciation rétrospective à l'issue de sa réalisation : oui non

4- Le cas échéant (cf point 4.3 du dossier), avis sur la réutilisation d'un animal pour autant que l'animal n'ait pas été utilisé, préalablement à ce projet, plus d'une fois dans une procédure expérimentale entraînant une douleur intense, de l'angoisse ou une souffrance équivalente (article R.214-113 du décret n°2013-118 du 1^{er} février 2013) :

Favorable Défavorable

Motif(s) en cas d'avis défavorable :

Comité Local du Grenoble Institut des
Neurosciences, C2EA-04



S. HUMBERT
Présidente du comité



MINISTÈRE DE L'ÉDUCATION NATIONALE,
DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE

Paris, le 10 NOV. 2016

Objet : Notification d'autorisation de projet utilisant des animaux à des fins scientifiques

Direction générale de la
recherche et de l'innovation

Service de la performance, du
financement et de la
contractualisation avec les
organismes de recherche

Département de la culture
scientifique et des relations avec
la société

Cellule Animaux utilisés à des
Fins Scientifiques - AFIS -

Affaire suivie par Virginie Vallet
Chargée de mission

Téléphone :
01 55 55 99 55
Mél :
virginie.vallet@recherche.gouv.fr

1 rue Descartes
75231 Paris Cedex 05

En application des dispositions du code rural et de la pêche maritime, notamment ses articles R.214-87 à R.214-126, le projet :

- référencé sous le numéro APAFIS#5593-2016053008307403 v4
- ayant pour titre : Mise en place et caractérisation d'un modèle murin n'exprimant plus la huntingtine dans le muscle
- déposé par :
Institut des Neurosciences de Grenoble (GIN), Inserm U836,
numéro d'agrément B3851610008, dont le responsable est
Monsieur Frédéric SAUDOU
- et dont la responsabilité de la mise en œuvre générale du projet et de sa conformité à l'autorisation est assurée par :
Madame Isabelle MARTY, Monsieur Brice POREAU,

est autorisé.

L'autorisation de projet est accordée, sous réserve de la validité de l'agrément de l'Etablissement Utilisateur, pour une durée de 5 ans à compter de l'autorisation.

Le projet précité a été évalué sur le plan éthique par le Comité d'éthique en expérimentation animale N°004 et a reçu un avis favorable.

Ce projet ne fera pas l'objet, à l'issue de sa réalisation, d'une appréciation rétrospective.

Pour la ministre et par délégation
l'adjointe du chef du service de la performance, du
financement et de la contractualisation avec les
organismes de recherche

Christine COSTE

Résumé

La maladie de Huntington (MH) est une pathologie génétique multisystémique neurodégénérative rare caractérisée par des atteintes motrices, cognitives et psychiatriques. Elle est due à une augmentation de la répétition de triplet CAG dans l'exon 1 du gène *HTT*, dont la taille normale est de 6 à 35 répétitions. Cette expansion de triplets conduit à la présence d'une répétition de glutamine de taille anormale dans l'extrémité N-terminale de la protéine huntingtine (HTT). Les conséquences de la mutation sont d'une part la diminution de l'expression de la protéine non mutée et d'autre part l'expression d'une protéine mutée. L'une des fonctions de la HTT est le transport intracellulaire de vésicules le long des microtubules dans les neurones. Par ailleurs, une pathologie similaire appelée « Huntington disease like 2 » est due à une perte de fonction de la junctophilin-3 ayant pour rôle l'établissement de points de contact entre la membrane plasmique et le reticulum endoplasmique au niveau neuronal. Les présents travaux visent à découvrir les mécanismes au sein desquels la HTT est impliquée dans un modèle différent de la cellule neuronale : la cellule musculaire. En effet, les points de contact nommés triades sont le cœur du couplage excitation-contraction. Les travaux ont permis de montrer, après avoir créé des modèles cellulaires et animaux avec baisse d'expression de la protéine, un défaut de la fonction musculaire au niveau cellulaire comme au niveau physiologique. Les relâchements calciques sont altérés. La force est diminuée. De plus, ces altérations de fonctionnement sont corrélées à une baisse d'expression des principaux récepteurs de la triade. Enfin, une fraction exogène de la partie N-terminale de la protéine non mutée restaure les défauts calciques observés. La huntingtine a donc un rôle prépondérant dans la fonction princeps du muscle : la contraction.

Abstract

Huntington Disease (HD) is a rare multisystemic neurodegenerative genetic disorder, which combines psychiatric, cognitive and motor alterations. It is caused by an increase in CAG repeats in the huntingtin gene, resulting in an expansion of polyglutamine stretch in the protein. This induces a loss of the huntingtin protein (HTT) normal function associated with production of a mutant protein. HTT is an ubiquitous microtubules associated protein, with numerous functions among which vesicles and organelles traffic along microtubules. Along this line, one of its functions could be the traffic of reticulum vesicles to form contact point with the plasma membrane in neurons. Moreover, a phenocopy named "Huntington's disease like 2" is due to junctophilin-3 loss of function. Junctophilin 3 is involved in the establishment of contact points between endoplasmic reticulum and plasma membrane in neurons. These studies are dedicated to the validation of the hypothesis of the role of HTT in contact points between endoplasmic reticulum and plasma membrane in another model, in which contacts between reticulum and plasma membrane are of major importance: the skeletal muscle cell. Indeed, the contact points between sarcoplasmic reticulum and plasma membrane (T-Tubule), called the triads, are the basis of excitation-contraction coupling in muscle. In these studies, we developed cellular and animals models with a loss of expression of HTT in skeletal muscle specifically. Theses studies show that calcium release is altered at the cellular level and muscle force is altered at animal model level. Theses alterations are correlated with loss of expression of the main receptors of the triad. Finally, fragment of the normal protein can restore calcium defects. Theses studies emphasize the role of huntingtin in skeletal muscle.