



HAL
open science

**Les astrocytes réactifs, des partenaires anti-agrégants
dans la maladie de Huntington : identification des
mécanismes impliqués dans le dialogue
neurone-astrocyte**

Laurene Abjean

► **To cite this version:**

Laurene Abjean. Les astrocytes réactifs, des partenaires anti-agrégants dans la maladie de Huntington : identification des mécanismes impliqués dans le dialogue neurone-astrocyte. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Paris Saclay (COMUE), 2019. Français. NNT : 2019SACLS088 . tel-02562821

HAL Id: tel-02562821

<https://theses.hal.science/tel-02562821>

Submitted on 5 May 2020

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.

Les astrocytes réactifs, des partenaires anti-agrégants dans la maladie de Huntington : identification des mécanismes impliqués dans le dialogue neurone-astrocyte

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay préparée dans le Laboratoire des maladies neurodégénératives, UMR9199, MIRGen, CEA

École doctorale n°568
Signalisations et réseaux intégratifs en biologie (Biosigne)
Spécialité de doctorat: Science de la vie et de la santé

Thèse présentée et soutenue à Fontenay-aux-Roses, le 9 avril 2019, par

Laurene Abjean

Composition du Jury :

Michael Schumacher DR1 INSERM, Université Paris-Saclay INSERM UMR1195 (Faculté de médecine, Le Kremlin-Bicêtre)	Président
Jocelyne Caboche DR1 CNRS, Sorbonne Université UMR 8246 – Neurosciences (Institut de biologie Paris-Seine)	Rapportrice
Christian Lobsiger CR1 INSERM, Sorbonne Université INSERM U1127, CNRS UMR7225 (Institut du cerveau et de la moelle épinière)	Rapporteur
Nicole Déglon Professeure associée, Centre hospitalier universitaire vaudois Laboratoire de neurothérapies et neuromodulation	Examinatrice
Sandrine Humbert DR2 INSERM, Université Grenoble Alpes INSERM U1216 (Grenoble-Institut des Neurosciences)	Examinatrice
Carole Escartin CR1 CNRS, Université Paris-Saclay UMR9199 – MIRGen- CEA/CNRS	Directrice de thèse

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABBREVIATIONS.....	7
TABLE DES FIGURES ET TABLEAUX.....	9
INTRODUCTION.....	11
I. La maladie de Huntington.....	12
1. Triade de symptômes.....	12
a. Troubles moteurs.....	12
b. Troubles cognitifs.....	13
c. Troubles psychiatriques.....	13
2. Cause et diagnostique de la maladie de Huntington.....	14
a. Mutation de la Htt.....	14
b. Diagnostic de la MH.....	15
3. L'anatomopathologie de la maladie de Huntington.....	16
a. L'atrophie du striatum.....	16
b. La dégénérescence des neurones striataux.....	17
4. Physiopathologie de la maladie de Huntington : la huntingtine.....	18
a. La huntingtine possède de nombreux rôles physiologiques.....	18
i. Structure et distribution de la Htt.....	18
ii. La Htt possède de nombreux partenaires protéiques.....	20
b. Mutations de la Huntingtine : gain ou perte de fonction ?.....	21
i. Dérégulation transcriptionnelle.....	23
ii. Altération du transport intracellulaire.....	23
iii. Déficit énergétique.....	23
iv. Diminution du support trophique : le BDNF.....	24
v. Transmission synaptique et excitotoxicité.....	25
c. Pistes thérapeutiques.....	27
i. Cibler les voies de pathogenèse de la maladie de Huntington.....	27
ii. Cibler la mHtt.....	29
5. Modèles murins de la maladie de Huntington.....	30
a. Les principaux modèles murins de la maladie de Huntington.....	30
b. Les modèles murins utilisés dans l'étude.....	32
i. Les souris Knock-in Hdh140.....	32

ii.	Le modèle lentiviral	33
II.	Les astrocytes.....	35
1.	Les astrocytes, des cellules partenaires indispensables dans le SNC.....	35
a.	Caractéristiques des astrocytes.....	35
i.	Définition	35
ii.	Organisation des astrocytes dans le cerveau	36
b.	Les astrocytes jouent de nombreux rôles dans le système nerveux central	37
2.	Les astrocytes au cours de la maladie de Huntington.....	41
a.	Les dysfonctions des astrocytes au cours de la maladie de Huntington.....	41
i.	Altération de la transmission synaptique.....	41
ii.	Altération du métabolisme.....	43
iii.	Diminution des fonctions de support.....	44
b.	Les astrocytes deviennent réactifs au cours de la maladie de Huntington.....	45
i.	Les astrocytes réactifs	45
ii.	La réactivité astrocytaire dans la maladie de Huntington.....	47
iii.	Les autres partenaires cellulaires de la neuroinflammation	49
c.	La voie JAK2-STAT3 contrôle la réactivité astrocytaire dans la maladie de Huntington ...	50
i.	Activation directe ou indirecte des astrocytes réactifs par la mHtt.....	50
ii.	Les voies de signalisation activées dans les astrocytes réactifs au cours de la maladie de Huntington.....	51
iii.	La voie JAK2-STAT3.....	52
III.	L'agrégation et les systèmes de protéostasie dans la maladie de Huntington	54
1.	Agrégation	54
a.	Définition	54
b.	L'agrégation dans la maladie de Huntington	56
i.	Agrégats de mHtt.....	56
ii.	Modulation de l'agrégation et ubiquitination.....	57
iii.	Les agrégats de mHtt : bénéfiques ou délétères ?	58
iv.	Localisation et transfert de la mHtt.....	60
2.	Le système ubiquitine-protéasome.....	65
a.	Description de la voie ubiquitine-protéasome.....	65
i.	Définition	65

ii.	L'UPS est composé de deux systèmes successifs	66
b.	Le système ubiquitine-protéasome dans la maladie de Huntington	69
3.	Autophagie	71
a.	L'autophagie en condition physiologique	71
i.	Définition	71
ii.	Les étapes de l'autophagie	72
iii.	L'autophagie sélective	75
iv.	Les interactions entre les systèmes de protéolyse	75
b.	L'autophagie dans la maladie de Huntington	76
i.	La mHtt, cible de l'autophagie	77
ii.	La Htt dans l'autophagie	77
iii.	Les dysfonctions de l'autophagie dans la maladie de Huntington	78
4.	Les protéines chaperonnes	79
a.	Définition	79
i.	Les protéines chaperonnes	79
ii.	L'autophagie médiée par les chaperonnes	82
iii.	Interactions entre les chaperonnes et les systèmes de protéolyse	84
b.	Les chaperonnes dans la maladie de Huntington	85
i.	Les protéines chaperonnes	85
ii.	L'autophagie médiée par les chaperonnes	88
5.	La protéostasie et les astrocytes dans la MH	89
a.	Le système ubiquitine-protéasome	89
b.	L'autophagie	90
c.	Les chaperonnes	90
IV.	Problématique et objectifs de la thèse	92
RÉSULTATS	94	
ARTICLE 1	95	
DISCUSSION	141	
I.	Modulation de la réactivité dans les MND	142
1.	JAK2-STAT3 est nécessaire et suffisante pour l'induction de la réactivité astrocytaire	142
2.	Caractérisation moléculaire de la réactivité	143
3.	L'utilisation de vecteurs viraux	144

II. Les astrocytes réactifs diminuent l'agrégation de la mHtt	145
1. Diminution de l'agrégation.....	145
2. Les systèmes de protéolyse dans les astrocytes réactifs	148
3. Les protéines chaperonnes	150
4. Améliorations des altérations neuronales	153
III. Hétérogénéité de la réactivité astrocytaire en fonction du contexte pathologique	154
CONCLUSION GÉNÉRALE	156
ANNEXES.....	159
ANNEXE 1: ARTICLE 2	160
ANNEXE 2: ARTICLE 3	185
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	201

LISTE DES ABBREVIATIONS

3-MA	3-methyladenine
AA	Acide ascorbique
AAV	Vecteurs viraux adéno-associés
ADN	Acide désoxyribonucléique
Aldh1L1	Aldehyde dehydrogenase 1 family member L1
AMP	Adénosine monophosphate
AMPK	AMP Kinase
AMPAR	Alpha-amino-3-hydroxy-5-méthylisoazol-4-propionate receptor
ApoE	Apolipoprotéine E
AQP4	Aquaporine 4
ARN	Acide ribonucléique
ARNi	ARN interférent
ARNm	ARN messenger
ASO	Oligonucléotides antisens
ATP	Adénosine triphosphate
BAC	Bacterial artificial chromosome
BDNF	Brain neurotrophic factor
BHE	Barrière hémato-encéphalique
Ca²⁺	Calcium
CB1R	Récepteur métabotrope aux endocannabinoïdes CB1
CCL5	C-C motif chemokine ligand 5
CD	Cluster of differentiation
CH	Cholestérol
Cl⁻	Chlore
CNTF	Ciliary neurotrophic factor
Cts	Cathepsine
Cx	Connexine
D1R	Récepteur dopaminergique D1
D2R	Récepteur dopaminergique D2
DA	Dopamine
DARPP32	Dopamine- and cAMP-regulated neuronal phosphoprotein
DNAJB1-DN	Mutant dominant négatif de DNAJB1
d/iSPNs	direct/indirect Spiny projection neurons
ESCRT	Endosomal sorting complexes required for transport
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FRET	Fluorescence resonance energy transfer
GABA	Acide gamma aminobutyrique
GABAR	GABA receptor
GAT1/3	GABA transporter 1/3
GFAP	Glial fibrillary acid protein
GFP	Green fluorescence protein
GLAST	Glutamate aspartate transporter
Glc	Glucose
Gln	Glutamine
GLT-1	Glutamate transporter 1
Glut	Glutamate
GLUT-1	Glucose transporter 1
GPe/i	Globus pallidus externe/interne
GSH	Glutathione
GWAS	Genome-wide association study
HAP1	Htt-associated protein 1
Hdh140	Souris KI avec 140 CAG modèles de la MH
Hsp	Heat shock protein
Htt	Huntingtine
IL	Interleukine
IP3	Inositol trisphosphate
iPSC	Induced pluripotent stem cell
IRM	Imagerie par résonance magnétique
JAK2	Janus kinase 2

JAK2ca	forme constitutivement active de JAK2
K⁺	Potassium
KI	Knock-in
LAMP1/2	Lysosomal membrane protein 1/2
LCR	Liquide céphalo-rachidien
LTD	Dépression à long terme
LTP	Potentialisation à long terme
LV	Lentivirus
LVA/N	LV ciblant les astrocytes (A) ou les neurons (N)
MA	Maladie d'Alzheimer
MAP-LC3	Microtubule-associated protein 1 light chain 3
MEGF10	Multiple EGF Like Domains 10
MERTK	Myeloid-epithelial-reproductive tyrosine kinase
MH	Maladie de Huntington
mHtt	Htt mutée
MND	Maladie neurodégénérative
MP	Maladie de Parkinson
MSNs	Medium spiny neurons
mTOR	Mammalian ou mechanistic target of rapamycin
NEF	Facteur d'échange nucléotidique
NFL	Neurofilament light
NMDAR	N-methyl-D-aspartate receptor
NO	Monoxyde d'azote
PDE10a	Phosphodiesterase 10A
PE	Phosphatidylethanolamine
PGC-1α	Peroxisome proliferator-activating receptor G coactivator-1 α
PGE	Prostaglandine
RE1/NRSE	Repressor element 1/neuron-restrictive silencer element
REST/NRSF	Repressor element-1 transcription/neuron restrictive silencer factors
RISC	RNA-induced silencing complex
ROS	Espèces réactives de l'oxygène (Reactive oxygen species)
polyQ	Séquence polyglutamine
SDS	Dodécylsulfate de sodium
SNAP	Soluble NSF Attachment Protein
SNAREs	SNAP receptors
SNC	Système nerveux central
Snc/r	Substance noire pars compacta/reticula
SOCS3	Suppressor of cytokine signaling 3
SPNs	Spiny projection neurons
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
TEP	Tomographie par émission de positons
TNFα	Tumor necrosis factor alpha
TrkB	Tropomyosin receptor kinase B
Tx	Triton X-100
Ub	Ubiquitine
UHDRS	Unified Huntington's disease rating scale
ULK1	UNC-51-like kinase 1
UPS	Système ubiquitine-protéasome
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VSV	Vesicular stomatitis virus
YAC	Yeast artificial chromosome
WT	Souris sauvage (wild type)

TABLE DES FIGURES ET TABLEAUX

<i>Figure 1- Progression des symptômes cliniques de la MH.....</i>	13
<i>Figure 2- Atrophie du striatum et du cortex dans le cerveau d'un patient au cours de la MH..</i>	16
<i>Figure 4- Le circuit des ganglions de la base au cours de la MH.</i>	18
<i>Figure 5- Expression de la Htt dans les différents types cellulaires du SNC.....</i>	19
<i>Figure 6- Structure de la protéine Htt..</i>	20
<i>Figure 7- La protéine Htt est impliquée dans le transport vésiculaire.....</i>	21
<i>Figure 8- Principaux mécanismes de pathogenèse de la MH.....</i>	22
<i>Figure 9- Altérations de l'axe cortico-striatal au cours de la MH.....</i>	26
<i>Figure 10- Principales cibles thérapeutiques pour la MH..</i>	28
<i>Figure 11- Principales stratégies thérapeutiques permettant la diminution de l'expression de la mHtt</i> <i>.....</i>	29
<i>Figure 12- Les astrocytes, des cellules gliales complexes.</i>	36
<i>Figure 13- Les astrocytes sont essentiels au bon fonctionnement du SNC.</i>	38
<i>Figure 14- Les astrocytes deviennent réactifs dans le cerveau des patients au cours de la MH.....</i>	47
<i>Figure 15- La réactivité astrocytaire est décrite dans quelques modèles murins de la MH.</i>	48
<i>Figure 16- Principaux stimuli et voies de signalisation impliquées dans l'induction de la réactivité</i> <i>astrocytaire au cours des MND.....</i>	51
<i>Figure 17- La voie JAK2-STAT3.....</i>	53
<i>Figure 18- Les différentes espèces d'agrégation.....</i>	55
<i>Figure 19- Les différentes hypothèses sur le double rôle des agrégats de mHtt.....</i>	60
<i>Figure 20- Différentes localisations des agrégats de mHtt..</i>	61
<i>Figure 21- Les agrégats de mHtt sont présents dans différents types cellulaires.....</i>	62
<i>Figure 22- Les différentes voies non conventionnelles de transfert de protéines..</i>	64
<i>Figure 23- Les principaux systèmes de protéostasie cellulaire.....</i>	65
<i>Figure 24- La dégradation par le système UPS.....</i>	66
<i>Figure 25- Structure du protéasome.....</i>	67
<i>Figure 26- Les différents types d'autophagie.....</i>	72
<i>Figure 27- Les différentes étapes de l'autophagie.....</i>	72
<i>Figure 28- Les défauts de l'autophagie au cours de la MH.</i>	78
<i>Figure 29- Le repliement des protéines par le système Hsp70/Hsp40..</i>	82
<i>Figure 30- Les différentes étapes de la CMA.....</i>	83
<i>Figure 31- Interactions des chaperonnes avec les systèmes de protéolyse cellulaire.....</i>	85
<i>Figure 32- Etude de l'impact de la réactivité astrocytaire sur l'agrégation de la mHtt au cours de la</i> <i>MH.....</i>	93
<i>Figure 33- Impact de la réactivité astrocytaire sur les cellules microgliales dans le modèle Hdh140..</i>	139
<i>Figure 34- Hypothèses de travail : un dialogue entre les astrocytes réactifs et les neurones pour</i> <i>réduire l'agrégation de la mHtt.....</i>	147
<i>Figure 35- Mécanismes impliqués dans la diminution de l'agrégation de la mHtt par les astrocytes</i> <i>réactifs : synthèse des résultats obtenus.....</i>	152

Tableau 1- Description des modèles murins de la MH utilisés dans notre étude..... 33
Tableau 2- Les fonctions des astrocytes en condition physiologiques et au cours de la MH. 39

INTRODUCTION

I. La maladie de Huntington

Décrite pour la première fois en 1872 par George Huntington, la maladie de Huntington (MH) est une maladie neurodégénérative (MND) génétique touchant le système nerveux central (SNC) (Wexler et al., 2016). Elle est également appelée chorée de Huntington du fait des troubles moteurs ressemblant à une danse observés chez les patients. La MH est une maladie rare qui touche environ 10 à 12 individus pour 100 000 dans la population occidentale (Bates et al., 2015). L'âge d'apparition des premiers symptômes varie en fonction des patients mais ils apparaissent en moyenne vers l'âge de 45 ans (Ross et al., 2014). Certains patients atteints d'une forme juvénile de la MH peuvent développer les premiers symptômes avant l'âge de 20 ans (Quarrell et al., 2013). Le décès intervient entre 15 et 20 ans après la survenue des symptômes. A ce jour, seuls des traitements symptomatiques ciblant par exemple la chorée ou la dépression sont disponibles, dans le but d'améliorer la qualité de vie des malades (Roos, 2010; Coppin and Roos, 2017). Il n'existe pas de traitement curatif pour la MH.

1. Triade de symptômes

La MH est caractérisée par une triade de symptômes : des troubles moteurs progressifs ainsi que des désordres cognitifs et psychiatriques qui peuvent précéder les symptômes moteurs de plusieurs années (Bates et al., 2015). L'évolution de la MH peut être divisée en deux grandes phases. La période pré-symptomatique débute habituellement 10-15 ans avant l'apparition des symptômes moteurs caractéristiques de la maladie. Durant cette période, les patients sont tout d'abord indiscernables cliniquement des personnes non atteintes par la MH puis entrent dans une période prodromique caractérisée par l'apparition de changements subtils d'ordre cognitif, comportemental et parfois moteur (Bates et al., 2015) (**Figure 1**). Puis, la phase symptomatique, caractérisée par la survenue des symptômes moteurs, se déclare généralement entre 30 et 50 ans.

a. Troubles moteurs

Les troubles moteurs sont les symptômes caractéristiques de la MH et peuvent être divisés en deux phases au cours de la maladie (Bates et al., 2015). Tout d'abord, une phase d'hyperkinésie apparaît et est caractérisée par les mouvements choréiformes involontaires (**Figure 1**). Cette phase d'hyperkinésie apparaît tôt au cours de la maladie chez les patients adultes mais se stabilise et peut même diminuer dans les stades tardifs de la maladie (Ross et al., 2014). Des troubles des mouvements volontaires, incluant une incoordination, une bradykinésie (ralentissement des mouvements volontaires) et une rigidité, apparaissent ensuite (Bates et al., 2015). Ces troubles peuvent être à l'origine de problèmes de posture et d'équilibre entraînant des difficultés à la marche, à articuler puis à déglutir (Ross et al., 2014) (**Figure 1**). La chorée est plutôt rare dans la forme juvénile de la maladie dans laquelle les troubles des mouvements volontaires prédominent (Rosenblatt et al., 2006).

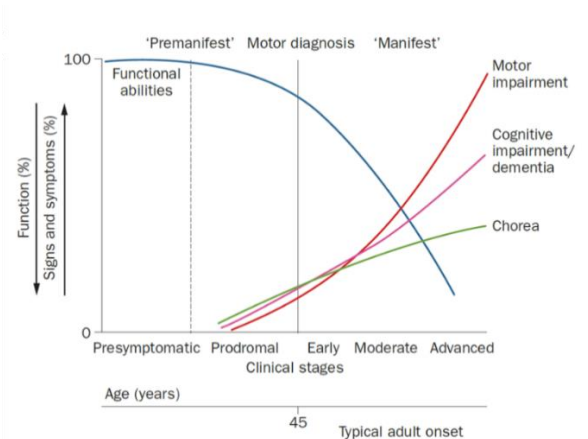


Figure 1- Progression des symptômes cliniques de la MH. La MH débute par une phase pré-symptomatique suivie d'une période prodromique durant laquelle des premiers symptômes subtils apparaissent. Les premiers symptômes moteurs sont diagnostiqués en moyenne vers l'âge de 45 ans et sont d'abord caractérisés par la chorée puis par la difficulté à effectuer des mouvements volontaires. Les troubles moteurs s'accompagnent généralement de symptômes cognitifs et psychiatriques. Adapté de (Ross et al., 2014).

b. Troubles cognitifs

Chez les patients atteints de la MH, les troubles cognitifs peuvent apparaître plusieurs années avant le diagnostic des signes moteurs (Papoutsi et al., 2014). Les fonctions cognitives déclinent progressivement et participent à la perte d'autonomie des patients (Ross et al., 2014). Dans la MH, les troubles cognitifs ont majoritairement un profil sous-cortical, c'est-à-dire qu'ils se caractérisent par un déficit des fonctions exécutives (Papoutsi et al., 2014), avec des troubles de l'attention, de la flexibilité mentale, de la planification et une désorientation dans l'espace. Des difficultés à interpréter les émotions peuvent également être, chez ces patients, responsables de malentendus dans les relations avec les autres au quotidien (Roos, 2010). L'apprentissage et la mémorisation de nouvelles informations sont aussi touchés, en particulier chez les enfants atteints d'une forme juvénile. Cependant, contrairement aux autres types de démences comme la maladie d'Alzheimer, la mémoire à court terme et le langage sont relativement préservés dans la MH (Ross et al., 2014).

c. Troubles psychiatriques

Les symptômes psychiatriques sont plus hétérogènes que les troubles moteurs et cognitifs et peuvent se déclarer 20 ans avant l'apparition des premiers symptômes moteurs, au cours de la phase pré-symptomatique (Ross et al., 2014). Il peut s'agir de dépression, d'anxiété, d'apathie ou encore d'irritabilité (Craufurd et al., 2001). La dépression est notamment très commune chez les patients atteints de la MH (plus de la moitié des patients, (Roos, 2010)).

Un état psychotique tel que la schizophrénie, un état maniaque ou des troubles obsessionnels, sont plus rares mais peuvent également apparaître dans la MH (Bates et al., 2015).

En plus des altérations du SNC, les patients peuvent également souffrir de symptômes périphériques tels que des troubles du métabolisme et de l'immunité, une perte de poids et une insuffisance cardiaque (van der Burg et al., 2009).

2. Cause et diagnostique de la maladie de Huntington

a. Mutation de la Htt

En 1993, la découverte du gène de la *Huntingtine (Htt)* situé sur le chromosome 4, a permis de mieux comprendre cette maladie (The Huntington's Disease Collaborative Research group, 1993). En effet, une mutation dans le premier exon du gène *htt* est responsable de cette maladie génétique. Cette mutation entraîne une augmentation du nombre de répétitions du codon CAG codant pour une queue polyglutamine (polyQ) dans la partie N-terminale de la protéine Htt. Le nombre de répétitions CAG est très variable et est compris entre 5 et 35 dans la population saine, avec une moyenne comprise entre 17 et 20 répétitions (Kremer et al., 1994). Lorsqu'une personne possède entre 36 et 39 répétitions de CAG, elle a un génotype intermédiaire avec possibilité de développer ou non la maladie (Myers, 2004). Au-dessus de 40 répétitions, la pénétrance est complète. Une forme juvénile de la MH a été observée dans 5 à 10% des cas chez des patients possédant plus de 60 répétitions de CAG (Quarrell et al., 2013).

La MH est une maladie autosomale dominante. Cependant, environ 10% des patients MH n'ont pas de parents malades. La majorité de ces patients reçoit l'allèle muté d'un parent asymptomatique ayant un nombre de CAG intermédiaire, c'est-à-dire entre 27 et 35 répétitions de CAG (Goldberg et al., 1993; Davis et al., 1994; Myers, 2004). En effet, plusieurs études ont montré un fort taux d'instabilité méiotique, particulièrement lors de la spermatogenèse, ce qui peut entraîner une augmentation du nombre de CAG dans la descendance (Trottier et al., 1994; Myers, 2004). Cette instabilité méiotique est également responsable du phénomène d'anticipation, caractérisé par une expansion du nombre de répétitions CAG au cours des générations successives et par conséquent un développement plus précoce de la maladie (Goldberg et al., 1993; Myers, 2004).

Une corrélation existe entre le nombre de répétition du codon CAG et l'âge d'apparition des premiers symptômes : un grand nombre de répétitions est associé à un début précoce de la maladie (Andrew et al., 1993; Ross and Tabrizi, 2011). Au contraire, la longueur de la queue polyQ aurait moins d'impact sur la progression de la maladie, suggérant un effet précoce du nombre de CAG sur la pathogenèse de la MH (Nopoulos, 2016). Cependant, le nombre de CAG n'explique que 70% de la variabilité de l'âge d'apparition des symptômes qui est également influencé par des facteurs génétiques et environnementaux (Ross and Tabrizi, 2011). Une étude d'association pangénomique (GWAS, genome-wide association study) a notamment montré que plusieurs gènes impliqués dans la réparation de l'ADN pouvaient modifier l'âge d'apparition des symptômes moteurs dans la MH (Holmans et al., 2017). Il a également été montré que l'activité sportive, le régime alimentaire, le stress et la caféine pouvaient influencer l'apparition des premiers symptômes de la MH (Mo et al., 2015).

b. Diagnostic de la MH

Le diagnostic de la MH se base sur l'histoire familiale (si disponible), le test génétique et l'évaluation clinique (Bates et al., 2015). La cause monogénique de la MH permet, si un risque de développer la maladie existe et si l'individu le souhaite, de détecter la présence ou non de la mutation dans le gène de la *Htt* par un test génétique avant même l'apparition des symptômes (Nance, 2017). Généralement, le diagnostic clinique de la MH repose sur l'apparition de signes moteurs anormaux chez une personne à risque (Ross et al., 2014). Des tests cliniques standards spécifiques de la MH sont utilisés pour aider à définir les différents symptômes et leur évolution au cours de la maladie. Le test le plus couramment utilisé est l'échelle appelée UHDRS (Unified Huntington's Disease Rating Scale). Ce test prend en compte quatre composantes majeures de la MH : motrice, cognitive, comportementale et les capacités fonctionnelles (Huntington Study Group, 1996).

L'identification de la mutation responsable de la MH par un test génétique prédictif avant l'apparition des premiers symptômes permet de mener des études de suivi longitudinal. Par exemple, l'étude TRACK-HD évalue des biomarqueurs pour les essais cliniques et suit sur trois ans à la fois des patients porteurs de la mutation mais asymptomatiques et des patients ayant déjà développés la maladie (Tabrizi et al., 2013). PREDICT-HD est une autre étude plus large incluant 800 patients asymptomatiques qui évalue des prédicteurs neurobiologiques en se basant sur des mesures cliniques, neuropsychologiques et d'imagerie pendant plus de 10 ans (Paulsen et al., 2014). L'ensemble de ces études permet d'identifier des biomarqueurs potentiels afin de suivre la progression de la pathologie. Certains de ces marqueurs apparaissent 10 à 15 ans avant le diagnostic moteur de la MH comme l'atrophie du striatum et la perte de matière blanche au niveau du corps calleux visible par imagerie par résonance magnétique (IRM), des changements de métabolites mesurés par spectroscopie à résonance magnétique ou encore l'apparition de certains troubles cognitifs et psychiatriques (Tabrizi et al., 2013; Paulsen et al., 2014; Sturrock et al., 2015). L'imagerie par tomographie par émission de positons (TEP) permet également de détecter des changements neuropathologiques jusqu'à 25 ans avant l'apparition des symptômes en utilisant par exemple un traceur de l'enzyme PDE10A (phosphodiesterase 10A) qui est enrichie dans les neurones striataux et diminuée dans la MH (Niccolini et al., 2015).

Des techniques ultrasensibles permettant de détecter de faibles quantités de protéines dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) ont récemment été développées et permettent de quantifier le niveau de *Htt* mutée (mHtt) qui reflèterait son niveau cérébral (Southwell et al., 2015a; Wild et al., 2015). La mHtt est détectable dans le LCR de patients asymptomatiques porteurs de la mutation et son niveau augmente avec la progression de la maladie. D'autres marqueurs permettant de suivre l'évolution de la maladie peuvent être mesurés dans le LCR comme les protéines Tau et NFL (neurofilament light) ou encore des marqueurs de l'inflammation tels que l'interleukine (IL) 6 ou la glycoprotéine YKL-40 (Rodrigues et al., 2016a, 2016b). Le niveau plasmatique de NFL serait corrélé à celui dans le LCR, ce qui permettrait de prélever seulement du sang et de mesurer NFL dont le niveau est plus élevé chez les individus porteurs de la mutation du gène *Htt* (Byrne et al., 2017). Le développement de marqueurs de la MH permet de suivre l'évolution de la pathologie mais

également d'évaluer l'efficacité de nouvelles pistes thérapeutiques même avant l'apparition de symptômes cliniques mesurables.

3. L'anatomopathologie de la maladie de Huntington

Sur le plan anatomopathologique, la MH est caractérisée par la dégénérescence préférentielle des neurones striataux mais aussi corticaux et la présence d'agrégats intranucléaires et intracytoplasmiques due à l'accumulation anormale de mHtt (voir paragraphe III.1). De plus, les cellules gliales réagissent et deviennent réactives au cours de la MH (voir le paragraphe II.2.b). Une échelle évaluant différents stades de la neuropathologie de la MH a été établie par Vonsattel (Vonsattel et al., 1985a). Cette échelle se base sur des critères macroscopiques et microscopiques et détermine 5 stades de 0 jusqu'à 4 en fonction de la sévérité de la pathologie. Les différents stades sont étroitement corrélés aux signes cliniques chez le patient.

a. L'atrophie du striatum

Bien que la mHtt soit exprimée ubiquitairement dans le cerveau, la MH est caractérisée par une atrophie précoce et préférentielle du striatum qui s'accompagne d'un élargissement des ventricules (Vonsattel et al., 1985a) (**Figure 2a**). Cette atrophie est notamment visible par IRM avant l'apparition des premiers symptômes moteurs (Tabrizi et al., 2009) (**Figure 2b**). Une atrophie des régions corticales (**Figure 2c**) et de la matière blanche est également présente précocement dans le cerveau des patients et évolue avec la pathologie (Rosas et al., 2006, 2008; Zhang et al., 2018a).

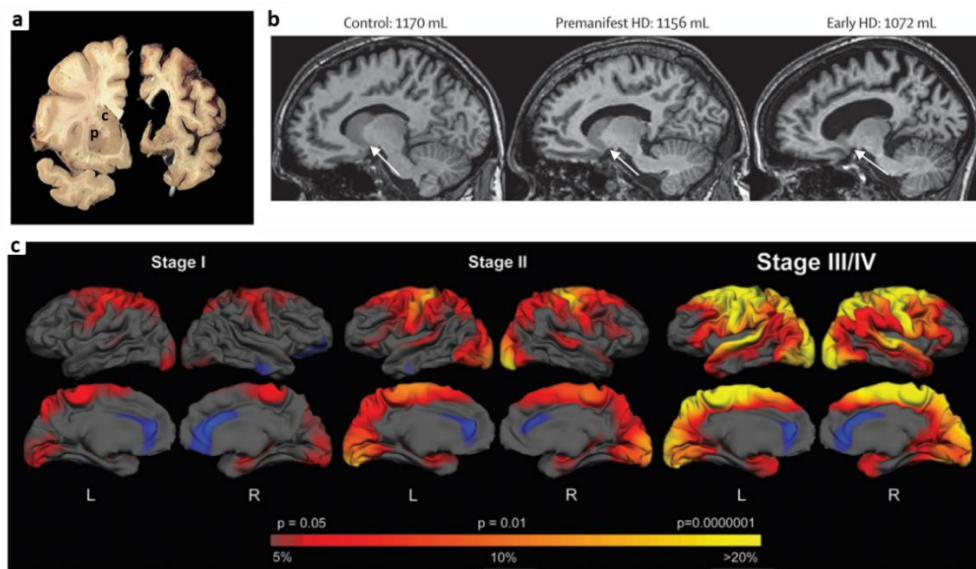


Figure 2- Atrophie du striatum et du cortex dans le cerveau d'un patient au cours de la MH. a-b. La MH est caractérisée par une atrophie préférentielle du striatum (noyau caudé (C) et putamen (P)) accompagnée d'un élargissement des ventricules visibles sur des cerveaux post-mortem de patients (a) ou par IRM (b). Cette atrophie commence avant l'apparition des premiers symptômes moteurs (b). Les volumes indiqués en b correspondent aux volumes du cerveau. Les flèches blanches indiquent le caudé putamen. (Tabrizi et al., 2009). c. Les patients MH présentent également une atrophie corticale progressive en fonction de l'évolution de la maladie. En haut, l'échelle de couleur correspond à la valeur de significativité pour la différence d'épaisseur de la région cérébrale entre les patients MH et leurs contrôles. L'échelle du bas représente le pourcentage de différence d'épaisseur des régions corticales entre les patients MH et leurs contrôles. (Rosas et al., 2008).

A des stades avancés de la maladie, des changements neuropathologiques interviennent dans d'autres structures cérébrales, notamment dans le globus pallidus, le thalamus, la substance noire, l'hypothalamus et le cervelet (Vonsattel et al., 1985a; Heinsen et al., 1999; Kassubek et al., 2005; Petersén and Björkqvist, 2006; Rüb et al., 2013).

b. La dégénérescence des neurones striataux

Le striatum appartient au circuit des ganglions de la base, également appelés noyaux gris centraux. Ce circuit est composé du striatum, du globus pallidus interne (GPi) et externe (GPe), du noyau sous-thalamique et de la substance noire (SN) (Morigaki and Goto, 2017) (**Figure 3a**). Le striatum constitue la voie d'entrée de cet ensemble de structures sous-corticales et est notamment impliqué dans le contrôle des mouvements moteurs (Balleine et al., 2009). Chez le primate, le striatum se divise en deux structures, le noyau caudé et le noyau putamen.

Le striatum reçoit des afférences glutamatergiques du cortex et du thalamus, des afférences dopaminergiques de la substance noire et des afférences cholinergiques ou GABAergiques des interneurons striataux (Morigaki and Goto, 2017). Les neurones épineux de taille moyenne (MSNs, medium spiny neurons ou SPNs, spiny projection neurons) constituent 90 à 95% des neurones striataux. Les SPNs sont des neurones inhibiteurs qui utilisent l'acide gamma-aminobutyrique (GABA) comme neurotransmetteur principal (Morigaki and Goto, 2017). Les SPNs sont divisés en deux sous-populations en fonction des récepteurs dopaminergiques qu'ils expriment et de leur projection axonale : les neurones de la voie directe (dSPNs) qui expriment les récepteurs dopaminergiques D1 ainsi que la substance P et la dynorphine comme co-neurotransmetteurs, et les neurones de la voie indirecte (iSPNs) exprimant les récepteurs D2 et l'encéphaline (Balleine et al., 2009; Eidelberg and Surmeier, 2011; Galvan et al., 2012). Les neurones dSPNs et iSPNs jouent des rôles complémentaires dans la sélection de l'action (**Figure 3b (1)**). Les dSPNs favorisent l'initiation du mouvement alors que les iSPNs exercent un effet inhibiteur sur cette initiation (Sepers and Raymond, 2014).

Les neurones SPNs sont les neurones striataux les plus vulnérables dans la MH alors que les interneurons cholinergiques et GABAergiques du striatum sont relativement épargnés (Morigaki and Goto, 2017). Au cours de la MH, la neurodégénérescence striatale est biphasique et suit les symptômes cliniques moteurs. En effet, l'hyperkinésie est corrélée à la dégénérescence précoce des neurones de la voie indirecte, iSPNs, qui entraîne une augmentation des mouvements involontaires (**Figure 3b (2)**) (Sepers and Raymond, 2014). Dans les stades plus évolués de la MH, la pathologie atteint les dSPNs. La dégénérescence de ces neurones de la voie directe corrèle avec la bradykinésie observée dans la MH correspondant à la perte de contrôle de l'exécution du mouvement (**Figure 3b(3)**) (Sepers and Raymond, 2014). Une forte innervation glutamatergique et dopaminergique au niveau de ces neurones SPNs pourrait contribuer à leur vulnérabilité préférentielle dans la MH (voir paragraphe I.3.b.v).

Dans le cortex, les neurones de la couche IV et V, qui sont des neurones glutamatergiques projetant dans le striatum, sont les plus vulnérables dans la MH (Hedreen et al., 1991).

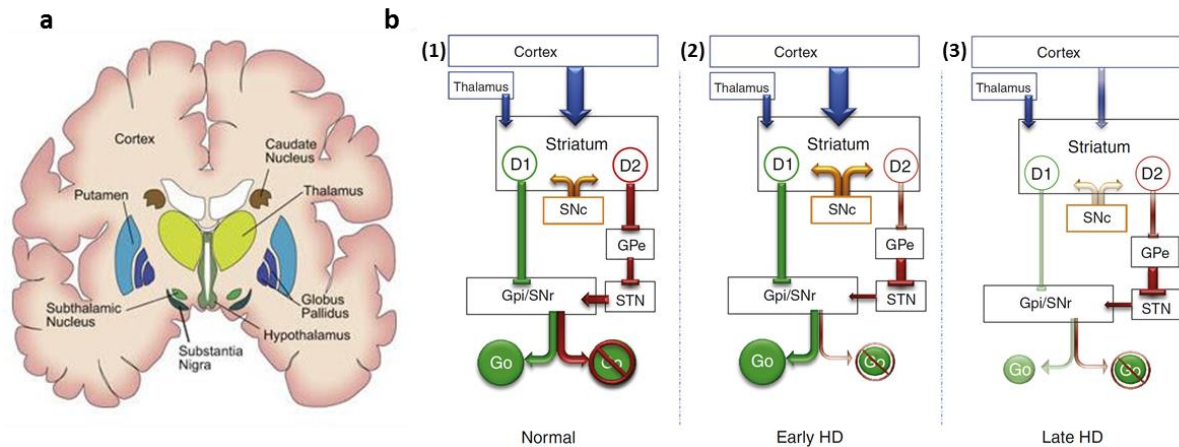


Figure 3- Le circuit des ganglions de la base au cours de la MH. a. Schéma des ganglions de la base (<https://science-naturalphenomena.blogspot.com/2009/05/basal-ganglia.html>) b. Dans le striatum, les neurones de la voie directe qui expriment le récepteur dopaminergique D1 favorisent les mouvements volontaires alors que les neurones de la voie indirecte exprimant les récepteurs D2 suppriment les mouvements involontaires (1). Au début de la MH, les neurones D2 dégèrent préférentiellement, ce qui entraîne l'apparition de mouvements involontaires (2). Au cours de la progression de la maladie, les neurones D1 dégèrent aussi, ce qui corréle avec l'apparition des bradykinésies (3). D1 : SPNs exprimant les récepteurs D1, D2 : SPNs exprimant les récepteurs D2, Gpi : globus pallidus interne, GPe : globus pallidus externe, SNc : Substance noire pars compacta, SNr : substance noire pars reticula, STN : noyau sous-thalamique. (Sepers and Raymond, 2014).

4. Physiopathologie de la maladie de Huntington : la huntingtine

a. La huntingtine possède de nombreux rôles physiologiques

i. Structure et distribution de la Htt

Le gène *htt* est composé de 67 exons et sa transcription produit deux transcrits d'ARNm (Saudou and Humbert, 2016). Le transcrit qui contient une région 3'UTR supplémentaire est enrichi dans le cerveau. De plus, les transcrits de la Htt peuvent être sujets à l'épissage alternatif donnant naissance à différents isoformes de la Htt (Hughes et al., 2014; Ruzo et al., 2015).

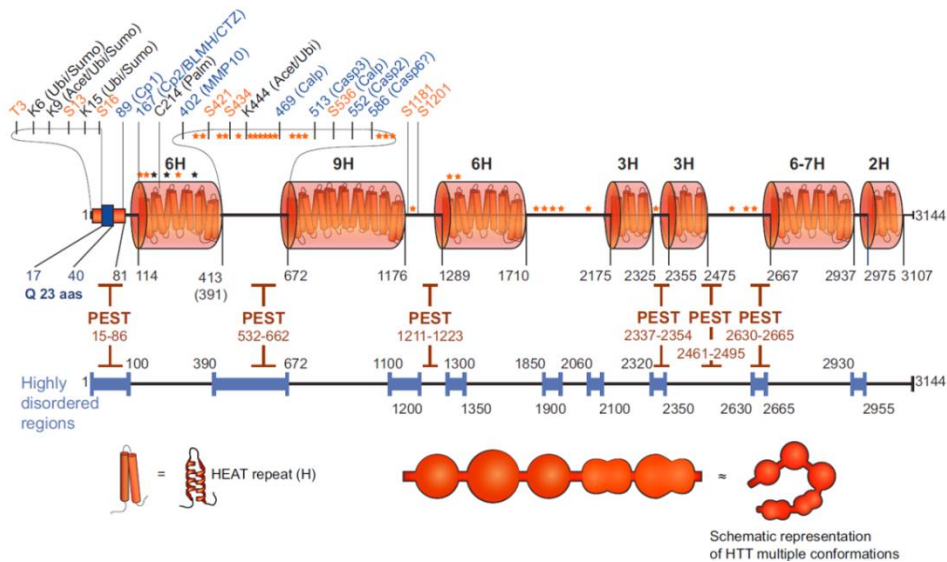
Le gène *htt* code pour la protéine Htt de 348 kDa. La Htt s'exprime dans l'ensemble du corps mais à des niveaux variables (Marques Sousa and Humbert, 2013). Le plus fort niveau d'expression de la Htt est observé dans le SNC. Dans le cerveau, la Htt s'exprime dans les neurones et les cellules gliales (Gutekunst et al., 1995; Trottier et al., 1995) (**Figure 4**). Dans la cellule, la Htt est majoritairement présente dans le cytoplasme mais peut se trouver dans le noyau et être transportée entre le noyau et le cytoplasme (DiFiglia et al., 1995; Hoogeveen et al., 1993; Kegel et al., 2002). Dans les neurones, la Htt peut être localisée à la fois au niveau des neurites et de la synapse. La Htt est associée à différentes organelles et structures cellulaires, comme la mitochondrie, les microtubules, la membrane plasmique et les endosomes (DiFiglia et al., 1995; Gutekunst et al., 1995; Trottier et al., 1995; Kegel et al., 2005).



Figure 4- Expression de la Htt dans les différents types cellulaires du SNC. D'après la banque RNAseq du laboratoire de Ben Barres (Zhang et al., 2014).

La Htt est composée de plusieurs domaines (Saudou and Humbert, 2016). Sa partie N-terminale correspond à l'exon 1 du gène *htt* qui contient la mutation pathologique dans la mHtt et a donc particulièrement été étudiée. Dans cette région, la queue polyglutamine (polyQ) est précédée par une séquence de 17 acides aminés qui fonctionne comme une séquence d'export nucléaire et est sujet à de nombreuses modifications post-traductionnelles influençant l'élimination et la localisation de la Htt (Saudou and Humbert, 2016) (**Figure 5**). A la suite de la queue polyQ se trouve un domaine riche en proline qui semble important pour les interactions protéiques (Harjes and Wanker, 2003). Le reste de la protéine est moins bien caractérisé mais il a été montré que la Htt contient plusieurs répétitions HEAT (pour Huntingtin, EF3 (elongation factor 3), PP2A (protein phosphatase 2A), TOR (target of rapamycin); protéines dans lesquelles sont retrouvées ces répétitions) également importantes pour les interactions protéiques et le transport intracellulaire. Ces domaines HEAT ont été notamment bien décrits dans la structure tridimensionnelle de la Htt, récemment découverte par cryon-microscopie électronique (Guo et al., 2018b).

La Htt fait l'objet de nombreuses modifications post-traductionnelles, telles que des sumoylations et des acétylations, importantes pour sa localisation, sa stabilisation et ses fonctions (Saudou and Humbert, 2016) (**Figure 5**). La Htt contient également plusieurs sites protéolytiques (PEST, séquence riche en proline (P), acide glutamique (E), sérine (S) et thréonine (T)) (**Figure 5**). Des sites de clivages sont présents à la fois sur la protéine Htt sauvage et sur la mHtt, mais l'activité protéolytique est augmentée dans la mHtt entraînant la production de fragments de mHtt (voir paragraphe III.1.b.i).



La Htt est également impliquée dans le transport cellulaire (Caviston and Holzbaur, 2009). En effet, la Htt régule le transport intracellulaire en interagissant à la fois avec les cargos (organelles, vésicules ou complexes de protéines transportées), les microtubules et les moteurs moléculaires comme la dynéine et la kinésine (Caviston et al., 2007; Colin et al., 2008)(**Figure 6**). Ces interactions sont majoritairement médiées par la protéine HAP1 (Htt-associated protein 1) (Engelender et al., 1997; Li et al., 1998; McGuire et al., 2006). Htt transporte de nombreuses organelles telles que les endosomes, les lysosomes (Caviston et al., 2011), les autophagosomes (Wong and Holzbaur, 2014) et des vésicules contenant par exemple le facteur neurotrophique BDNF (Brain neurotrophic factor) (Gauthier et al., 2004) ou des récepteurs au GABA (Twelvetrees et al., 2010). En participant au transport des vésicules au niveau pré et post-synaptique, la Htt jouerait un rôle dans de la synapse. En effet, la Htt participerait notamment à la formation des synapses excitatrices cortico-striatales (McKinstry et al., 2014).

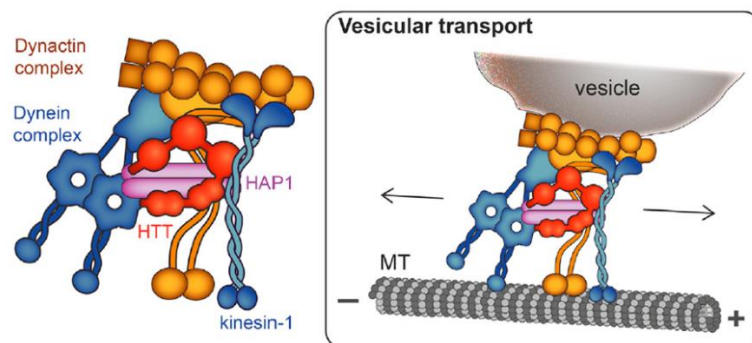


Figure 6- La protéine Htt est impliquée dans le transport vésiculaire. La Htt interagit avec les moteurs moléculaires Dynactine, Dynéine ou Kinésine via la protéine HAP1. (Saudou and Humbert, 2016).

Par son interaction avec de nombreux partenaires protéiques, la Htt sauvage est donc une protéine essentielle pour de multiples fonctions cellulaires comme la transcription et le transport intracellulaire mais également dans la division cellulaire, la morphogenèse, l'autophagie et la survie cellulaire (Cattaneo et al., 2005; Saudou and Humbert, 2016). L'expansion de la queue polyQ de la Htt va altérer son interactome et peut donc entraîner un défaut des fonctions assurées normalement par la Htt.

b. Mutations de la Huntingtine : gain ou perte de fonction ?

Les causes de la dégénérescence observée dans la MH ne sont pas encore complètement comprises, elles pourraient être dues à la perte de fonctions de la Htt, au gain de fonctions toxiques de la mHtt ou alors à la combinaison des deux.

La transmission autosomale dominante de la MH, c'est-à-dire qu'un seul allèle muté suffit à induire la pathologie, suggère que la mHtt acquiert des propriétés toxiques perturbant de nombreuses fonctions cellulaires. Ces fonctions toxiques peuvent impliquer la protéine mHtt entière mais également les fragments N-terminaux obtenus après clivage par différentes protéases. La nature exacte de la forme toxique de la mHtt, forme monomérique, oligomérique ou agrégée, est encore

controversée (voir paragraphe III.1.b) (Arrasate and Finkbeiner, 2012). De plus, il a été récemment montré qu'après clivage de la forme entière de la mHtt, la partie C-terminale pourrait être toxique en perturbant l'activité du réticulum endoplasmique (El-Daher et al., 2015). Enfin, l'ARN de la mHtt forme des structures stables en épingle à cheveux qui sont également toxiques (Bañez-Coronel et al., 2012). La mHtt, sous différentes formes, acquiert donc des fonctions toxiques responsables de la pathogenèse de la MH.

Néanmoins la contribution de la perte de fonctions de la Htt sauvage dans la pathogenèse de la MH ne peut pas être écartée. Chez des souris adultes, la délétion ou l'inactivation de la Htt sauvage entraîne une dégénérescence progressive similaire à celle observée dans la MH (O'Kusky et al., 1999; Dragatsis et al., 2000).

Au cours de la MH, la mHtt n'est donc plus capable d'exercer certaines fonctions cellulaires et acquiert de nouvelles fonctions toxiques. De nombreuses études chez les modèles animaux et chez les patients MH ont identifié plusieurs processus cellulaires altérés qui pourraient participer à la pathogenèse de la MH (Zuccato et al., 2010; Labbadia and Morimoto, 2013; Jimenez-Sanchez et al., 2017) (**Figure 7**).

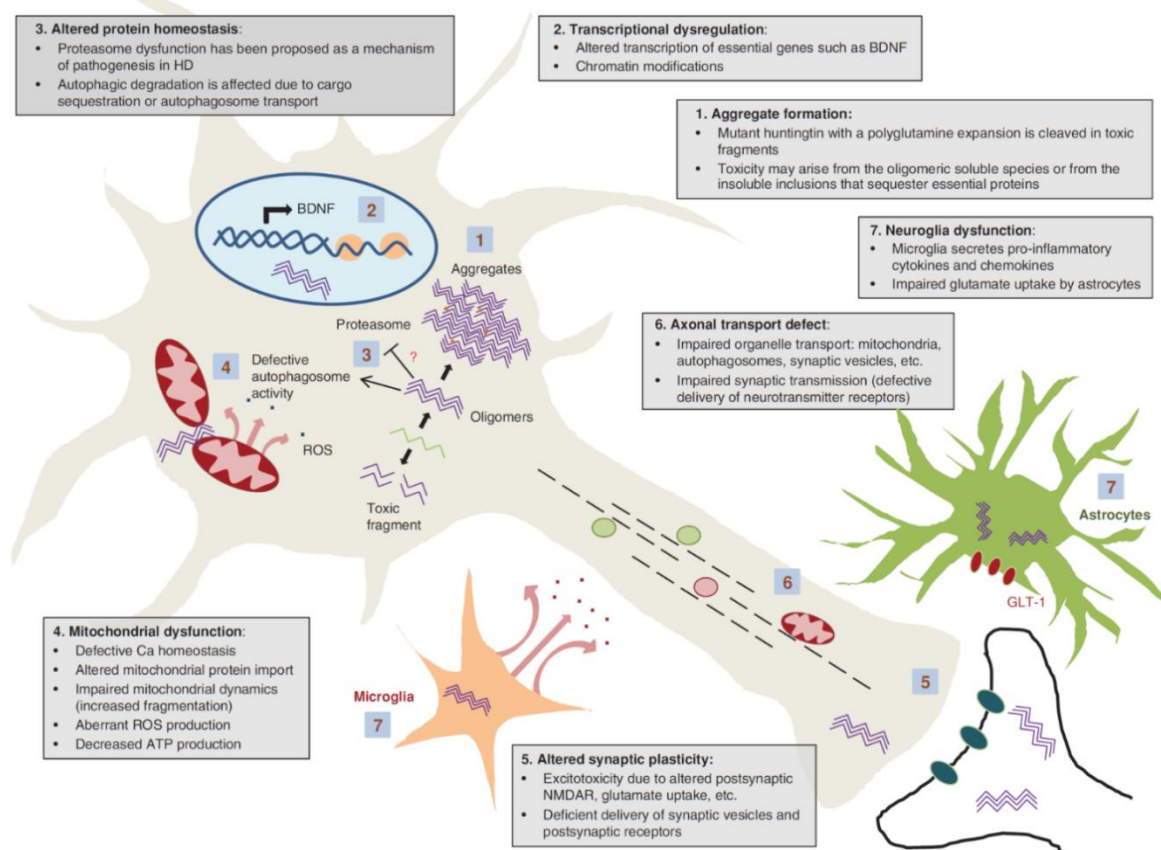


Figure 7- Principaux mécanismes de pathogenèse de la MH. Au cours de la MH, des agrégats de mHtt se forment dans la cellule (1) suggérant une altération des systèmes d'homéostasie des protéines (3). Plusieurs autres fonctions cellulaires sont défectueuses comme la transcription (2), les fonctions mitochondriales (4) entraînant un déficit du métabolisme énergétique, la transmission synaptique (5) responsable du phénomène d'excitotoxicité et le transport axonal (6). Les cellules gliales sont également impliquées dans la pathogenèse de la MH (7). (Jimenez-Sanchez et al., 2017).

i. Dérégulation transcriptionnelle

Au cours de la MH, une altération majeure de la transcription a été décrite (**Figure 7.2**). La mutation de la Htt change les interactions normales de la Htt avec des facteurs régulant la transcription, ce qui induit des défauts de transcription qui perturbent différents processus cellulaires en aval. C'est par exemple le cas avec le facteur CBP impliqué dans la prolifération et la survie cellulaire (Steffan et al., 2000; Nucifora et al., 2001; Sugars et al., 2004), avec le facteur PGC-1 α (Peroxisome proliferator-activating receptor G coactivator-1 α) provoquant des défauts de métabolisme énergétique dans la cellule (voir paragraphe I.3.b.iii) (Cui et al., 2006), ou encore avec Sp1 et son co-activateur TAFII130, ce qui affecte par exemple la transcription du gène codant pour le récepteur dopaminergique D2 et pourrait expliquer la vulnérabilité des neurones iSPNs (Dunah et al., 2002; Zhai et al., 2005).

L'expression de la mHtt perturbe également l'activité des histone acetyltransférases et induit ainsi une hypoacétylation des histones et une augmentation de la formation d'hétérochromatine (Steffan et al., 2001).

ii. Altération du transport intracellulaire

Le transport intracellulaire est également altéré dans la MH (Gunawardena et al., 2003; Trushina et al., 2004; Sinadinos et al., 2009; Wong and Holzbaur, 2014) (**Figure 7.6**). Cette altération est majoritairement due à un défaut d'interaction entre la mHtt et les moteurs moléculaires (Morfini et al., 2009; Twelvetrees et al., 2010; Wong and Holzbaur, 2014).

Une diminution de la dégradation par le système autophagie-lysosome est observée dans la MH et peut en partie s'expliquer par un défaut de transport des autophagosomes vers les lysosomes (Martin et al., 2015) (voir paragraphe III.3.b). Dans la MH, des dysfonctions synaptiques sont également liées à ce défaut de transport vésiculaire. Le transport axonal des vésicules contenant les neurotransmetteurs ou leurs récepteurs est nécessaire à la transmission synaptique. Par exemple, au cours de la MH, le transport des récepteurs GABAergiques de type A et glutamatergiques, AMPAR, est altéré et entraîne un défaut d'excitabilité synaptique (Twelvetrees et al., 2010; Mandal et al., 2011; Yuen et al., 2012).

Un dysfonctionnement du transport des mitochondries est également observé dans la MH entraînant un défaut de métabolisme énergétique dans la cellule (voir paragraphe I.3.b.iii).

iii. Déficit énergétique

Il a également été montré que des déficits du métabolisme énergétique dans le cerveau étaient impliqués dans la pathogenèse de la MH (Mochel et al., 2007; Mochel and Haller, 2011; Liot et al., 2017). D'importantes dérégulations des fonctions mitochondriales ont notamment été décrites dans la MH (**Figure 7.4**). Plusieurs mécanismes sous-tendant ces déficits au cours de la MH ont été proposés (Damiano et al., 2010; Labbadia and Morimoto, 2013; Jimenez-Sanchez et al., 2017).

Tout d'abord, la mHtt interfère avec le facteur de transcription PGC-1 α et entraîne ainsi un défaut d'expression des gènes impliqués dans la biogenèse mitochondriale (Cui et al., 2006; Weydt et al., 2006; Costa and Scorrano, 2012). De plus, l'association de la mHtt avec la membrane externe des mitochondries entraîne une déplétion des réserves d'ATP (Adénosine triphosphate) intracellulaires,

une augmentation de la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS) ainsi qu'un défaut de la signalisation calcique (Panov et al., 2002; Choo et al., 2004; Mochel and Haller, 2011). Le transport antérograde et rétrograde des mitochondries est également altéré par la mHtt, ce qui réduit notamment l'apport énergétique via les mitochondries au niveau des synapses (Orr et al., 2008a). Des défauts de fragmentation des mitochondries sont aussi observés (Song et al., 2011).

L'ensemble de ces observations démontrent l'implication d'un déficit énergétique dans la pathogenèse de la MH. Les altérations du fonctionnement des mitochondries sont également à l'origine d'un stress oxydatif décrit dans le cerveau de modèle murin et de patients de la MH (Perluigi et al., 2005; Stoy et al., 2005; Sorolla et al., 2008).

iv. Diminution du support trophique : le BDNF

Au cours de la MH, il a été montré que l'expression de gènes enrichis dans le striatum est particulièrement diminuée chez les modèles murins et les patients de la MH (Desplats et al., 2006; Cha, 2007; Mazarei et al., 2010; Seredenina and Luthi-Carter, 2012). Par exemple, dans le cerveau de modèles murins et de patients MH, l'expression du facteur neurotrophique BDNF est diminuée dans le cortex et celle de son récepteur TrkB (Tropomyosin receptor kinase B) est diminuée dans le striatum (Ginés et al., 2006; Zuccato et al., 2010). La Htt sauvage séquestre le répresseur REST/NRSFs (repressor element-1 transcription/neuron restrictive silencer factors) dans le cytoplasme et l'empêche de réprimer la transcription des gènes cibles dans le noyau (Zuccato et al., 2003). La mHtt ayant une affinité réduite avec REST/NRSF, ce dernier peut alors entrer dans le noyau et se fixer sur les séquences RE1/NRSE (Repressor element 1/neuron-restrictive silencer element) présentes au niveau du promoteur des gènes cibles comme BDNF et ainsi réprimer son expression au cours de la MH (Rigamonti et al., 2007; Zuccato et al., 2007).

Le BDNF est majoritairement synthétisé au niveau des neurones corticaux et transmis au striatum via des vésicules transportées le long des axones (Borrell-Pagès et al., 2006). En plus de diminuer son expression, la mHtt inhibe également le transport du BDNF le long des axones corticaux et sa libération dans le striatum, ainsi que le transport rétrograde de son récepteur TrkB au niveau des neurones striataux (Gauthier et al., 2004; Liot et al., 2013).

La réduction du niveau de BDNF dans le striatum pourrait participer à la dégénérescence des neurones SPNs au cours de la MH (**Figure 8**, violet) (Sepers and Raymond, 2014). En effet, chez la souris, la délétion ou l'inhibition de BDNF dans le cortex ou dans la substance noire et de TrkB dans le striatum entraîne des déficits moteurs, une dégénérescence neuronale et une atrophie striatale similaire à celle observée dans la MH (Li et al., 2012). Au contraire, la surexpression de BDNF dans des modèles transgéniques de la MH, R6/1 et YAC128, améliore les performances motrices de ces souris, diminue les dysfonctions neuronales et prévient l'atrophie du striatum (Gharami et al., 2008; Xie et al., 2010).

v. Transmission synaptique et excitotoxicité

Dans les années 80, l'observation d'une neurodégénérescence striatale suite l'injection d'un agoniste du glutamate chez le rat a été la première évidence de la contribution du phénomène d'excitotoxicité dans la MH (Beal et al., 1986). L'excitotoxicité correspond à l'exposition excessive des neurones au glutamate entraînant l'altération de l'homéostasie et la signalisation calcique. Dans la MH, les SPNs semblent particulièrement sensibles face à la l'excitotoxicité glutamatergique (Levine et al., 1999; Cowan and Raymond, 2006; Milnerwood and Raymond, 2010).

L'expression et la signalisation anormales des récepteurs glutamatergiques pourraient contribuer à cette altération de la transmission glutamatergique (Joshi et al., 2009 ; Raymond et al., 2017) (**Figure 8**, vert). Les récepteurs ionotropiques glutamatergiques NMDAR (N-méthyl-D-aspartate receptor) sont majoritairement impliqués dans ce phénomène d'excitotoxicité. La composition des différentes sous-unités des récepteurs NMDAR peuvent être à l'origine de la sensibilité glutamatergique accrue dans la MH (Cepeda et al., 2001; Zeron et al., 2002; Fan et al., 2007). En effet, les NMDAR contenant la sous-unité GluN2A seraient impliqués dans des fonctions liées à la survie alors que ceux composés de la sous-unité GluN2B auraient des effets plus néfastes et favoriseraient l'excitotoxicité (Zeron et al., 2002; Liu et al., 2007). La sous-unité GluN2B est majoritairement exprimée dans le striatum par rapport à GluN2A, ce qui pourrait notamment expliquer la vulnérabilité des SPNs (Küppenbender et al., 2000). De plus, au cours de la MH, la mHtt semble également affecter le transport des récepteurs NMDAR et la balance entre les récepteurs synaptiques et extra-synaptiques dans les neurones striataux (Fan et al., 2007; Okamoto et al., 2009; Milnerwood and Raymond, 2010). L'activation des récepteurs NMDAR synaptiques favorise la survie cellulaire alors que la stimulation des récepteurs extra-synaptiques entraîne plutôt la mort cellulaire (Hardingham and Bading, 2010). Les récepteurs extra-synaptiques contiennent plus de sous-unités GluN2B que les récepteurs synaptiques (Steigerwald et al., 2000; Jocoy et al., 2011). De plus, une diminution de l'expression des récepteurs métabotropiques aux endocannabinoïdes CB1 (CB1R) est également observée précocement chez les patients et les modèles murins de la MH (Glass et al., 2000; Dowie et al., 2009; Van Laere et al., 2010) (**Figure 8**, rouge). CB1R régule la libération des neurotransmetteurs excitateurs au niveau pré-synaptique et notamment la transmission glutamatergique au niveau de l'axe cortico-striatal (Sepers and Raymond, 2014).

Le phénomène d'excitotoxicité peut également impliquer d'autres types cellulaires que les neurones et être la conséquence d'un défaut de recapture et de clairance du glutamate par les astrocytes (voir paragraphe II.2.a.i). Une altération de la concentration et du temps de présence du glutamate au niveau de la synapse cortico-striatale pourrait alors entraîner une stimulation excessive des neurones SPNs par le glutamate et ainsi les rendre plus vulnérables (Ehrlich, 2012; Sepers and Raymond, 2014).

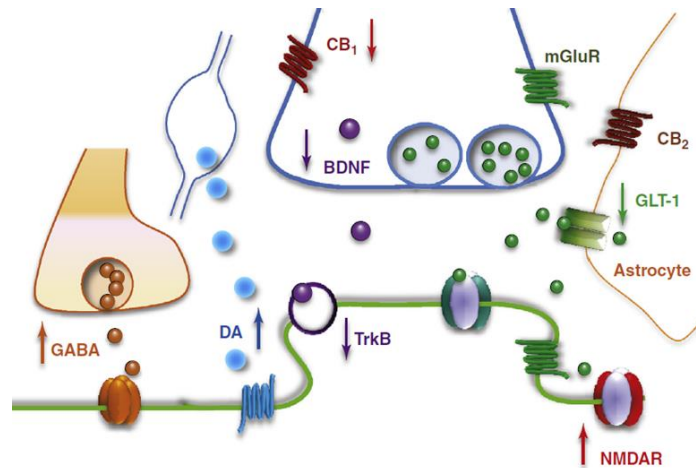


Figure 8- Altérations de l'axe cortico-striatal au cours de la MH. Un dysfonctionnement de l'ensemble des neurotransmetteurs et neuromodulateurs au niveau de l'axe cortico-striatal pourrait expliquer la dégénérescence des neurones striataux GABAergiques dans la MH. Les flèches vers le bas indiquent une diminution au niveau de la synapse et vers le haut indiquent une augmentation. CB1/2 : récepteurs aux endocannabinoïdes, mGluR : récepteur métabotrope du glutamate, GLT-1 : transporteur du glutamate, NMDAR : récepteur au glutamate, TrkB : récepteur du BDNF, DA : Dopamine. (Sepers and Raymond, 2014).

De plus, une augmentation du niveau de dopamine et de ses enzymes de biosynthèse a également été observée dans le cerveau post-mortem de patients MH à un stade précoce de la maladie (Eidelberg and Surmeier, 2011). Les récepteurs dopaminergiques D2 ont plus d'affinité pour la dopamine que les récepteurs D1. Une forte libération de dopamine par les axones de la substance noire entrainerait donc une activation accrue des récepteurs D2 qui résulterait en une inactivation des neurones iSPNs et une dégénérescence de ces derniers (Sepers and Raymond, 2014) (**Figure 8**, bleu).

De nombreuses fonctions, telles que la transcription, le transport intracellulaire, le métabolisme énergétique et la transmission glutamatergique, sont donc altérées au cours de la MH, notamment dans les neurones striataux, et peuvent être à l'origine de la pathologie (**Figure 7**). D'autres processus cellulaires sont également impactés dans la MH et les mécanismes sont développés dans des parties plus spécifiques de ce manuscrit comme l'homéostasie protéique (voir paragraphe III). Les cellules gliales, et notamment les astrocytes, sont aussi impliquées dans ces dysfonctions observées dans la MH comme dans l'altération du métabolisme du cholestérol (CH) (voir paragraphe II.2.a.ii) et le phénomène de neuroinflammation (voir paragraphe II.2.b). L'étude de ces processus cellulaires altérés au cours de la MH permet le développement d'approches thérapeutiques spécifiques ciblant ces fonctions défectueuses.

c. Pistes thérapeutiques

A ce jour, il n'existe aucun traitement curatif de la MH. Seuls des traitements symptomatiques contre la chorée ou les troubles psychiatriques sont disponibles pour les patients (Ross and Tabrizi, 2011). Parmi les anti-choréiques, la principale molécule donnée est la tétrabenazine qui est un inhibiteur du transporteur vésiculaire de la DA VMAT2, réduisant ainsi la quantité de dopamine libérée au niveau pré-synaptique (Scott, 2011). Les symptômes psychiatriques, qui sont souvent les plus handicapants pour les patients, sont traités avec les médicaments standards utilisés chez les patients non MH comme des neuroleptiques ou des antidépresseurs (Bates et al., 2015). Dans la MH, une prise en charge multidisciplinaire est également nécessaire pour essayer de préserver le plus longtemps possible la qualité de vie du patient. Cette prise en charge implique par exemple des orthophonistes, psychologues ou encore des assistantes sociales (Bates et al., 2015).

Ces 20 dernières années, un peu moins de 100 essais cliniques, testant environ 40 molécules différentes ont été réalisés pour la MH mais très peu (3,5%) ont donné des résultats assez satisfaisants pour poursuivre les études (Travessa et al., 2017). Il y a actuellement 42 essais cliniques actifs ou en cours de recrutement pour la MH (d'après ClinicalTrials.gov). Les nouvelles pistes thérapeutiques développées ciblent soit des mécanismes cellulaires spécifiques altérés dans la MH (voir paragraphe I.3.b), soit directement la mHtt en diminuant son niveau d'expression (Caron et al., 2018; McColgan and Tabrizi, 2018) (**Figure 9**).

i. Cibler les voies de pathogenèse de la maladie de Huntington

De nombreux essais cliniques ciblent les fonctions cellulaires qui participeraient à la pathogenèse de la MH (**Figure 9**) (pour des revues détaillées voir (Caron et al., 2018; McColgan and Tabrizi, 2018)). Par exemple, parmi ces essais, certains se sont intéressés au coenzyme Q10 et à la créatine afin de contrer les déficits du métabolisme énergétique (McGarry et al., 2017; Hersch et al., 2017) ou aux inhibiteurs d'histone acétylase afin de prévenir les défauts transcriptionnels (Mielcarek et al., 2013).

D'autres stratégies thérapeutiques ciblent les facteurs neurotrophiques comme le BDNF et le CNTF (Ciliary neurotrophic factor). Le CNTF a notamment montré un fort potentiel thérapeutique dans plusieurs modèles de souris de la MH et a été testé dans un essai clinique (Bloch et al., 2004). Pour délivrer le CNTF directement dans le SNC, des cellules encapsulées produisant le CNTF ont d'abord été utilisées et testées en clinique puis le transfert de gènes par des vecteurs lentiviraux a été développé (Azzouz et al., 2004; Bachoud-Lévi et al., 2000; Bloch et al., 2004; Zala et al., 2004). Dans notre laboratoire, une étude a notamment montré que la surexpression de CNTF dans le striatum par des vecteurs lentiviraux avait un effet protecteur dans des modèles de MH et induisait également une forte réactivité astrocytaire (Escartin et al., 2006, 2007). Le CNTF, en activant les astrocytes, améliorerait notamment la recapture du glutamate par les astrocytes, ce qui participerait à son effet neuroprotecteur (Escartin et al., 2006; Beurrier et al., 2010). Ces résultats montrent qu'il serait intéressant de cibler les autres types cellulaires que les neurones qui dégénèrent, et notamment les astrocytes qui, en condition physiologique, sont essentielles au bon fonctionnement neuronal (voir paragraphe II.1.b).

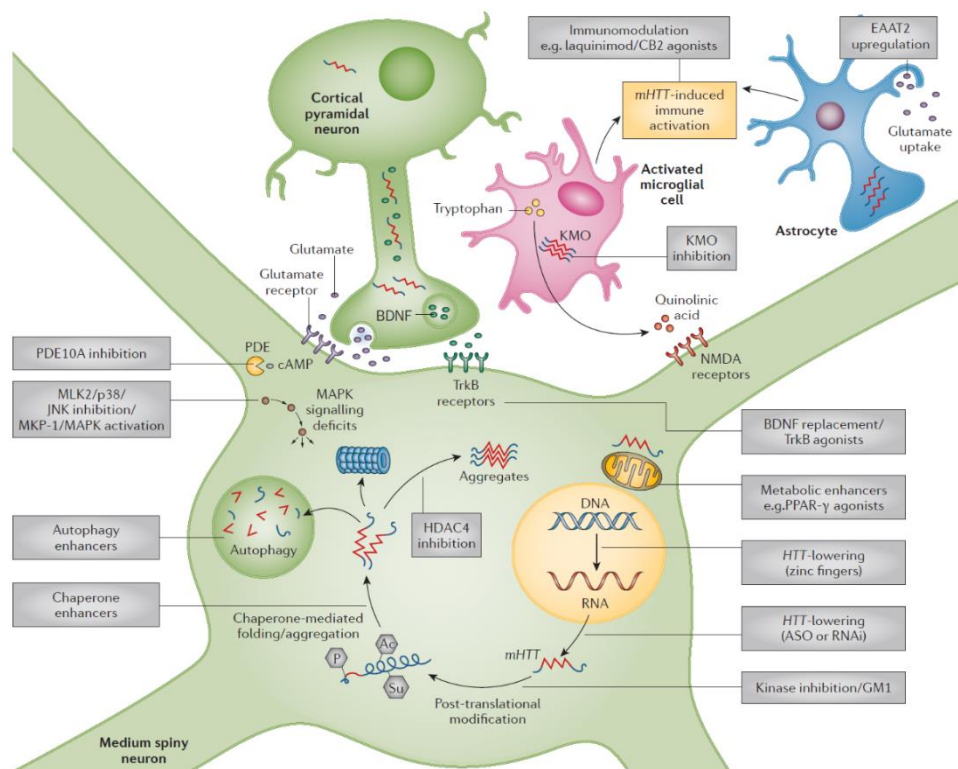


Figure 9- Principales cibles thérapeutiques pour la MH. De nombreuses fonctions cellulaires altérées dans la MH sont des cibles thérapeutiques potentielles. Certaines de ces cibles ont fait ou font l'objet d'essais cliniques, d'autres sont encore au stade de recherche pré-clinique. (Bates et al., 2015).

Des molécules thérapeutiques ciblant l'inflammation ont notamment été développées. La majorité de ces composés a pour but de réduire la neuroinflammation (Garcia-Miralles et al., 2016; Southwell et al., 2015b). Par exemple, un essai clinique en cours (Legato-HD) teste un immunomodulateur appelé Laquinimod (Caron et al., 2018). Ce composé agit sur les cellules gliales en diminuant l'activation de la voie NFκB dans les astrocytes et la libération de cytokines par la microglie (Brück et al., 2012; Mishra et al., 2014). Le laquinimod agit également directement sur les neurones en réduisant le processus d'apoptose. Il diminue ainsi la libération de cytokines pro-inflammatoires par les cellules gliales et favorise la survie neuronale. Ce composé est actuellement en phase II et les premières données révèlent que les scores moteurs évalués par l'UHDRS ne sont pas améliorés mais que l'atrophie cérébrale est réduite.

Enfin, les mécanismes de dégradation de la protéine mHTT sont également des cibles intéressantes (Boland et al., 2018; Harding and Tong, 2018). Une des approches possibles est l'activation des protéines chaperonnes par des composés comme le geldanamycine ou le 17-AAG, qui augmentent l'expression des chaperonnes comme Hsp70 et Hsp40, ou directement par surexpression des chaperonnes (Sittler et al., 2001; Labbadia et al., 2012). Ces approches ont montré leur efficacité dans des modèles cellulaires et murins de la MH (Boland et al., 2018) (voir paragraphe III.4). Une autre stratégie peut être l'activation directe du protéasome ou de l'autophagie, les deux processus majeurs de protéolyse cellulaire (voir paragraphe III.2 et 3). L'augmentation de l'autophagie par différents composés améliore le phénotype pathologique dans plusieurs modèles

cellulaires, de drosophiles, de poissons et de souris de la MH (Hochfeld et al., 2013). Parmi les composés activant l'autophagie, le rilménidine est actuellement testé chez des patients MH au Royaume-Uni (Underwood et al., 2017).

ii. Cibler la mHtt

L'approche thérapeutique la plus prometteuse dans la MH est de cibler directement la cause de la pathologie, c'est-à-dire l'ADN ou l'ARN de la mHtt afin de diminuer son expression (Wild and Tabrizi, 2017). Plusieurs stratégies sont développées : cibler l'ARN de la mHtt grâce à l'utilisation d'oligonucléotides antisens (ASO) ou d'ARN interférent (ARNi), ou utiliser des complexes en doigt de zinc synthétiques qui suppriment la transcription de la mHtt (Caron et al., 2018) (**Figure 10**). Ces approches ont été testées dans des modèles rongeurs de la MH et ont amélioré les symptômes et la neuropathologie (Drouet et al., 2009; Kordasiewicz et al., 2012; Stanek et al., 2014; Cambon et al., 2017). La technique d'ARNi permet la dégradation de l'ARN cible par le complexe cytoplasmique RISC (RNA-induced silencing complex). La méthode pour délivrer l'ARNi dans le cerveau est invasive car elle nécessite une injection intracrânienne dans le striatum, mais une seule injection suffit pour un effet à long terme (Wild and Tabrizi, 2017). Les ASO induisent la dégradation de l'ARN cible par l'enzyme RNase. L'administration de ces ASO se fait par injection intrathécale mais les ASO sont dégradés au cours du temps, des injections répétées sont donc nécessaires pour avoir un effet à long terme (Geary et al., 2015). Dans la MH, ces ASO peuvent être non sélectifs, c'est-à-dire que l'ARN de la Htt sauvage va être dégradé en même temps que l'ARN de la mHtt, ou sélectifs en ciblant des polymorphismes associés uniquement à la mHtt (Caron et al., 2018).

Les résultats dans les modèles animaux de la MH montrent une réduction jusqu'à 80% du niveau d'ARN de la Htt avec des ASO, et supportent donc leur développement en clinique (Kordasiewicz et al., 2012). Le laboratoire pharmaceutique Ionis a développé et testé en clinique les premiers ASO non sélectifs contre la Htt. Les premiers résultats sont encourageants puisqu'une diminution de la mHtt d'environ 40% est mesurée dans le LCR chez des patients traités pendant 3 mois, sans effets indésirables majeurs (Mestre, 2018). Le laboratoire Roche, désormais responsable du développement du médicament, a annoncé que l'essai passerait directement en phase III pour lequel le recrutement est en cours. Un autre laboratoire, Wave Biosciences, a récemment commencé le recrutement de participants pour un essai clinique de phase Ib/IIa pour tester des ASO sélectifs de la mHtt (Caron et al., 2018).

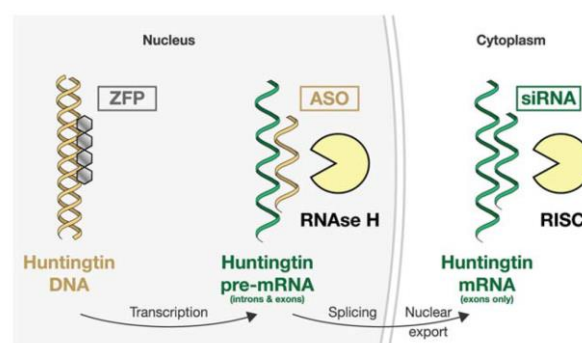


Figure 10- Principales stratégies thérapeutiques permettant la diminution de l'expression de la mHtt. (Wild and Tabrizi, 2017)

Une autre approche possible est l'utilisation de la technologie CRISPR-Cas9 (Wild and Tabrizi, 2017). Cette stratégie est très prometteuse puisqu'elle permettrait d'inactiver totalement et sélectivement la mHtt (Malkki, 2016; Shin et al., 2016; Vachey and Déglon, 2018). Un ARN guide permet de cibler spécifiquement la séquence ADN de la mHtt dans laquelle la nucléase Cas9 effectue une cassure double brin. Cette stratégie a montré son efficacité en améliorant les troubles moteurs et les caractéristiques neuropathologiques dans plusieurs modèles cellulaires et animaux de la MH (Kolli et al., 2017; Monteys et al., 2017; Xu et al., 2017; Yang et al., 2017). Contrairement aux techniques précédentes qui diminuent partiellement la mHtt, la technique de CRISPR-Cas9 inactive complètement la mHtt. Des études pré-cliniques complémentaires sont donc nécessaires afin de s'assurer de la spécificité et la faisabilité de cette approche en clinique.

5. Modèles murins de la maladie de Huntington

Les premiers modèles animaux de la MH ont été générés par injection de toxines ciblant les fonctions mitochondriales ou la transmission glutamatergique déjà décrites comme étant altérées dans la MH (Jenkins et al., 1993; Brouillet et al., 1995, 1999). L'injection striatale d'agonistes des récepteurs au glutamate NMDAR, comme l'acide quinolinique, induit une excitotoxicité et la mort sélective des neurones GABAergique SPNs, les neurones les plus atteints dans la MH (Coyle and Schwarcz, 1976; Schwarcz et al., 1984). Des toxines mitochondriales, comme le malonate ou l'acide 3-nitropropionique, qui entraînent la mort cellulaire en altérant le métabolisme énergétique cellulaire, peuvent également être utilisées (Brouillet et al., 1999). Cependant, ces modèles présentent plusieurs limites dont la principale est la nature aiguë de la lésion qui s'oppose à la progression lente de la MH chez l'homme.

La découverte de la mutation dans le gène *Htt* en 1993, a permis le développement de plusieurs modèles génétiques de la MH (Menalled and Chesselet, 2002). Depuis, de nombreux modèles ont été développés dans différentes espèces comme chez la souris, le rat, le poisson, la drosophile, l'oiseau, le cochon, le mouton et les primates non-humains (Pouladi et al., 2013). Les rongeurs, et particulièrement les souris, sont les animaux les plus utilisés. Plus de vingt modèles de rongeurs de la MH ont déjà été créés. Je me focaliserai sur les modèles murins, et plus particulièrement sur les deux modèles utilisés dans notre étude (**Tableau 1**).

a. Les principaux modèles murins de la maladie de Huntington

Plusieurs modèles murins génétiques de la MH ont été générés suivant différents critères : l'expression de la protéine mHtt entière ou seulement d'un fragment, le nombre de répétitions CAG incorporés avec ou non l'interruption par des codons CAA codant aussi pour la glutamine mais présentant moins d'instabilité méiotique, la nature de la séquence (ADN complémentaire ou ADN génomique contenant les introns et les séquences de régulations), l'utilisation de la séquence humaine ou endogène murine, ou encore le promoteur utilisé pour contrôler l'expression de la mHtt (Pouladi et al., 2013). Il existe trois grandes catégories de modèles murins génétiques de la MH : les modèles transgéniques exprimant un fragment de la mHtt humaine, les modèles transgéniques

exprimant la forme entière de la mHtt humaine et les modèles appelés “Knock-in” (KI) générés par l’insertion de la mutation directement dans le gène *htt* de la souris (Pouladi et al., 2013).

Les modèles transgéniques exprimant seulement un fragment de la mHtt ont été les premiers à être développés avec les souris R6/1 et R6/2 (Mangiarini et al., 1996). Ces souris expriment l’exon 1 de la mHtt humaine avec 116 et 144 répétitions CAG respectivement. Le modèle N171-82Q est un autre modèle transgénique exprimant les 171 premiers acides aminés de la mHtt humaine avec 82 répétitions CAG sous le contrôle du promoteur prion murin (Schilling et al., 1999). Ces modèles transgéniques exprimant une forme tronquée de la mHtt humaine développent précocement et rapidement les symptômes de la MH tels que les troubles moteurs et cognitifs, la perte de poids et la réduction de l’espérance de vie (Pouladi et al., 2013). Ces symptômes cliniques s’accompagnent de la présence d’agrégats nucléaires et cytoplasmiques de mHtt dans le cerveau. Ces modèles correspondent plutôt à une forme juvénile de la maladie. Dans ces modèles exprimant seulement un fragment de la mHtt, il manque une partie C-terminale de la protéine dans laquelle sont présents des sites de modifications post-traductionnelles comme des sites de phosphorylation ou de clivage importants pour beaucoup d’interactions protéiques et de fonctions de la mHtt (Saudou and Humbert, 2016).

Dans les modèles transgéniques exprimant la forme entière, la séquence de la mHtt humaine est exprimée grâce à l’utilisation de chromosome artificielle de levure (YAC, yeast artificial chromosome) ou de bactérie (BAC, bacterial artificial chromosome) (Hodgson et al., 1999; Gray et al., 2008a). La séquence exprimée contient à la fois les exons, les introns et les séquences régulatrices permettant une expression similaire à la protéine mHtt humaine. Parmi ces modèles, les plus étudiés sont les souris YAC128, exprimant la mHtt avec 128 répétitions CAG et les souris BACHD (Slow et al., 2003; Gray et al., 2008a). Les souris BACHD expriment la mHtt avec 97 répétitions de CAG et CAA permettant une meilleure stabilité de la mutation dans la descendance (Gray et al., 2008a). Ces modèles développent des troubles moteurs et cognitifs ainsi qu’une atrophie striatale et corticale plus progressive que les souris exprimant une forme tronquée de la mHtt. Ces modèles exprimant la protéine entière permettent notamment d’étudier les mécanismes de clivage de la mHtt ainsi que les stades plus précoces de la pathogenèse (Slow et al., 2003; Gray et al., 2008a).

Enfin, les modèles KI sont générés par l’insertion de l’expansion CAG/CAA dans le gène *Htt* de la souris (Menalled, 2005). Il existe différentes lignées de souris KI avec un nombre de répétitions CAG variables de 50 à 175 (Menalled et al., 2003; Hickey et al., 2008; Menalled, 2005; Menalled et al., 2012). La principale caractéristique de ces souris KI est l’apparition très progressive des symptômes, similaire à ce qu’on observe chez les patients (Menalled, 2005).

Le modèle Hdh140, qui reproduit la base génétique et la progression lente de la MH, est un des deux modèles utilisés dans cette étude et est développé dans le prochain paragraphe (**Tableau 1**).

b. Les modèles murins utilisés dans l'étude

i. Les souris Knock-in Hdh140

Dans ces modèles KI, l'insertion des séquences humaines de répétitions de CAG dans l'exon 1 du gène de la Htt murine permet donc que la mHtt soit sous contrôle du promoteur endogène (Menalled, 2005). La mHtt s'exprime, par conséquent, de la même manière que la Htt murine endogène. Ces souris peuvent être hétérozygotes ou homozygotes pour la mutation. Les souris KI hétérozygotes miment génétiquement mieux les patients MH majoritairement hétérozygotes pour la mutation dans le gène de la Htt.

Menalled et collaborateurs ont développé et caractérisé un modèle KI avec 140 répétitions CAG, les souris Hdh140. Nous utilisons ces souris dans notre étude (Menalled et al., 2003).

A 1 mois, ces souris présentent une hyperactivité locomotrice et un comportement de rearing (redressement sur ses pattes arrières) exacerbé. Cette hyperactivité disparaît très vite et à l'inverse, une légère hypoactivité motrice est observée dès l'âge de 4 mois. Cette diminution de l'activité motrice progresse et se confirme à 12 mois avec une perte de force, une marche anormale et un déséquilibre (Menalled et al., 2003). Un déficit au test du rotarod est également observé chez ces souris dès 9 mois.

D'un point de vue anatomopathologique, des agrégats de mHtt commencent à apparaître dans le striatum dès l'âge de 2 mois. A 4 mois, les agrégats de mHtt sont présents dans tout le striatum, puis s'étendent progressivement à d'autres structures et apparaissent dans le noyau accumbens, le cortex, l'hippocampe et le cervelet à des âges avancés (Menalled et al., 2003). Ces agrégats de mHtt se forment dans le noyau et le cytoplasme comme chez les patients MH.

Il a également été montré qu'un déficit de transcription, et notamment une diminution d'expression de gènes spécifiques du striatum tels que *Darpp32* (dopamine- and cAMP-regulated neuronal phosphoprotein) et *Pde10a*, est mesurée chez ces souris à partir de l'âge de 6 mois (Rising et al., 2011; Langfelder et al., 2016). Une neurodégénérescence progressive, un défaut du métabolisme glutamatergique et une réactivité astrocytaire ont été observés à partir de 12 mois mais sont significatifs seulement chez les souris homozygotes (Lerner et al., 2012; Pépin et al., 2016). De manière générale, le phénotype pathologique est aggravé et accéléré chez les souris homozygotes.

Ces souris Hdh140 reproduisent donc la génétique et l'évolution de la MH humaine. Les avantages et inconvénients de ce modèle sont résumés dans le **Tableau 1** ci-dessous.

Tableau 1- Description des modèles murins de la MH utilisés dans notre étude.

Modèle	Construction génétique	Promoteur	Caractéristiques histopathologiques	Avantages	Désavantages
Hdh140 (Menalled et al., 2003)	Insertion de 140 CAG dans l'exon 1 de la Htt murine	Promoteur endogène de la Htt murine	- petits agrégats dans le striatum* - atrophie du striatum - diminution de l'expression de transcrits neuronaux	- construction génétique pertinente - apparition progressive des symptômes	- modèle tardif de la maladie (évolution lente) - réactivité astrocytaire très faible et tardive
LV-mHtt/ neurones (de Almeida et al., 2002)	Vecteur lentiviral exprimant les 171 premiers acides aminés de la mHtt avec 82 CAG (enveloppe : VSV)	PhosphoGlycérate Kinase (PGK, promoteur ubiquitaire)	- agrégats nucléaires et cytoplasmiques dans les neurones - lésion neuronale - réactivité astrocytaire	- modèle facile et rapide à générer - forte réactivité astrocytaire - perte neuronale	- lésion locale - seulement un fragment de la mHtt
LV-mHtt/ astrocytes (Faideau et al., 2010)	Vecteur lentiviral exprimant les 171 premiers acides aminés de la mHtt avec 82 CAG (enveloppe : Mokola)	PhosphoGlycérate Kinase (PGK, promoteur ubiquitaire)	- agrégats nucléaires et cytoplasmiques dans les astrocytes - réactivité astrocytaire	- modèle expérimental permettant l'étude de l'effet de la mHtt directement dans les astrocytes - forte réactivité astrocytaire	- pas de mHtt dans les neurones - seulement un fragment de la mHtt

* contrairement à ce qui est décrit dans la littérature, les souris Hdh140 de notre colonie présentent des agrégats seulement dans le striatum

ii. Le modèle lentiviral

Bien que certains symptômes et changements moléculaires de la MH soient reproduits dans ces modèles génétiques, ils ne présentent peu ou pas de perte neuronale ou de réactivité astrocytaire.

Les vecteurs viraux sont des outils moléculaires permettant le transfert de gènes. L'injection de vecteurs viraux dans le cerveau a permis le développement de modèles rapides des MND, notamment de la MH par la surexpression de la mHtt (Déglon and Hantraye, 2005). Ces vecteurs viraux permettent une forte expression du transgène localement dans une région cible du cerveau (Ruiz and Déglon, 2012). Les principaux vecteurs viraux utilisés sont les vecteurs dérivés des lentivirus (LV) et des virus adéno-associés (AAV).

Les vecteurs LV sont dérivés du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et appartiennent à la famille des rétrovirus. Ils sont dépourvus de séquences nucléotidiques virales pathogènes et sont incapables de réplication. Les LV ont une grande capacité de clonage et sont intégratifs, c'est-à-dire qu'ils intègrent leur génome à celui de l'hôte favorisant l'expression persistante du transgène. La première étude, utilisant l'injection striatale des vecteurs LV codant un fragment de la mHtt humaine (LV-mHtt) pour modéliser la MH, a été faite chez le rat (de Almeida et al., 2002). Le vecteur LV code pour les 171 premiers acides aminés de la mHtt humaine avec 82 répétitions CAG et est pseudotypé avec la protéine d'enveloppe VSV (vesicular stomatitis virus) permettant l'expression du transgène dans les neurones. Le LV-mHtt a ensuite été utilisé chez la souris et a notamment permis d'étudier

les mécanismes liés à la toxicité de la mHtt (Galvan et al., 2012; Damiano et al., 2013; Ben Haim et al., 2015a). Chez la souris, la dégénérescence neuronale dans le striatum apparaît 4 à 6 semaines après injection du LV-mHtt. Dans ce modèle, la présence d'agrégats de mHtt et d'astrocytes réactifs est observée dans la zone d'infection. Les altérations motrices et cognitives n'ont pas été évaluées chez ces souris. L'injection du LV-mHtt provoque une lésion locale qui n'a probablement pas d'effets majeurs sur le comportement des rongeurs. Le caractère versatile des vecteurs viraux a permis de développer des modèles de la MH dans d'autres espèces. Par exemple, chez le primate non-humain, l'injection striatale du LV-mHtt entraîne l'apparition progressive de mouvements choréiformes et de dyskinésie (Palfi et al., 2007).

Des modèles utilisant l'injection d'AAV codant un fragment de la mHtt ont également été générés et présentent des altérations du comportement moteur (Senut et al., 2000; DiFiglia et al., 2007; Jang et al., 2018).

De plus, les vecteurs viraux peuvent cibler différents types cellulaires dans le cerveau. Colin et collaborateurs ont par exemple développé des vecteurs LV ciblant les astrocytes (Colin et al., 2009). Ces vecteurs lentiviraux sont pseudotypés avec l'enveloppe du lyssavirus mokola ayant un tropisme pour les astrocytes, et possèdent quatre copies d'une séquence cible du microRNA124a (miR124T) en 3' du gène d'intérêt permettant d'éliminer l'expression résiduelle du transgène dans les neurones. La séquence miR124T est complémentaire de la séquence du microRNA124a, exprimée exclusivement dans les neurones, et permet une inhibition de l'expression du transgène par ARN interférence. La combinaison de ces deux stratégies permet l'expression sélective du transgène dans les astrocytes. Grâce à ce vecteur LV-mHtt ciblant spécifiquement les astrocytes, un modèle murin d'expression sélective de la mHtt dans les astrocytes a été développé par une équipe de notre laboratoire (Faideau et al., 2010). Une forte réactivité astrocytaire est décrite dans ce modèle dès 4 semaines après injection ainsi que la présence d'agrégats de mHtt. Ce modèle ne présente pas de perte neuronale mais une baisse de transcrits spécifiques de neurones striataux comme *Darpp32*.

Nous avons utilisé les deux modèles lentiviraux dans notre étude, le modèle LV-mHtt/neurones et LV-mHtt/astrocytes. Les avantages et inconvénients de ces modèles sont décrits dans le **Tableau 1**.

La MH est une maladie neurodégénérative génétique causée par une mutation entraînant une expansion de la queue polyQ dans la protéine Htt. La dégénérescence observée dans la MH pourrait être due à la perte de fonctions de la Htt sauvage et au gain de fonctions toxiques de la mHtt. De nombreux processus cellulaires sont altérés dans la MH comme la transcription, le transport vésiculaire et la transmission glutamatergique affectant particulièrement les neurones GABAergiques du striatum. Ces processus cellulaires impliquent également les cellules gliales, et notamment les astrocytes qui participent au phénomène d'excitotoxicité, à la régulation métabolique et à la neuroinflammation.

II. Les astrocytes

1. Les astrocytes, des cellules partenaires indispensables dans le SNC

a. Caractéristiques des astrocytes

i. Définition

La neuroglie a été initialement décrite par Rudolf Virchow en 1856 comme un tissu conjonctif scellant les cellules nerveuses entre elles (Virchow, 1856). Peu de temps après, le développement des techniques histologiques et de microscopie par Camilo Golgi, Santiago Ramón y Cajal et Pio del Rio Hortega a permis de mettre en évidence la grande diversité de ces cellules neurogliales et leur morphologie complexe (Somjen, 1988; Kettenmann and Ransom, 2004). C'est en 1893 que Michael von Lenhossek propose le terme « astrocyte » en référence à la morphologie étoilée de ces cellules (Lenhossek, 1893). Les premiers dessins de Ramón y Cajal et del Rio Hortega révèlent, en effet, le pléomorphisme de ces astrocytes (Garcia-Marin et al., 2007) (**Figure 11a et d**).

Plus tard, Kölliker et Andriezen divisent les astrocytes en deux types distincts en fonction de leur morphologie et de leur localisation dans le SNC (Andriezen, 1893). Les astrocytes fibreux, localisés dans la matière blanche, possèdent une morphologie allongée avec de fins et longs prolongements. Les astrocytes protoplasmiques se trouvent dans la matière grise et ont une morphologie plus complexe avec de nombreux prolongements (Garcia-Marin et al., 2007; Verkhratsky and Nedergaard, 2018).

Les astrocytes peuvent être identifiés par l'expression de différents marqueurs comme la protéine des filaments intermédiaires GFAP (Glial Fibrillary Acid Protein), la protéine S100 β , la glutamine synthase et la déshydrogénase Aldh1L1 (Aldehyde Dehydrogenase 1 Family Member L1) (Cahoy et al., 2008; Sofroniew and Vinters, 2010). Alors que la GFAP ne marque qu'environ 15% du volume total occupé par les astrocytes, l'utilisation de sondes fluorescentes ou de souris transgéniques avec les astrocytes fluorescents a permis de mettre en évidence la morphologie complexe des astrocytes avec leurs nombreux prolongements ramifiés (Bushong et al., 2002; Wilhelmsson et al., 2006) (**Figure 11b-c**).

Cependant, les marqueurs utilisés habituellement pour détecter les astrocytes ne sont pas exprimés uniformément par tous les astrocytes. Par exemple, la GFAP, qui est le marqueur le plus largement utilisé, est préférentiellement exprimé par les astrocytes de la matière blanche chez la souris (Bushong et al., 2002). Les astrocytes de la matière grise présentent, eux aussi, des différences d'expression de la GFAP en fonction des régions. Alors qu'en condition physiologique, les astrocytes de l'hippocampe expriment la GFAP à un niveau détectable, peu d'astrocytes dans le thalamus et le striatum sont positifs pour la GFAP (Sofroniew and Vinters, 2010; Khakh and Sofroniew, 2015). De plus, il existe plusieurs isoformes et variants de la GFAP (α , β , γ , δ and κ) qui peuvent être exprimés différemment en fonction des astrocytes (Middeldorp and Hol, 2011).

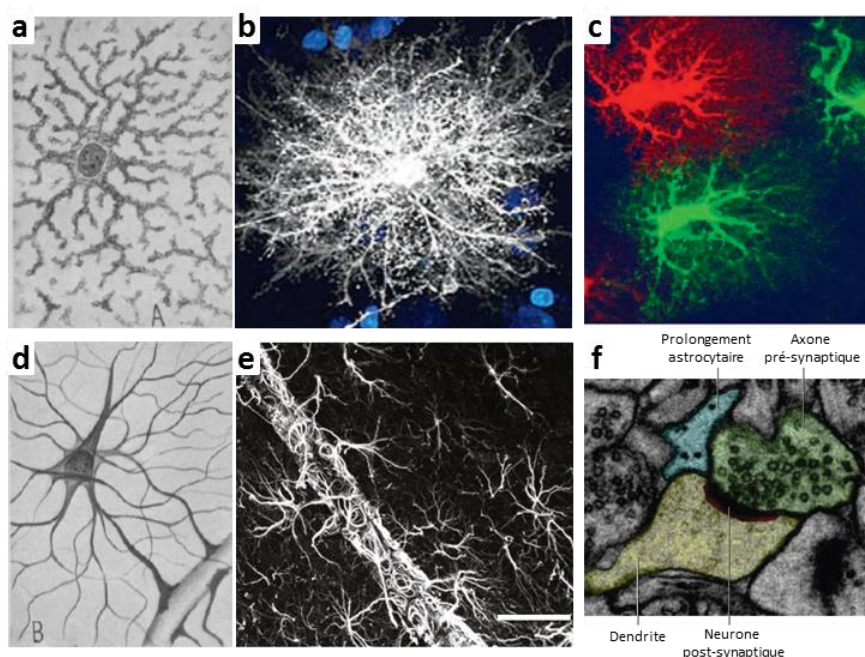


Figure 11- Les astrocytes, des cellules gliales complexes. Des premiers dessins (a,d) aux techniques modernes d'imagerie (b,c,e,f), les astrocytes présentent une morphologie étoilée avec de nombreux prolongements ramifiés. Les astrocytes sont organisés en domaine (c). Ils entourent les vaisseaux sanguins via les pieds astrocytaires (d-e) et leurs prolongements constituent la synapse tripartite avec les neurones pré et postsynaptiques (f). a,d. (Sierra et al., 2016). b. (Oberheim et al., 2009). c. (Wilhelmsson et al., 2006). e. (Kacem et al., 1998). f. (Eroglu and Barres, 2010).

ii. Organisation des astrocytes dans le cerveau

Les astrocytes présentent de nombreux prolongements formant des domaines anatomiques organisés avec peu de chevauchement avec les astrocytes adjacents (Bushong et al., 2002; Halassa et al., 2007; Nedergaard et al., 2003) (**Figure 11c**). Néanmoins, ces domaines astrocytaires sont interconnectés et forment un réseau fonctionnel et complexe grâce à des jonctions communicantes (Nedergaard et al., 2003). Ces jonctions communicantes entre les astrocytes sont formées par l'assemblage de connexines (Cx) dont les principales sont les Cx43 et Cx30 (Rouach et al., 2002). Cette communication intercellulaire spécialisée permet la diffusion de nombreuses molécules essentielles aux processus de signalisation et de communication. En effet, ces jonctions communicantes sont perméables aux petites molécules comme les ions (K^+ , Ca^{2+}), les seconds messagers (AMP, ATP, IP3), les substrats métaboliques (glucose) ou les acides aminés (glutamate) (Giaume et al., 2010; Escartin and Rouach, 2013). Grâce à cette communication inter-astrocytaire, les astrocytes peuvent intégrer les informations de leur environnement, notamment de la synapse, et répondre au mieux aux besoins des neurones (Volterra and Meldolesi, 2005) (voir paragraphe II.1.b).

A l'origine, les astrocytes étaient considérés comme des cellules contribuant principalement à l'organisation structurelle du cerveau. Comme les autres cellules gliales, les astrocytes sont globalement électriquement silencieux; ils ne conduisent pas de potentiels d'action contrairement aux neurones (Kuffler, 1967; Mishima and Hirase, 2010). Cependant, les astrocytes ne sont pas physiologiquement inactifs (Sofroniew and Vinters, 2010). En effet, des variations de la concentration calcique intracellulaire sont observées dans les astrocytes; celles-ci représentent une forme d'excitabilité et un moyen de communication pour les astrocytes (Charles et al., 1991; Sofroniew and

Vinters, 2010). Cette augmentation calcique peut se produire spontanément comme oscillation intrinsèque résultant de la libération de Ca^{2+} des stocks intracellulaires ou être déclenchée par l'activité neuronale via les neurotransmetteurs comme le glutamate ou les purines, et peut parfois se propager sous la forme d'une vague calcique entre les astrocytes voisins (Volterra and Meldolesi, 2005; Sofroniew and Vinters, 2010). En réponse à cette élévation de Ca^{2+} , les astrocytes peuvent libérer dans le milieu extracellulaire des transmetteurs, appelés gliotransmetteurs, comme par exemple le glutamate, l'ATP, l'adénosine, la D-sérine, qui peuvent moduler l'activité des autres cellules avoisinantes telles que les autres astrocytes, les neurones, la microglie, les oligodendrocytes ou encore les cellules du système vasculaire (Volterra and Meldolesi, 2005; Araque et al., 2014; Petrelli and Bezzi, 2016).

Les astrocytes ont d'abord été décrits comme une population de cellules gliales homogènes mais il a été montré que les astrocytes présentaient, en fonction des régions cérébrales et même au sein d'une région, une hétérogénéité dans leur morphologie et leur densité (Emsley and Macklis, 2006), leur profil transcriptomique (Bachoo et al., 2004; Cahoy et al., 2008; Lovatt et al., 2007), l'expression de récepteurs, canaux et transporteurs (Matyash and Kettenmann, 2010) et enfin dans leurs fonctions (Oberheim et al., 2012). Il existerait plus de neuf types d'astrocytes dans le cerveau de rongeurs avec des morphologies et localisations spécifiques. En plus des astrocytes fibreux et protoplasmiques originellement décrits, il existe des astrocytes spécialisés comme la glie de Müller dans la rétine, la glie de Bergmann dans le cervelet et les tanocytes à la base du troisième ventricule (Verkhatsky and Nedergaard, 2018). De plus, des études transcriptomiques sur les astrocytes ont permis d'identifier des marqueurs spécifiques de certaines sous-populations astrocytaires (Bachoo et al., 2004; Lovatt et al., 2007; Cahoy et al., 2008). Lin et collaborateurs ont par exemple identifiés cinq populations différentes d'astrocytes dans plusieurs régions du cerveau qui expriment différemment les marqueurs moléculaires CD (Cluster of differentiation) 51, CD61 et CD71 (John Lin et al., 2017).

Bien qu'ils ne soient pas les cellules les plus abondantes du SNC comme il est souvent écrit dans la littérature (von Bartheld et al., 2016), les astrocytes constituent une proportion significative des cellules cérébrales et jouent un rôle essentiel dans le bon fonctionnement neuronal (Gorshkov et al., 2018; Verkhatsky and Nedergaard, 2018).

b. Les astrocytes jouent de nombreux rôles dans le système nerveux central

Idéalement positionnés dans le SNC entre le système vasculaire et les synapses, les astrocytes répondent dynamiquement aux changements de leur environnement et contrôlent ainsi l'homéostasie cérébrale (Allaman et al., 2011) (**Tableau 2** et **Figure 12**).

Les astrocytes sont associés aux neurones pré- et post-synaptiques au sein de la synapse tripartite (**Figure 11f**). Cette place privilégiée à la synapse leur permet de réguler la synaptogenèse, la maturation et l'élimination des synapses en excès pendant le développement et à l'âge adulte (Chung et al., 2015). Ils apportent également un support trophique tout au long de la vie des

neurones. Les astrocytes jouent aussi un rôle actif dans la transmission synaptique en permettant la recapture et le recyclage des neurotransmetteurs depuis la fente synaptique et en libérant des gliotransmetteurs (Barres, 2008) (**Tableau 2** et **Figure 12**). Les astrocytes sont notamment importants dans l'homéostasie glutamatergique et potassique, qui sont nécessaires à la transmission neuronale. Les astrocytes, via leurs pieds astrocytaires (**Figure 11d-e**), sont également associés aux vaisseaux sanguins et forment ce qu'on appelle l'unité neurovasculaire, leur permettant entre autres d'assurer un support métabolique pour les neurones, de réguler la barrière hémato-encéphalique (BHE) et d'éliminer les débris et déchets cellulaires (Allaman et al., 2011; Verkhratsky et al., 2015) (**Tableau 2** et **Figure 12**).

Les fonctions astrocytaires sont donc nombreuses et essentielles pour le bon fonctionnement du SNC. Des études récentes ont également mis en avant le rôle des astrocytes dans les fonctions cérébrales supérieures comme la consolidation mnésique, la régulation du sommeil et la prise alimentaire (Ben Achour and Pascual, 2012) (**Tableau 2**).

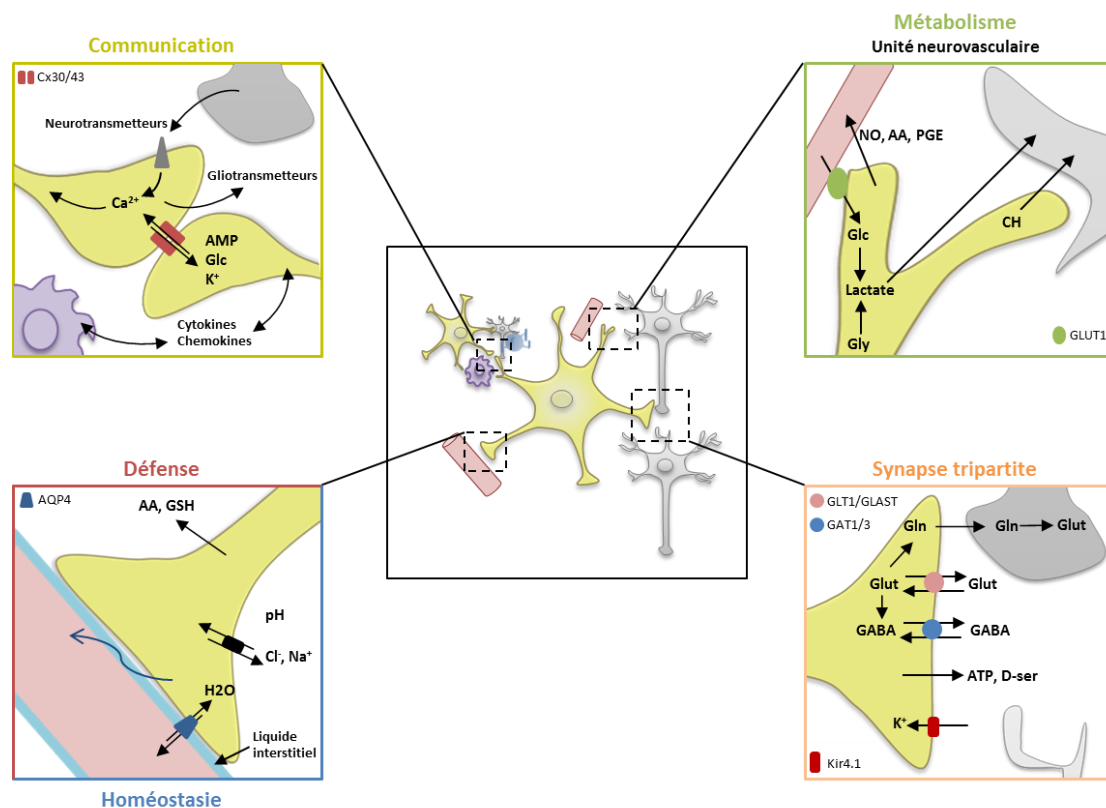


Figure 12- Les astrocytes sont essentiels au bon fonctionnement du SNC. Les astrocytes communiquent entre eux via les Cx et les vagues calciques mais aussi avec les autres types cellulaires via la libération de gliotransmetteurs et de cytokines (jaune). Ils fournissent l'apport énergétique nécessaire aux neurones pour fonctionner (vert). Ils participent activement à la transmission synaptique via la libération de gliotransmetteurs. Ils régulent également les concentrations en ions et en neurotransmetteurs nécessaire au bon fonctionnement de la synapse (orange). Enfin, Ils jouent un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie des fluides et dans l'élimination des déchets via le système glymphatique (bleu). Les astrocytes participent également à la défense anti-oxydante (rouge). AA : acide ascorbique, AQP4 : Aquaporine 4, CH : Cholestérol, Cx : connexines, D-ser : D-sérine, GAT1/3 : transporteur du GABA, Glc : Glucose, Gln : Glutamine, Glut : Glutamate, GLUT1 : transporteur du glucose, GLT1/GLAST : transporteur au glutamate, GSH : glutathione Gly : Glycogène, Kir4.1 : canal potassique, NO : monoxide d'azote, PGE : prostaglandine. Inspirée de (Garwood et al., 2017)

Tableau 2- Les fonctions des astrocytes en condition physiologiques et au cours de la MH.

	Fonctions	Processus biologiques	Références	Dans la MH	Références
Partenaire synaptique <i>Développement</i>	Synaptogenèse	Libération de thrombospondines, CH, intégrines, Hevin, SPARC...	(Mauch et al., 2001; Christopherson et al., 2005; Pfrieger, 2010)	↘ synthèse du CH	(Leoni and Caccia, 2015)
	Maturation	Libération de TNF α (insertion AMPAR), stéroïdes (GABAR), CH...	(Slezak and Pfrieger, 2003; Garcia-Segura and Melcangi, 2006)		
Transmission synaptique « Synapse Tripartite »	Elimination synapse	Activation de la voie du complément ; Phagocytose via MEGF10 et MERTK	(Chung et al., 2013; Jung and Chung, 2018)		
	Support trophique	Libération de facteurs neurotrophiques (BDNF, CNTF, VEGF...)	(Blondel et al., 2000; Liberto et al., 2004; Allaman et al., 2011)	↘ production et transport du BDNF ; ↘ libération de CCL5/Rantes	(Zuccato et al., 2001; Wang et al., 2012; Hong et al., 2016; Chou et al., 2008)
	Gliotransmission	Libération de gliotransmetteurs (adénosine, ATP, D-sérine, glut, GABA...)	(Haydon, 2001; Volterra and Meldolesi, 2005; Araque et al., 2014)	↘ GABA (via GAT3)	(Dvorzhak et al., 2013; Wojtowicz et al., 2013)
	Recapture de NT	Glut via GLT-1 et GLAST ; GABA via GAT1 et GAT3	(Danbolt, 2001; Nedergaard et al., 2002; Beenhakker and Huguenard, 2010; Zhou and Danbolt, 2013)	↘ GLT-1 (mRNA, protéine) ; ↘ recapture du glut	(Behrens et al., 2002; Lievens et al., 2001; Shin et al., 2005; Estrada-Sánchez et al., 2009; Faideau et al., 2010)
				= recapture du glut	(Parsons et al., 2016)
	Recyclage des NT	Recyclage et synthèse du glut et GABA via le cycle gln-glut-GABA	(Schousboe, 2003; Allaman et al., 2011)	↘ GS ; ↘ cycle gln-glut-GABA	(Lievens et al., 2001; Boussicault et al., 2014; Skotte et al., 2018)
	Homéostasie K ⁺	Capture du K ⁺ dans la fente synaptique (via le canal Kir4.1)	(Higashi et al., 2001; Bay and Butt, 2012; Allen, 2014; Bellot-Saez et al., 2017)	↘ Kir4.1	(Cepeda et al., 2010; Tong et al., 2014; Jiang et al., 2016)
	Homéostasie du CH	Production du CH dans le SNC et transport via ApoE jusqu'aux autres types cellulaires (composant structurel des membranes, synaptogenèse, maturation des synapses, libération des NTs, synthèse de myéline ...)	(Björkhem and Meaney, 2004; Pfrieger and Ungerer, 2011; Valenza and Cattaneo, 2011)	↘ métabolisme du CH ; ↘ ApoE	(Valenza et al., 2010; Leoni et al., 2008; Boussicault et al., 2016; Leoni and Caccia, 2015)

	Fonctions	Processus biologiques	Références	Dans la MH	Références
Partenaire métabolique « unité neurovasculaire »	Support métabolique	« Lactate shuttle » : capture du Glc des vaisseaux sanguins (GLUT-1), métabolisé en lactate puis libéré dans la fente synaptique ; réserve de Gly	(Pellerin et al., 2007; Belanger et al., 2011; Allaman et al., 2011)	↘capture du Glc	(Boussicault et al., 2014)
	Contrôle flux sanguin	Libération de médiateurs (NO, AA, PGE) modulant le diamètre des vaisseaux en fonction de l'activité neuronale	(Gordon et al., 2007; Iadecola and Nedergaard, 2007; Koehler et al., 2009)	↘régulation du flux sanguin	(Hsiao et al., 2015)
Partenaire homéostasique	Maintien homéostasie	Ionique (K+, Cl-, Na+), Fluides (via AQP4), pH (CO2 métabolisé)	(Allaman et al., 2011)	↘homeostasie du K ⁺	(Tong et al., 2014; Jiang et al., 2016)
	Système glymphatique	Système lymphatique du cerveau : élimine les déchets dans la circulation sanguine via les pieds astrocytaires	(Iliff et al., 2012; Jessen et al., 2015; Plog and Nedergaard, 2018)		
Partenaire de défense	Défense antioxydante	Libération de molécules antioxydantes (GSH, superoxide, AA)	(Wilson, 1997; Allaman et al., 2011)	↘libération d'AA ; ↗stress oxydatif	(Acuna et al., 2013; Rebec, 2013; Boussicault et al., 2014)
	Maintien BHE	Intégrité de la BHE: via les pieds astrocytaires (angiotensine II)	(Abbott et al., 2006; Alvarez et al., 2013; Daneman and Prat, 2015)	↘BHE (implication astrocytes ?)	(Drouin-Ouellet et al., 2015; Di Pardo et al., 2017)
Fonctions cérébrales émergentes	Mémoire	Gliotransmission régulant la LTP/LTD	(Panatier et al., 2006; Gibbs et al., 2008; Ben Achour and Pascual, 2012; Adamsky et al., 2018)		
	Sommeil/Eveil	Libération d'adénosine	(Halassa et al., 2009; Jones, 2009; Haydon, 2017)		
	Respiration	Gliotransmission (gln-glut, PGE2) ; régulation pCO2	(Gourine et al., 2010; Forsberg and Herlenius, 2018)		
	Neuro-endocrines	Changement morphologique pendant la lactation et la déshydratation	(Hebb et al., 1999; Theodosis, 2002)	↘fonctions hypothalamiques (implication des astrocytes ?)	(van Wamelen et al., 2014)
Homéostasie énergétique, prise alimentaire (via récepteurs aux hormones leptine, insuline...)		(García-Cáceres et al., 2016; Douglass et al., 2017; Camandola, 2018)			

AA : acide ascorbique, AQP4 : Aquaporine 4, CH : Cholestérol, D-ser : D-sérine, GAT1/3 : transporteur du GABA, Glc : Glucose, Gln : Glutamine, Glut : Glutamate, GLUT1 : transporteur du glucose, GLT1/GLAST : transporteur au glutamate, GSH : glutathione Gly : Glycogène, NO : monoxide d'azote, PGE : prostaglandine

2. Les astrocytes au cours de la maladie de Huntington

Dans les MND, et notamment dans la MH, la majorité des études se focalisent sur les neurones et leurs dysfonctions. Les altérations observées dans les MND résulteraient en réalité de dysfonctions des cellules neuronales mais aussi des cellules non neuronales (Lobsiger and Cleveland, 2007). Depuis quelques années, l'idée neuro-centrique évolue et de plus en plus d'études s'intéressent maintenant aux rôles des cellules gliales et particulièrement des astrocytes dans la MH (Khakh et al., 2017; Gorshkov et al., 2018; Robertson, 2018).

a. Les dysfonctions des astrocytes au cours de la maladie de Huntington

La mHtt s'exprime dans tous les cellules du SNC y compris dans les astrocytes (Singhrao et al., 1998; Hebb et al., 1999; Shin et al., 2005) (voir paragraphe I.4.a.i, **Figure 4**). Plusieurs études se sont intéressées à l'effet de l'expression de la mHtt spécifiquement dans les astrocytes et ont montré que cela entraîne la mort des neurones striataux en co-culture, et l'apparition de symptômes liés à la MH chez la souris (déficits moteurs, perte de poids, réduction de la durée de vie...) (Bradford et al., 2009, 2010; Faideau et al., 2010; Shin et al., 2005). De plus, l'expression de la mHtt à la fois dans les neurones et les astrocytes de souris accentue le phénotype neuropathologique tel que le nombre d'agrégats de mHtt et la lésion neuronale dans le striatum par rapport à l'expression de la mHtt seulement dans un des types cellulaires (Meunier et al., 2016). Au contraire, la diminution de l'expression de la mHtt dans les astrocytes des souris BACHD ralentit la progression de la maladie en restaurant notamment l'expression de marqueurs synaptiques et la transmission cortico-striatale du glutamate (Wood et al., 2018). Enfin, le remplacement des cellules gliales du striatum de souris sauvages par des cellules gliales humaines exprimant la mHtt suffit à induire un phénotype pathologique et inversement, chez les souris R6/2, les cellules gliales humaines non malades retardent la progression de la maladie (Benraiss et al., 2016). L'ensemble de ces résultats suggère donc que l'expression de la mHtt dans les astrocytes est suffisante pour induire l'altération de plusieurs fonctions cellulaires dans la MH.

Dans la MH, les fonctions astrocytaires semblent majoritairement défectueuses chez les patients et les modèles animaux de la MH (Khakh et al., 2017) (**Tableau 2**). Je développerai ici certaines fonctions spécifiques des astrocytes altérées dans la MH.

i. Altération de la transmission synaptique

Homéostasie glutamatergique et excitotoxicité

Les astrocytes sont impliqués dans la régulation de l'homéostasie glutamatergique en capturant le glutamate en excès au niveau de la fente synaptique grâce à des transporteurs tels que GLT-1. Plusieurs études post-mortem ont observé une diminution de l'expression de l'ARNm et de la protéine GLT-1 dans le cerveau de patients MH (Arzberger et al., 1997; Faideau et al., 2010; Shin et al., 2005). Une diminution de 40% est déjà observée chez les patients au stade 0 de la maladie, ce qui suggère que cette perte de GLT-1 est une caractéristique pathologique précoce dans la MH (Faideau et al., 2010). Cette baisse de GLT-1 est associée à un défaut de recapture du glutamate dans le cortex

préfrontal de patients (Hassel et al., 2008). L'expression de GLT-1 est également diminuée dans plusieurs modèles animaux, souris et drosophile, de la MH (Lievens et al., 2001; Behrens et al., 2002; Lievens et al., 2005). Jiang et collaborateurs ont mis en évidence que cette perte de GLT-1 dans les astrocytes était responsable d'une altération de la signalisation glutamatergique dans le modèle R6/2 (Jiang et al., 2016). Une diminution de la clairance du glutamate par les astrocytes dans la fente synaptique peut, en effet, engendrer une excitotoxicité (voir paragraphe I.4.b.iv) (Shin et al., 2005; Hassel et al., 2008). L'expression sélective de la mHtt dans les astrocytes est suffisante pour induire une diminution de l'expression de GLT-1, une altération de la recapture du glutamate et de l'activité des neurones striataux, et des troubles moteurs chez la souris (Bradford et al., 2009, 2010; Faideau et al., 2010). Cette augmentation du glutamate, particulièrement au niveau de la synapse cortico-striatale, s'accompagne d'une altération de courants calciques, notamment dû à l'activation excessive des récepteurs métabotropiques au glutamate (Jiang et al., 2016).

En condition physiologique, une fois dans les astrocytes, le glutamate est métabolisé par l'enzyme glutamine synthase (GS) en glutamine qui est à son tour transportée jusqu'aux neurones et utilisée pour produire du glutamate et du GABA (Danbolt, 2001). L'expression de l'enzyme GS est diminuée dans plusieurs modèles de la MH suggérant également une altération du cycle glutamate-glutamine (Lievens et al., 2001; Boussicault et al., 2014). Une analyse protéomique et biochimique chez les souris R6/2 montre, en effet, une dérégulation du cycle glutamate-glutamine-GABA avec un défaut du métabolisme et de la libération de la glutamine entraînant une diminution de la synthèse du GABA (Skotte et al., 2018). Ces résultats sont en accord avec l'augmentation du niveau de glutamine dans le cerveau des souris R6/2 qui peut résulter d'un défaut de libération de glutamine des astrocytes vers les neurones et donc entraîner une diminution de la production de GABA (Behrens et al., 2002; Tsang et al., 2006; Tkac et al., 2007; Zacharoff et al., 2012). Les taux de GABA sont notamment diminués dans le cerveau de patients MH (Spokes et al., 1980; Patassini et al., 2016). De plus, une altération de la transmission GABAergique est observée au cours de la MH (Khakh et al., 2017). L'activité des récepteurs GABAB (pré-synaptiques) et des récepteurs GABAA (post-synaptiques) des neurones striataux est diminuée dans le cerveau des souris R6/2 et zQ175 (Wojtowicz et al., 2013). La libération du GABA via le transporteur astrocytaire GAT3 est également réduite, ce qui entraîne une altération de l'inhibition tonique des SPNs dans la MH (Dvorzhak et al., 2013; Wojtowicz et al., 2013).

Homéostasie potassique

L'homéostasie potassique, qui est essentielle pour la transmission synaptique, est également altérée au cours de la MH (Cepeda et al., 2010; Chan and Surmeier, 2014; Zhang et al., 2018b). Le canal Kir4.1, enrichi dans les astrocytes, joue notamment un rôle important dans cette homéostasie potassique (Nwaobi et al., 2016). Une étude a montré que le niveau protéique de Kir4.1 était diminué dans deux modèles murins de la MH, les souris R6/2 et les souris KI zQ175, et particulièrement dans les astrocytes présentant des agrégats de mHtt (Tong et al., 2014). Cette diminution de Kir4.1 dans les astrocytes apparaît tôt dans la maladie et entraîne une augmentation de la concentration potassique dans la fente synaptique causant une hyperexcitabilité des neurones

striataux SPNs et une altération de la transmission synaptique. La surexpression par des vecteurs viraux de Kir4.1 dans les astrocytes du striatum normalise la concentration potassique, contre l'hyperexcitabilité des neurones et améliore certains symptômes moteurs chez les souris R6/2 (Tong et al., 2014). De plus, les dysfonctions de la signalisation calcique et glutamatergique observées dans des modèles murins de la MH sont en partie restaurées par l'expression de Kir4.1 dans les astrocytes (Jiang et al., 2016).

Kir4.1 dans les astrocytes joue donc un rôle important dans les dysfonctions observées dans la MH, en participant notamment aux défauts d'homéostasie potassique et glutamatergique qui sont responsables de dysfonctions neuronales (Dvorzhak et al., 2016; Jiang et al., 2016).

ii. Altération du métabolisme

Métabolisme du glucose

Le métabolisme du glucose est dérégulé dans la MH. Des études d'imagerie par tomographie par émission de positons ont reporté une diminution du métabolisme cérébral du glucose dans le striatum de patients à un stade précoce de la MH (Grafton et al., 1992; Powers et al., 2007). Dans les souris BACHD, le métabolisme du glucose est diminué dans des régions restreintes et spécifiques du cerveau comme dans la partie dorso-latérale du striatum, le gyrus denté de l'hippocampe et le cervelet (Boussicault et al., 2014). *In vitro*, le métabolisme neuronal du glucose est altéré lorsque les neurones sont cultivés avec des astrocytes exprimant la mHtt alors que le métabolisme est normal dans les cultures seules de neurones de souris MH (Boussicault et al., 2014; Hamilton et al., 2015). L'expression de mHtt dans les astrocytes n'impacte pas la recapture du glucose par les astrocytes mais altère la recapture du glucose par les neurones. Les astrocytes semblent donc réguler indirectement le métabolisme neuronal du glucose dans la MH (Boussicault et al., 2014).

Métabolisme du cholestérol

L'homéostasie du CH est également impactée dans la MH (Valenza and Cattaneo, 2011; Leoni and Caccia, 2015). Dans le cerveau, le CH joue un rôle majeur dans le développement, la synaptogenèse, l'activité et la survie des neurones (Björkhem and Meaney, 2004; Pfrieger and Ungerer, 2011; Valenza and Cattaneo, 2011). La BHE est imperméable au CH, il est donc produit *in situ* dans le SNC et majoritairement par les astrocytes (Björkhem and Meaney, 2004; Pfrieger and Ungerer, 2011). Une altération de l'homéostasie du CH impacte sévèrement la formation des synapses mais également l'activité neuronale (Pfrieger and Ungerer, 2011; Boussicault et al., 2016). L'expression de gènes impliqués dans la synthèse mais également dans la dégradation du CH est diminuée dans des modèles de culture, de souris et chez les patients de la MH, suggérant une dérégulation générale du métabolisme du CH dans la MH (Leoni and Caccia, 2015). En effet, l'enzyme CYP46A1, qui convertit le CH en 24S-hydroxy-CH, est diminuée dans le cerveau de modèles murins et de patients de la MH, ce qui entraîne une réduction de la dégradation du CH (Boussicault et al., 2016). Il a notamment été montré que le niveau du 24S-hydroxy-CH est diminué dans le plasma de plusieurs modèles murins et de patients de la MH (Leoni et al., 2008, 2013; Valenza et al., 2010). La surexpression de CYP46A1 par des vecteurs viraux dans le striatum de souris R6/2 régule le

métabolisme du CH, diminue l'atrophie striatale, le nombre et la taille des agrégats de mHtt et améliore les troubles moteurs (Boussicault et al., 2016).

Une fois produit dans les astrocytes, le CH est délivré aux neurones grâce à l'apolipoprotéine E (ApoE) (Mauch et al., 2001; Pfrieger and Ungerer, 2011). Dans la MH, le transport du CH médié par ApoE est diminué (Leoni and Caccia, 2015). De plus, la surexpression de la mHtt dans des cultures d'astrocytes primaires altère la production et la sécrétion d'ApoE (Valenza et al., 2010).

L'ensemble de ces résultats suggère qu'un défaut du métabolisme du CH impliquant les astrocytes contribue à la pathogenèse de la MH.

iii. Diminution des fonctions de support

Support trophique

Les astrocytes participent au support trophique des neurones en libérant notamment des facteurs neurotrophiques. Par exemple, les astrocytes sont une source importante de BDNF (Miyamoto et al., 2015). Comme expliqué dans le paragraphe I.4.b.iii, le niveau de BDNF est diminué dans le cerveau de modèles murins et de patients de la MH (Zuccato et al., 2001; Labbadia and Morimoto, 2013). L'expression de mHtt dans des cultures primaires d'astrocytes corticaux ou l'utilisation de tranches de cerveaux de souris modèle de la MH montrent une diminution de la sécrétion de BDNF par les astrocytes qui est associée à une réduction du développement des neurites (Wang et al., 2012; Hong et al., 2016). La baisse de sécrétion du BDNF par les astrocytes serait due à une altération de son exocytose (Hong et al., 2016). La surexpression de BDNF dans les astrocytes diminue la neurodégénérescence et améliore la longévité et les performances motrices dans des modèles transgéniques de la MH (Giralt et al., 2010; Arregui et al., 2011).

De plus, une accumulation intracellulaire de la chimiokine CCL5 (C-C Motif Chemokine Ligand 5)/RANTES, qui a des propriétés neuroprotectrices, est observée dans le cytosol des astrocytes des modèles murins R6/2 et Hdh150 et des patients atteints de la MH (Chou et al., 2008). L'expression spécifique de la mHtt dans les astrocytes diminue également la libération de CCL5/RANTES par ces astrocytes.

Au cours de la MH, les astrocytes libèrent donc moins de facteurs neurotrophiques ou de chimiokines réduisant leur support trophique envers les neurones.

Défense anti-oxydante

Les astrocytes participent à la défense anti-oxydante en sécrétant des molécules réductrices comme l'acide ascorbique (AA) et la glutathione (Allaman et al., 2011). Une altération de cette défense anti-oxydante est observée dans la MH (Rebec, 2013). Des études ont notamment montré un défaut de libération et de transport d'AA par les astrocytes ainsi qu'un plus faible niveau d'AA pendant l'activité comportementale chez les souris R6/2 (Acuna et al., 2013; Rebec et al., 2002; Rebec, 2018). De plus, l'expression de mHtt dans les astrocytes induit un stress oxydatif dans les neurones (Boussicault et al., 2014).

L'ensemble de ces résultats suggère donc que l'expression de la mHtt dans les astrocytes est suffisante pour induire plusieurs aspects pathologiques de la MH et que les dysfonctions astrocytaires pourraient participer à la physiopathologie de cette maladie. Cependant, la contribution de ces dysfonctions astrocytaires à la MH restent peu comprise : est-ce qu'elles précèdent, accompagnent ou suivent les dysfonctions neuronales ?

b. Les astrocytes deviennent réactifs au cours de la maladie de Huntington

La neuroinflammation est un mécanisme de défense dont le but est de protéger le SNC contre tout stimulus pathologique comme une infection, une lésion ou une maladie. Une des caractéristiques communes des MND est l'activation chronique des cellules gliales conduisant à cette neuroinflammation (Stephenson et al., 2018). Les astrocytes et la microglie réactifs sont les principaux acteurs de cette réponse inflammatoire dans le SNC et sécrètent des médiateurs inflammatoires comme les cytokines et les chimiokines (Heneka et al., 2014). Ils peuvent parfois être aidés par le recrutement des macrophages et lymphocytes périphériques mais également par les autres cellules du SNC comme les neurones et les oligodendrocytes (Cunningham et al., 2018; Stephenson et al., 2018). Plusieurs études ont montré l'accumulation de microglies réactives et d'astrocytes réactifs dans le cerveau de patients MH (Soulet and Cicchetti, 2011; Crotti and Glass, 2015). Quelle est leur contribution ?

i. Les astrocytes réactifs

Etant donné leurs rôles physiologiques essentiels dans le bon fonctionnement neuronal, il n'est pas surprenant que les astrocytes réagissent face à un stimulus pathologique dérégulant l'homéostasie du SNC. Les astrocytes sont capables de répondre à une grande variété de stimuli pathologiques aigus (accident vasculaire cérébral, trauma) et chroniques (tumeurs, infection, MND) comme dans la MH, en devenant réactifs (Sofroniew and Vinters, 2010; Ben Haim et al., 2015b; Liddelw and Barres, 2017).

La réactivité astrocytaire a été observée par les premiers anatomopathologistes ayant décrits les cellules gliales au 19^{ième} siècle. La découverte des filaments intermédiaires a permis de mieux caractériser ce phénomène (Eng et al., 1971). En effet, les astrocytes réactifs surexpriment des protéines des filaments intermédiaires telles que la GFAP, la vimentine et la nestine. La surexpression de ces protéines, et particulièrement de la GFAP, est devenue un marqueur de la réactivité astrocytaire (Bignami and Dahl, 1976). Une autre caractéristique de la réactivité astrocytaire est l'hypertrophie du soma et des prolongements astrocytaires (Wilhelmsson et al., 2006). Cette réactivité peut également entraîner un réarrangement de l'arborisation astrocytaire avec une augmentation du nombre de prolongements primaires et leur polarisation vers le site lésionnel (Wilhelmsson et al., 2006; Bardehle et al., 2013). L'organisation en domaine des astrocytes ne semble néanmoins pas impactée par la réactivité, sauf dans des conditions pathologiques sévères comme au niveau de la cicatrice gliale ou dans l'épilepsie (Oberheim et al., 2008). Des études transcriptomiques

ont aussi permis de révéler des changements transcriptionnels importants dans les astrocytes réactifs (Zamanian et al., 2012).

Sofroniew et collaborateurs ont proposé une classification de la réactivité en plusieurs stades en fonction du stimulus allant des astrocytes hypertrophiques et surexprimant la GFAP jusqu'à la prolifération astrocytaire et la formation de la cicatrice gliale (Sofroniew and Vinters, 2010). La cicatrice gliale forme une barrière autour du tissu endommagé afin de protéger dans un premier temps le tissu adjacent sain (Burda and Sofroniew 2014). Cette cicatrice gliale correspond au stade le plus extrême de la réactivité astrocytaire et se forme principalement après des lésions aiguës (Anderson et al., 2016; Burda et al., 2016). Les conditions pathologiques chroniques comme les MND sont plutôt associées à des stades légers à sévères de la réactivité avec très peu ou pas de prolifération (Ben Haim et al., 2015b; Cunningham et al., 2018). Dans ce manuscrit, je n'utiliserai donc pas le terme « d'astrogliose » qui implique la notion de prolifération astrocytaire mais plutôt les termes de « réactivité astrocytaire » ou « d'astrocytes réactifs » correspondant à la réponse des astrocytes à toutes conditions pathologiques dans le SNC.

Tout comme les astrocytes en condition physiologique, la réactivité astrocytaire est une réponse complexe et hétérogène présentant des différences morphologiques, moléculaires et fonctionnelles (Anderson et al., 2014). Plusieurs études ont montré que les astrocytes réactifs répondaient différemment en fonction de la nature, de la sévérité, du stade de la maladie ou de la durée du stimulus pathologique (Anderson et al., 2014; Ben Haim et al., 2015b; Ben Haim and Rowitch, 2017). Alors que certains marqueurs sont surexprimés par la majorité des astrocytes réactifs (GFAP, Serpina3n, Lipocalin 2), une analyse transcriptomique a révélé que les astrocytes réactifs présentaient des profils d'expression génique différents et spécifiques après une ischémie ou en condition de neuroinflammation (induite par LPS) chez la souris (Zamanian et al., 2012). Suite à une ischémie, les astrocytes réactifs surexpriment des facteurs neurotrophiques et auraient donc plutôt des fonctions trophiques. Au contraire, au cours d'une réaction neuroinflammatoire, les astrocytes surexpriment des facteurs du complément, qui sont notamment impliqués dans la phagocytose des synapses, et seraient, par conséquent, plus délétères. La neuroinflammation et l'ischémie induiraient donc deux types différents d'astrocytes réactifs, appelés respectivement « A1 » et « A2 » en référence à la nomenclature utilisée pour les macrophages et la microglie. Cette hétérogénéité dépendrait notamment de l'environnement des astrocytes et de la communication inter-gliale. Une étude a récemment montré que les astrocytes réactifs A1 sont induits par la microglie activée qui libère les cytokines IL-1 α , TNF et la molécule du complément C1q (Liddelow et al., 2017). Ces astrocytes A1 perdraient plusieurs de leurs fonctions physiologiques et acquerraient de nouvelles fonctions toxiques responsables de la mort des neurones et des oligodendrocytes. Des astrocytes réactifs qui expriment certains marqueurs A1 sont observés dans les MND et notamment dans la MH (Liddelow et al., 2017). Dans le cerveau âgé, les astrocytes surexpriment majoritairement des gènes caractéristiques des astrocytes A1 mais l'expression de gènes liés aux astrocytes A2 est également augmentée (Clarke et al., 2018). Ceci montre que les différents types d'astrocytes, A1 et A2, peuvent coexister dans le cerveau.

De la même façon que la microglie réactive, la classification A1/A2 pour les astrocytes réactifs est contestée (Cunningham et al., 2018). Les astrocytes réactifs pourraient, en réalité, exister sous de multiples états en fonction de la région cérébrale mais également du stimulus pathologique et de l'évolution de la pathologie. Le développement récent des techniques de séquençage « cellule unique » apportera de nombreux indices sur cette hétérogénéité astrocytaire.

ii. La réactivité astrocytaire dans la maladie de Huntington

La présence d'astrocytes réactifs dans la MH a été mise en évidence, il y a plusieurs années, par la surexpression de la GFAP dans le cerveau de patients atteints de la MH par des techniques de biochimie et d'immunohistochimie (Selkoe et al., 1982; Vonsattel et al., 1985b) (**Figure 13b et c**). Sur l'échelle neuropathologique de Vonsattel (**Figure 13a**), les astrocytes réactifs sont présents dès le stade 1 de la MH au niveau des zones de perte neuronale dans le noyau caudé puis dans le putamen (Vonsattel et al., 1985b) (**Figure 13a**). La réactivité astrocytaire augmente ensuite avec l'évolution de la maladie jusqu'au stade 4. A des stades tardifs, une neurodégénérescence et de la réactivité astrocytaire moins intenses ont été observées dans d'autres régions du cerveau comme le noyau accumbens, le globus pallidus, le thalamus et le noyau sous-thalamique (Vonsattel and DiFiglia, 1998). L'expression de mHtt a été détectée dans des astrocytes réactifs proches des zones de dégénérescence neuronale dans le cerveau de patients MH (Singhrao et al., 1998; Shin et al., 2005). Plus récemment, une étude effectuée dans le laboratoire, a montré la présence d'astrocytes réactifs dans la partie dorsale du noyau caudé de cerveaux de patients MH dès le stade 0, c'est-à-dire avant même la perte neuronale (**Figure 13c**) (Faideau et al., 2010).

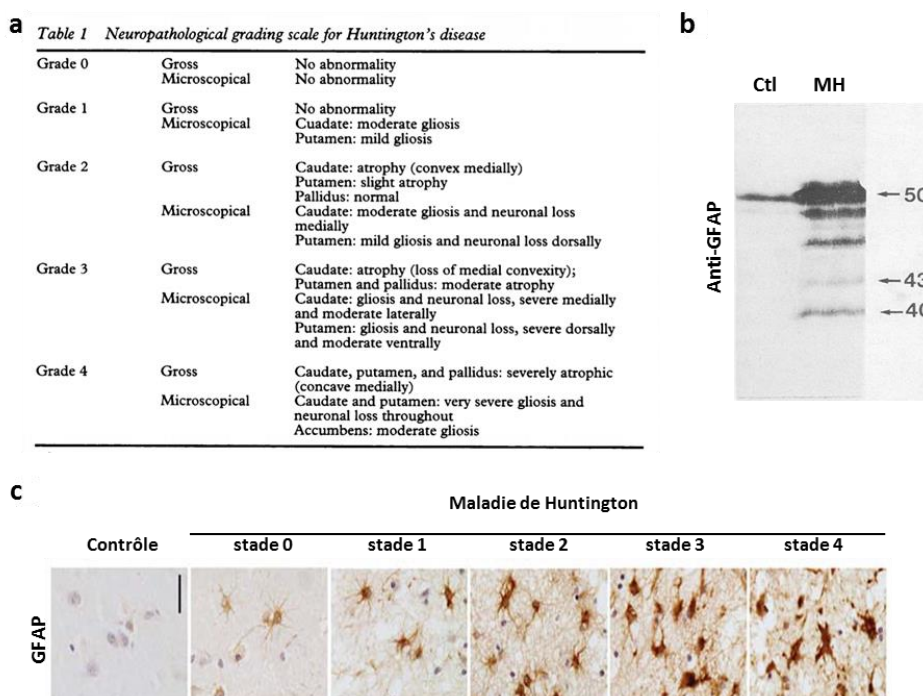


Figure 13- Les astrocytes deviennent réactifs dans le cerveau des patients au cours de la MH. a. Les différents stades de la MH sur l'échelle de Vonsattel établie en 1985 et basée sur les observations anatomopathologiques macroscopiques et microscopiques. (Xuereb et al., 1996). **b.** La protéine GFAP est surexprimée dans des homogénats de cerveau de patients MH. (Selkoe et al., 1982). **c.** Les astrocytes surexpriment la GFAP dans le cerveau de patients au stade 0 de la MH et le niveau de GFAP augmente avec l'évolution de la maladie. (Faideau et al., 2010).

Dans l'étude de Faideau et collaborateurs, la réactivité astrocytaire est associée à une diminution du marquage du transporteur glutamatergique GLT-1 dans le cerveau de patients MH (Faideau et al., 2010). Chez les modèles murins, la présence de réactivité astrocytaire est plus difficile à mettre en évidence (Tong et al., 2014; Ben Haim et al., 2015a). Des déficits des fonctions astrocytaires sont majoritairement décrits chez ces modèles mais ne sont pas corrélés avec la présence d'astrocytes réactifs. C'est par exemple le cas dans l'étude de Tong et collaborateurs qui met en évidence un défaut de l'homéostasie potassique dans les astrocytes sans observer de réactivité astrocytaire dans les modèles R6/2 et zQ175 de la MH (Tong et al., 2014).

Dans les modèles murins de la MH, la réactivité astrocytaire est très variable. Elle est présente dans certains modèles particulièrement aigus de la MH comme les modèles basés sur des toxines (3-NP ou quinolinate) ou les modèles viraux (de Almeida et al., 2002; Cirillo et al., 2010; Ignarro et al., 2013; Meunier et al., 2016). Chez les modèles transgéniques exprimant un fragment de la mHtt, qui présentent un début précoce et une évolution rapide de la maladie, la réactivité astrocytaire est observée assez tardivement : à 4 mois dans le modèle N171-82Q et à 3 mois chez les souris R6/2 (Heng et al., 2008; Ferrante, 2009) (**Figure 14**). Chez les souris R6/1 qui présentent moins de répétitions CAG et une évolution plus lente que les R6/2, la présence d'astrocytes réactifs n'a pas été montrée (Yu et al., 2003). La réactivité astrocytaire décrite dans la littérature n'a cependant pas été retrouvée dans la colonie de souris N171-82Q de notre laboratoire. Dans les modèles murins plus progressifs de la maladie exprimant la mHtt entière ou les modèles KI, la réactivité astrocytaire n'a pas été observée ou uniquement à des stades très avancés de la maladie. La présence d'astrocytes réactifs a été décrite dans les modèles possédant un nombre élevé de répétitions CAG. Les souris BACHD avec 125 CAG présentent une réactivité astrocytaire à 12 mois (Wegrzynowicz et al., 2015). Dans les modèles KI, les souris HdhQ150 ont des astrocytes réactifs à partir de 14 mois (**Figure 14**) alors que la réactivité astrocytaire n'est pas observée avant 24 mois chez les souris HdhQ111 (Lin et al., 2001; Menalled and Chesselet, 2002; Heng et al., 2008). La réactivité astrocytaire est donc faiblement représentée dans les modèles transgéniques murins de la MH et tardivement contrairement à ce qu'on peut observer chez les patients atteints de la MH.

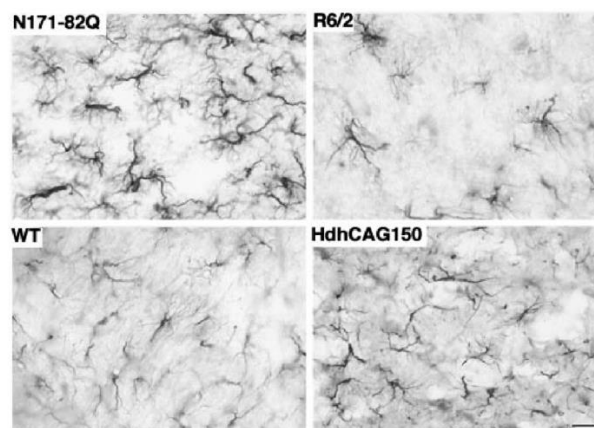


Figure 14- La réactivité astrocytaire est décrite dans quelques modèles murins de la MH. La présence d'astrocytes réactifs GFAP⁺ est observée dans le cerveau des souris transgéniques N171-82Q (4 mois), R6/2 (3 mois) et du modèle KI HdhQ150 (14 mois). (Yu et al., 2003).

La majorité de ces études utilisent la GFAP comme marqueur de réactivité astrocytaire, qui manque peut-être de sensibilité. Comme expliqué précédemment (voir paragraphe II.1.a.i), la GFAP est très faiblement exprimée en condition physiologique dans le striatum. Nous pouvons donc nous demander si l'augmentation du marquage GFAP ne serait visible dans le striatum qu'à des stades avancés de la réactivité astrocytaire. L'utilisation d'autres marqueurs de réactivité, au niveau protéique et transcriptomique (comme par exemple la *serpina3n*), pourrait permettre de détecter plus précocément de la réactivité astrocytaire dans les modèles souris de la MH.

La réactivité astrocytaire est donc un phénomène précoce chez les patients atteints de la MH mais qui n'est pas bien reproduite dans les modèles murins de la maladie. Il est donc difficile d'étudier les astrocytes réactifs dans ces modèles et, par conséquent, de comprendre leur rôle dans l'évolution de la MH.

iii. Les autres partenaires cellulaires de la neuroinflammation

La microglie est un partenaire essentiel des astrocytes au cours de la neuroinflammation. Dans certaines conditions pathologiques, ces cellules microgliales peuvent induire la réactivité astrocytaire en libérant des cytokines (voir paragraphe II.2.b.i) (Liddel et al., 2017). En tant que cellules immunitaires majeures du SNC, la microglie contribue au maintien de l'homéostasie via son activité de phagocytose, la sécrétion de cytokines et l'élimination de synapses en excès (Nimmerjahn et al., 2005; Hanisch and Kettenmann, 2007). Tout comme les astrocytes, la microglie devient réactive dans la MH. L'imagerie par TEP a permis de mettre en évidence une activation microgliale chez les patients présymptomatiques de la MH, qui peut être détectée jusqu'à 15 ans avant l'apparition des premiers symptômes et qui suit ensuite l'évolution de la pathologie (Pavese et al., 2006; Tai et al., 2007a, 2007b; Politis et al., 2015). Les ligands TEP utilisés peuvent également reconnaître la protéine TSPO dans les astrocytes réactifs (Lavis et al., 2012). L'activation microgliale est associée à la surexpression de cytokines inflammatoires comme IL-6, IL-8 et TNF α dans le SNC et dans le plasma de patients MH (Bjorkqvist et al., 2008; Silvestroni et al., 2009; Politis et al., 2015). De plus, l'expression de la mHtt seulement dans la microglie est suffisante pour induire une augmentation de l'expression des gènes pro-inflammatoires (Crotti et al., 2014).

En plus des deux principaux acteurs (astrocytes et microglie), d'autres types cellulaires peuvent également participer à la neuroinflammation comme les oligodendrocytes qui sécrètent aussi des cytokines et chimiokines (Stephenson et al., 2018). En conditions pathologiques, les oligodendrocytes peuvent être à la fois protecteurs en favorisant les processus de régénération mais peuvent également contribuer à la neurodégénérescence s'ils produisent moins de myéline (Stephenson et al., 2018). L'expression de mHtt spécifiquement dans les oligodendrocytes chez la souris entraîne une diminution de l'expression des gènes de synthèse de myéline, une démyélinisation progressive ainsi que l'apparition de symptômes moteurs (Huang et al., 2015). La neuroinflammation dans le SNC peut également s'accompagner de l'activation des cellules immunitaires périphériques telles que les lymphocytes T (Niemelä et al., 2018). De plus, les monocytes et macrophages obtenus à partir du sang de patients MH ne produisent pas plus de

cytokines pro-inflammatoires que les cellules contrôles mais sont hyperactifs suite à une stimulation avec le LPS (Crotti et al., 2014; Trager et al., 2014). Les macrophages et monocytes de modèles de souris et de patients de la MH ont également une capacité migratoire altérée (Kwan et al., 2012). Les cellules immunitaires périphériques semblent donc être plutôt défectueuses dans la MH.

Dans la MH, la majorité des études chez les modèles murins ont montré un défaut des fonctions astrocytaires en l'absence de réactivité astrocytaire franche. Il a été montré que lorsqu'ils deviennent réactifs, les astrocytes perdent plusieurs de leurs fonctions physiologiques et acquièrent de nouvelles fonctions qui peuvent impacter négativement ou positivement la pathologie (Verkhatsky and Nedergaard, 2018). Le rôle délétère ou bénéfique des astrocytes réactifs dans la MH est donc encore controversé (Ben Haim et al., 2015b; Cunningham et al., 2018). Pour mieux comprendre l'impact de cette réactivité astrocytaire dans la MH, il est indispensable d'utiliser des outils permettant de moduler la réactivité astrocytaire *in vivo* et d'étudier les effets de cette modulation sur les caractéristiques pathologiques (Ben Haim et al., 2015a).

c. La voie JAK2-STAT3 contrôle la réactivité astrocytaire dans la maladie de Huntington

i. Activation directe ou indirecte des astrocytes réactifs par la mHtt

Dans la MH, la protéine toxique est la mHtt. L'expression de la mHtt spécifiquement dans les astrocytes grâce à l'utilisation de vecteurs lentiviraux entraînent une augmentation de l'expression de la GFAP et une hypertrophie des astrocytes (Faideau et al., 2010; Ben Haim et al., 2015a) (voir **article 1**). Cette réactivité astrocytaire est directement liée à l'expression de la mHtt puisque l'expression du même fragment de Htt sans un nombre élevé de CAG n'entraîne pas de changement dans les astrocytes (Faideau et al., 2010; Ben Haim et al., 2015a). Ces résultats suggèrent donc que l'action intrinsèque de la mHtt dans les astrocytes peut induire un état de réactivité (**Figure 15**).

Les autres types cellulaires du SNC comme les neurones, la microglie ou les oligodendrocytes, peuvent également interagir avec les astrocytes et induire la réactivité astrocytaire (**Figure 15**). Dans un modèle de souris conditionnelles de la MH, le nombre d'astrocytes réactifs augmente lorsque la mHtt s'exprime dans les neurones et diminue significativement lorsque l'expression de mHtt est éteinte (Yamamoto et al., 2000). De nombreuses molécules de signalisation libérées par les cellules du SNC sont augmentées dans des conditions pathologiques et peuvent influencer l'état des astrocytes.

Le mécanisme précis liant l'accumulation de protéines toxiques et la réactivité astrocytaire reste à déterminer. Les récepteurs cellulaires PPR (Pattern Recognition Receptor) reconnaissant des signaux de danger (appelés DAMPs (danger associated molecular patterns)), comme les protéines toxiques, ont été décrits dans les cellules microgliales, mais leur rôle dans les astrocytes est beaucoup moins connu (Heneka et al., 2014) (**Figure 15**).

ii. Les voies de signalisation activées dans les astrocytes réactifs au cours de la maladie de Huntington

De nombreuses voies de signalisation sont impliquées dans la réactivité astrocytaire et notamment dans les MND comme la voie NF- κ B (Nuclear factor-kappa B), les voies des MAPK (Mitogen-activated protein kinases), la voie CN (Calcineurine)/NFAT (Nuclear factor of activated T-cells) et la voie JAK2-STAT3 (Janus kinase 2-Signal transducer and activator of transcription 3) (Kang and Hebert, 2011; Ben Haim et al., 2015b) (**Figure 15**).

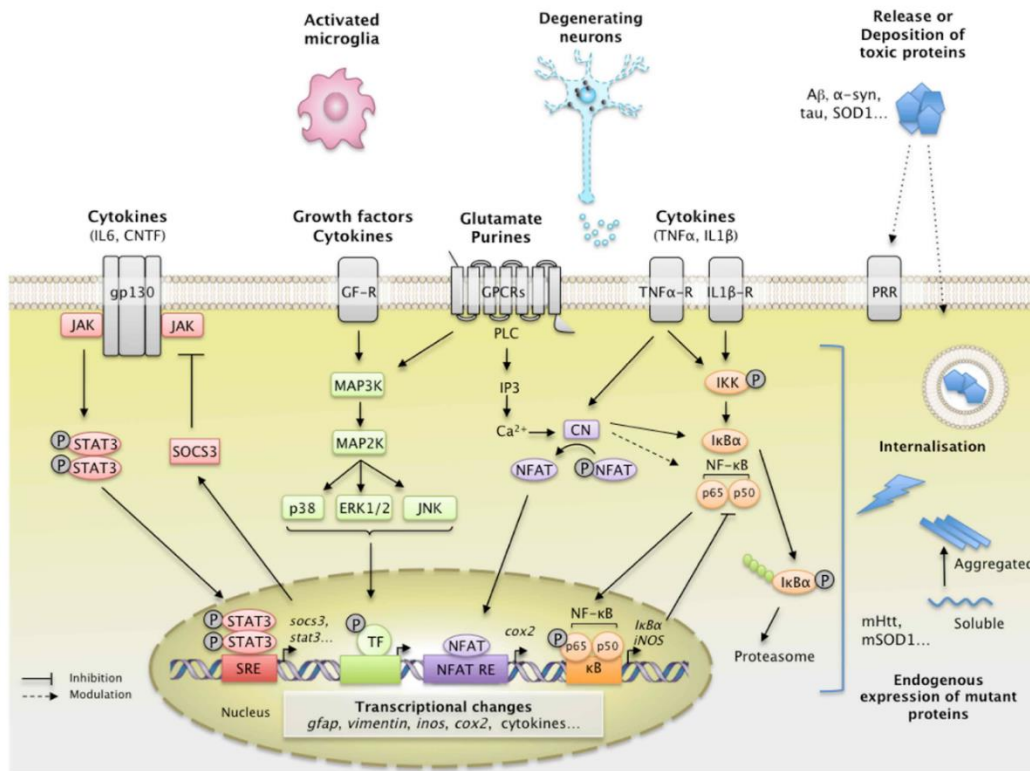


Figure 15- Principaux stimuli et voies de signalisation impliquées dans l'induction de la réactivité astrocytaire au cours des MND. Dans les MND, les différents types cellulaires du SNC (neurones, microglie, astrocytes) sont dysfonctionnels et peuvent libérer différentes molécules de signalisation qui induisent l'activation de voies de signalisation dans les astrocytes : la voie JAK-STAT3 (rouge), la voie des MAPK (vert), la voie CN/NFAT (violet) et la voie NF κ B (orange). Les protéines toxiques, comme la mHtt, exprimées ou internalisées par les astrocytes peuvent interférer avec les différentes voies de signalisation intracellulaires. (Ben Haim et al., 2015b).

La voie de signalisation NF κ B est une voie importante associée à la neuroinflammation. Elle est impliquée dans de nombreux processus cellulaires comme l'inflammation, la réponse immunitaire, la division cellulaire et l'apoptose (Mattson and Camandola, 2001; Mattson and Meffert, 2006). La voie NF κ B est activée au cours des MND et notamment dans la MH. En effet, NF κ B s'accumule dans les noyaux des astrocytes dans le modèle murin R6/2 de la MH et dans le striatum de patients MH (Hsiao et al., 2013; Kim et al., 2015). La mHtt peut également interférer avec cette voie de signalisation. La mHtt interagit avec le complexe inhibiteur (IKK) de la voie et favorise sa dégradation, ce qui induit l'activation de NF κ B (Khoshnan et al., 2004). Cette étude ne précise pas si cette activation peut se produire dans les astrocytes. De plus, l'inhibition de la voie NF κ B dans des modèles cellulaires et de souris de la MH, par la surexpression de mutants, réduit la neurotoxicité et améliore les performances motrices des souris MH (Khoshnan et al., 2004; Hsiao et al., 2013).

Les cytokines inflammatoire, LPS, IL1 et TNF α sont connues pour activer les voies de signalisation NF κ B et CN notamment dans les astrocytes (Kaltschmidt et al., 2005; Furman and Norris, 2014). Il a été montré que l'inhibition de TNF α diminue la réactivité astrocytaire observée dans le cerveau des souris R6/2 (Hsiao et al., 2014). Cependant, les mutants utilisés dans toutes ces études ne sont pas spécifiquement exprimés dans les astrocytes et peuvent donc agir dans plusieurs types cellulaires. D'autres voies de signalisation, notamment la voie MAPK/ERK (Extracellular signal-regulated kinase) ont été étudiées dans le contexte de la MH. Plusieurs études mettent en évidence une activation de la kinase ERK dans des modèles cellulaires et dans le cerveau de souris et de patients atteints de la MH (Apostol et al., 2006; Roze et al., 2008; Kim et al., 2015). D'autres études montrent, à l'inverse, que la mHtt inhibe la voie ERK (Lievens et al., 2005; Ginés et al., 2010). Par exemple, chez la drosophile, l'expression de peptides polyQ bloque l'activation de ERK via le récepteur à l'EGF (Epidermal growth factor) dans les cellules gliales, entraînant ainsi la diminution de l'expression des transporteurs au glutamate (Lievens et al., 2005). Le niveau d'activation (ou d'inhibition) de la voie MAPK/ERK dans la MH sont en réalité très variables en fonction du modèle, du stade de la maladie, de la région cérébrale et du type cellulaire étudiés (Bowles and Jones, 2014). Le rôle de cette voie dans la MH, et notamment dans la réactivité astrocytaire, reste donc à établir.

Bien que plusieurs voies de signalisation soient activées dans plusieurs types cellulaires dont les astrocytes au cours de la MH, aucune étude à ce jour n'a montré que ces voies étaient nécessaires à la réactivité astrocytaire dans cette maladie.

iii. La voie JAK2-STAT3

La voie JAK2-STAT3 est une voie de signalisation ubiquitaire impliquée dans de nombreux processus cellulaires tels que la croissance cellulaire, la prolifération, la différenciation et l'inflammation (**Article3**, Annexe 2). Cette voie est majoritairement responsable de la signalisation des cytokines dans la cellule. La fixation des cytokines à leur récepteur active la kinase JAK2 (**Figure 16**). Une fois activée, JAK2 phosphoryle STAT3 qui s'accumule sous forme de dimère dans le noyau où il active la transcription des gènes cibles (Levy and Darnell, 2002) (**Figure 16**). Notre équipe a montré que cette voie était activée dans les astrocytes réactifs dans plusieurs modèles de MND dont plusieurs modèles murins et primates de la MH (Ben Haim et al., 2015a). En effet, STAT3 s'accumule dans le noyau des astrocytes réactifs du striatum dans des modèles de souris et de primates de la MH. De plus, l'inhibition de JAK2 diminue la réactivité astrocytaire dans le modèle de la MH par injection de quinolinate (Ignarro et al., 2013).

SOCS3 (Suppressor of cytokine signaling 3) inhibe la voie JAK2-STAT3 en se liant simultanément à JAK2 et au récepteur et en agissant comme un pseudo-substrat pour JAK2, ce qui en fait l'inhibiteur le plus efficace et spécifique de cette voie (Kershaw et al., 2013) (**Figure 16**). Notre équipe a développé des vecteurs viraux ciblant spécifiquement cette voie dans les astrocytes. Ces vecteurs viraux surexprimant SOCS3 permettent d'inhiber *in vivo* la voie JAK2-STAT3 dans les astrocytes. La surexpression de SOCS3 par ces vecteurs lentiviraux prévient l'accumulation nucléaire de STAT3, l'hypertrophie du soma et des prolongements astrocytaires et la surexpression de GFAP dans le cerveau de souris modèles de la MH (Ben Haim et al., 2015a). L'ensemble de ces données montrent

que la voie JAK2-STAT3 est nécessaire pour l'activation des astrocytes réactifs dans les modèles de la MH.

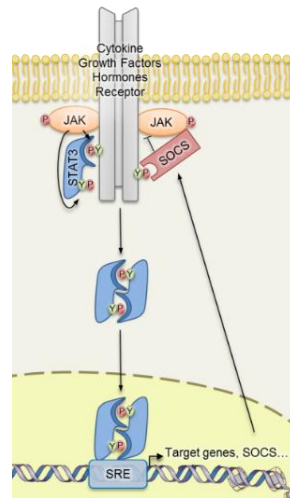


Figure 16- La voie JAK2-STAT3. Des hormones, facteurs de croissances et cytokines (IL-6, CNTF) se fixent sur le récepteur et activent la voie. Les JAKs sont des tyrosine-kinases associées au récepteur qui se transphosphorylent et s'activent. Une fois activée, JAK phosphoryle le récepteur et libère ainsi le site de liaison de STAT3 au récepteur (SH2). Une fois recruté, STAT3 est phosphorylé par JAK2 sur la tyrosine 705. Les protéines P-STAT3 se dimérisent et s'accumulent dans le noyau. Le dimère P-STAT3 se lie alors à des séquences spécifiques nommées « STAT3-responsive element » (SRE) sur le promoteur des gènes cibles et induit leur transcription. Parmi ces gènes cibles, on retrouve les gènes *gfap*, *vimentine* et *socs3*, l'inhibiteur de la voie. Adapté de (Ceyzeriat et al., 2016) (**Article3**, Annexe 2).

Notre équipe a écrit une revue détaillée, dont je suis second auteur, sur la voie JAK-STAT3 et notamment sur son importance dans la réactivité astrocytaire (Ceyzeriat et al., 2016) (voir **Article 3**, Annexe 2).

Depuis leur découverte, les cellules gliales sont passées de simple tissu conjonctif à acteurs indispensables au bon fonctionnement du SNC. Les astrocytes jouent un rôle essentiel de support pour les neurones en maintenant l'homéostasie du SNC et en fournissant un support métabolique et trophique aux neurones. De plus, les astrocytes participent activement à la transmission synaptique. Ces nombreuses fonctions leur permettent de réagir face à un changement de leur environnement. En effet, en conditions pathologiques, et notamment dans la MH, les astrocytes deviennent réactifs. Cependant, cette réactivité astrocytaire est faiblement reproduite chez les modèles murins de la MH, ce qui rend difficile son étude. Il est donc nécessaire d'utiliser des modèles qui reproduisent mieux la réactivité astrocytaire ainsi que des approches astrocyte-spécifiques afin de mieux comprendre cette réactivité. Notre équipe a notamment développé des vecteurs viraux ciblant la voie JAK2-STAT3 spécifiquement dans les astrocytes afin de moduler la réactivité astrocytaire *in vivo* (Ben Haim et al., 2015a) (**Articles 1 et 2**) Ces outils nous permettent d'évaluer la contribution des astrocytes réactifs dans la MH, et notamment sur l'agrégation de la mHtt, une caractéristique pathologique majeure de la MH.

III. L'agrégation et les systèmes de protéostasie dans la maladie de Huntington

1. Agrégation

a. Définition

L'agrégation commence dès lors que deux ou plusieurs protéines ou fragments de protéines anormales s'assemblent (Ross and Poirier, 2005a). Ces protéines ou peptides mal conformés exposent à leur surface des régions hydrophobes, normalement cachées lorsque ces protéines sont correctement repliées (Dobson, 2003; Hartl et al., 2011). Le milieu intracellulaire étant hydrophile, ces régions hydrophobes interagissent les unes avec les autres et favorisent ainsi leur oligomérisation (Takalo et al., 2013). Le noyau d'agrégation ainsi formé, se polymérise par la suite pour former des oligomères solubles ou agrégats préfibrillaires : c'est la première étape du processus d'agrégation. Ces oligomères vont ensuite former des polymères plus structurés appelés protofilaments ou protofibrilles puis des agrégats fibrillaires très ordonnés, appelés amyloïdes, riches en feuillets β . L'ordre des événements dans ce processus d'agrégation est mal connu (Ross and Poirier, 2005a). Les fibrilles amyloïdes peuvent se former par addition linéaire de monomères passant par les stades d'oligomères et de protofibrilles jusqu'aux fibrilles. Autre alternative, une série de processus d'agrégation peuvent avoir lieu en parallèle : les monomères peuvent s'accumuler pour former directement les fibrilles ou peuvent former des espèces alternatives d'agrégation (Ross and Poirier, 2005a) (**Figure 17a**). Des monomères de différentes natures, les oligomères ou les protofibrilles peuvent par exemple former des oligomères annulaires ou sphériques (Wacker et al., 2004). Des agrégats amorphes, qui ne contiennent pas de fibrilles, peuvent également se former probablement via les intermédiaires oligomériques ou la précipitation de monomères (Ross and Poirier, 2005a). Si un agrégat devient assez large, il peut être visualisé par microscopie optique. Les gros agrégats bien délimités dans la cellule sont souvent appelés inclusions (Ross and Poirier, 2005a).

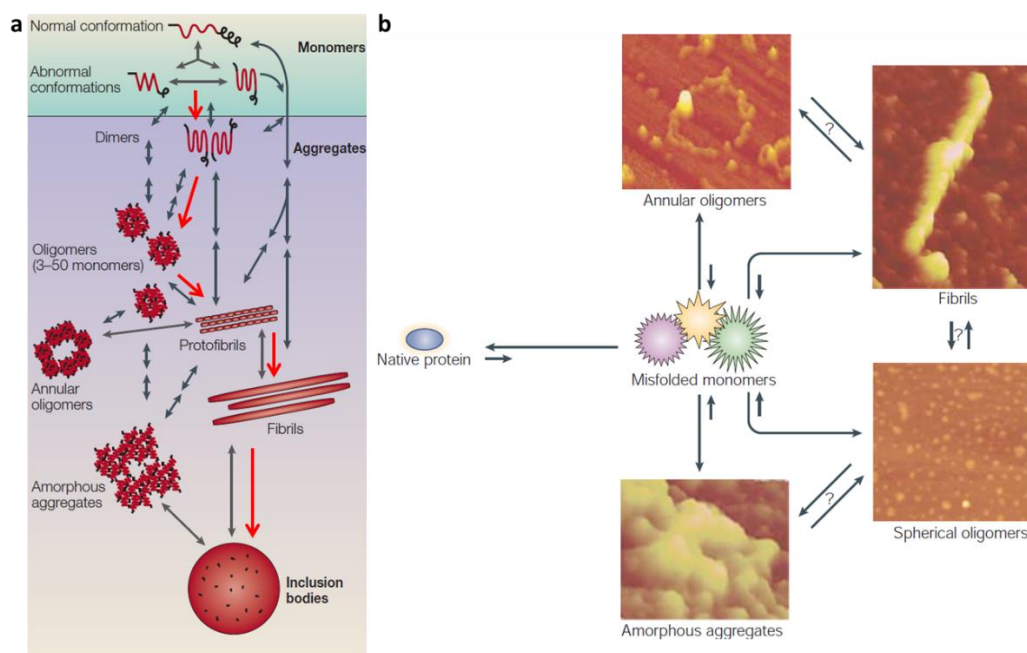


Figure 17- Les différentes espèces d'agrégation. (a) Potentielles voies de formation des agrégats. Les monomères peuvent s'additionner linéairement en passant par les oligomères et les protofibrilles (flèches rouges) ou peuvent directement former les fibrilles et former en parallèle d'autres espèces d'agrégation (flèches grises). Adapté de **(Ross and Poirier, 2005a)**. (b) La mHtt mal conformée peut former différents états d'agrégation. (Muchowski and Wacker, 2005).

Un déséquilibre entre la production, le bon repliement et l'élimination des protéines entraîne l'accumulation de protéines mal conformées et ainsi la formation de ces agrégats amyloïdes (Bose and Cho, 2017). En général, les protéines mal conformées sont plutôt inactives et les problèmes engendrés par la mauvaise conformation sont dus à une perte de fonction. Cependant, ces protéines mal conformées peuvent se rassembler, comme décrit ci-dessus, en agrégats ordonnés qui interagissent de façon inappropriée avec les autres composants cellulaires altérant ainsi un grand nombre de fonctions cellulaires (la transmission synaptique, les fonctions mitochondriales, la transcription et la signalisation cellulaire) et la viabilité cellulaire (Stefani and Rigacci, 2013). Une cinquantaine de maladies, avec des symptômes très variés, sont associées à une mauvaise conformation de peptides ou protéines et à leurs agrégats (Knowles et al., 2014). Les fibrilles amyloïdes sont des structures classiquement retrouvées dans ces maladies et notamment dans les maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer (MA), de Parkinson (MP) et de Huntington (MH) qui sont également appelées protéinopathies (Bose and Cho, 2017; Cox et al., 2018). Malgré les différences de tailles et de séquences des protéines à l'origine de l'agrégation dans ces maladies, les lésions caractéristiques de chaque pathologie contiennent des fibrilles de type amyloïde avec des caractéristiques biochimiques communes comme l'insolubilité aux détergents, leur teneur en feuillets β et la capacité à lier des colorants lipophiles comme le rouge Congo (Ross and Poirier, 2005a).

b. L'agrégation dans la maladie de Huntington

i. Agrégats de mHtt

Les agrégats de mHtt retrouvés dans la MH sont des structures très organisées (Poirier et al., 2002). Des études biochimiques ont montré que la mHtt forme des agrégats répondant aux caractéristiques des fibrilles amyloïdes alors que la Htt sauvage ne s'agrège pas (Scherzinger et al., 1997). En effet, des agrégats purifiés à partir de cerveau de patient MH lient le rouge Congo : ces agrégats ont donc une structure amyloïde. Au cours de leur formation, plusieurs intermédiaires ont été identifiés suggérant un processus séquentiel classique d'agrégation de la mHtt des monomères jusqu'aux fibrilles en passant par les oligomères et les protofibrilles (Poirier et al., 2002). De plus, une étude utilisant la microscopie à force atomique a montré que la mHtt peut également s'assembler en oligomères sphériques et annulaires ou en agrégats amorphes (Wacker et al., 2004) (**Figure 17b**).

Des analyses post-mortem de cerveaux de patients MH, mais également des études utilisant des modèles cellulaires et murins, montrent que les agrégats contiennent majoritairement des fragments N-terminaux de la mHtt (DiFiglia et al., 1997; Gutekunst et al., 1999; Schilling et al., 2007). Plusieurs études montrent que la région polyQ de la mHtt constitue le cœur amyloïde des agrégats alors que les régions autour (les 17 premiers acides aminés et la région riche en proline) réguleraient son agrégation (Bugg et al., 2012). Des fragments de mHtt de tailles variables ont été décrits dans le cerveau de patients MH, de modèles de souris et dans des systèmes de culture cellulaire (DiFiglia et al., 1997; Mende-Mueller et al., 2001; Lunkes et al., 2002). Plusieurs études montrent que les fragments de mHtt sont responsables de la toxicité neuronale et suffisants pour induire la MH (Davies et al., 1997; Schilling et al., 1999; Wellington et al., 2000; Ratovitski et al., 2009). De plus, l'apparition des caractéristiques pathologiques de la MH est accélérée dans les modèles murins exprimant un fragment N-terminal de la mHtt comparés à ceux exprimant la forme entière de la mHtt (Mangiarini et al., 1997; Schilling et al., 1999; Menalled et al., 2003; Gray et al., 2008b). Il a été montré que les fragments N-terminaux de la mHtt s'agrègent préférentiellement (Ross and Tabrizi, 2011). La toxicité liée aux fragments de la mHtt dépend de la taille de ces fragments. En effet, le fragment contenant les 171 premiers acides aminés de la mHtt avec 82 répétitions glutamine, N171-82Q, est plus toxique pour les cellules que les fragments N233-82Q et N120-82Q (Juenemann et al., 2011). La mHtt peut également être clivée par des caspases (caspases 2, 3 et 6), des calpaïnes, la cathepsine D, la metalloprotéinase-10 (MMP-10) et la thrombine au niveau de différents sites dans les 600 premiers résidus de sa partie N-terminale (Wellington et al., 2000; Kim et al., 2001; Gafni and Ellerby, 2002; Lin et al., 2007; Miller et al., 2010) (**Figure 5**). Les clivages de la mHtt par les caspases et calpaïnes joueraient notamment un rôle important dans son agrégation. En effet, la mutation de deux sites de clivages de calpaïnes dans la mHtt engendre une protéine qui s'agrège moins et dont la toxicité est diminuée dans un modèle de culture cellulaire (Gafni et al., 2004). De plus, le clivage de la mHtt par la caspase 6 est un clivage initial critique pour les autres clivages suivants et le développement de la MH (Graham et al., 2006). Au moins deux plus petits fragments N-terminaux de la mHtt, appelés cp-A et cp-B, ont été décrits (Lunkes et al., 2002; Kim et al., 2006). La ou les protéase(s) responsable(s) de la production de ces deux fragments appartiendraient à la famille des

aspatyl endopeptidases comme la cathepsine D. Des expériences d'immunomarquage ont montré que cp-A est présent dans les agrégats nucléaires alors que cp-B, de plus grande taille, est détecté au niveau des agrégats cytoplasmiques (Lunkes et al., 2002). Une étude a également montré que les neurones sont capables de générer ces deux fragments *in vivo* (Kegel et al., 2010).

ii. Modulation de l'agrégation et ubiquitination

L'agrégation de la mHtt est influencée par des facteurs intrinsèques comme la longueur de la queue polyglutamine, les séquences entourant la queue polyglutamine et la conformation du monomère de mHtt (Stefani and Rigacci, 2013; Arndt et al., 2015). Ces séquences moduleraient à la fois le taux et le mode d'agrégation de la mHtt ainsi que la stabilité des agrégats. Les 17 premiers acides aminés favoriseraient la formation de fibrilles alors que la séquence polyP inhiberait plutôt l'agrégation (Shen et al., 2016; Chen and Wolynes, 2017). Les mécanismes précis de régulation sont encore incompris. L'utilisation de la microscopie à force atomique a permis de mettre en évidence la présence simultanée de différentes conformations de monomères de mHtt dont certaines sont plus enclin à s'agréger que d'autres (Wacker et al., 2004).

L'agrégation de la mHtt peut également être modulée par des facteurs extrinsèques. Les protéines partenaires de la Htt sont très nombreuses et sont impliquées dans des processus cellulaires divers comme le transport de vésicules, la régulation transcriptionnelle, l'endocytose et le contrôle-qualité des protéines (Harjes and Wanker, 2003; Kaltenbach et al., 2007). L'expression de ces protéines peut influencer la formation des agrégats de mHtt par différents mécanismes (Arrasate and Finkbeiner, 2012). Par exemple, l'activité des protéines impliquées dans l'homéostasie protéique (protéines chaperonnes, système ubiquitine-protéasome et autophagie) peut jouer sur la conformation et la dégradation de la mHtt. Les protéines responsables des modifications post-traductionnelles de la mHtt comme la phosphorylation, l'ubiquitination, la sumoylation ou l'acétylation influencent également le ciblage de la mHtt vers les systèmes de dégradation de la cellule et donc la formation des agrégats de mHtt (Arrasate and Finkbeiner, 2012).

L'accumulation d'ubiquitine au niveau des agrégats de mHtt est observée dans le cerveau de patients et de modèles de la MH (DiFiglia et al., 1997; Gutekunst et al., 1999) (**Figure 19b**). Cela pourrait être dû à l'agrégation de la mHtt ubiquitinylée. Cependant, la mHtt soluble a une longue demi-vie dans la cellule, suggérant que la mHtt n'est pas efficacement ubiquitinylée pour être dégradée par le protéasome (Juenemann et al., 2013; Tsvetkov et al., 2013). Seulement un faible pourcentage de la mHtt serait en effet ubiquitinylée (Hipp et al., 2012). A l'inverse, les fragments de mHtt agrégés sont polyubiquitinylés. L'ubiquitination pourrait donc s'effectuer une fois que la mHtt est séquestrée dans les agrégats (Juenemann et al., 2015). En effet, il a été montré que l'ubiquitination des protéines ne serait pas indispensable à leur agrégation (Bersuker et al., 2016). L'ubiquitination et l'agrégation de la mHtt sont donc deux processus indépendants et temporellement dissociés. L'agrégation de la mHtt est un processus rapide suivi de l'ubiquitination, soit par ubiquitination directe de la mHtt, soit par recrutement de protéines ubiquitinylées dans les agrégats (Gong et al., 2012; Skibinski and Boyd, 2012). De plus, Juenemann a récemment démontré

le recrutement dynamique des enzymes d'ubiquitination et de déubiquitination dans les agrégats (Juenemann et al., 2018).

Des ubiquitinations atypiques qui stabilisent l'agrégation de la mHtt ont également été observées au cours de la MH. Par exemple, Ube2W est une enzyme de conjugaison de l'ubiquitine E2 (voir paragraphe III.2.a), dont la particularité est d'ubiquitinyler ses substrats au niveau de leur partie N-terminale et de favoriser les fragments N-terminaux désordonnés (Scaglione et al., 2013; Tatham et al., 2013; Vittal et al., 2015). Wang et collaborateurs ont montré que l'absence de cette enzyme diminue la formation d'agrégats ou d'oligomères insolubles de la mHtt et augmente le niveau cellulaire de mHtt soluble dans des modèles de culture cellulaire et de souris de la MH (Wang et al., 2018). Un autre exemple est l'ubiquitine ligase E3 WWP1 dont l'expression régule positivement le niveau de mHtt, la formation d'agrégats et la toxicité cellulaire de la mHtt (Lin et al., 2016).

iii. Les agrégats de mHtt : bénéfiques ou délétères ?

L'agrégation protéique a des conséquences importantes sur le fonctionnement de la cellule. Plusieurs études montrent que les agrégats de mHtt sont toxiques alors que d'autres montrent au contraire qu'ils sont protecteurs, ou encore qu'ils pourraient avoir les deux rôles. Le rôle des agrégats de mHtt reste donc controversé (Ross and Poirier, 2005b; Arrasate and Finkbeiner, 2012; Soares et al., 2018).

Dans les premières études, les agrégats dans les modèles murins et chez les patients MH sont étroitement corrélés aux symptômes de la MH (Davies et al., 1997). Plusieurs hypothèses peuvent expliquer le rôle toxique de ces agrégats (Arrasate and Finkbeiner, 2012). L'agrégation de la mHtt peut aussi entraîner la séquestration de la Htt sauvage et ainsi perturber les nombreuses fonctions physiologiques auxquelles elle participe (voir paragraphe I.3) (Busch et al., 2003). De plus, les agrégats de mHtt peuvent également co-agréger d'autres protéines essentielles au fonctionnement cellulaire comme les facteurs de transcription, les chaperonnes ou des composants du protéasome, ce qui engendre des dérégulations transcriptionnelles et des défauts d'homéostasie cellulaire affectant la survie neuronale (Schaffar et al., 2004; Hosp et al., 2017). Cependant, des études ont montré que certaines protéines garderaient leur activité même une fois liées aux agrégats (Schipper-Krom et al., 2014). Enfin, des stratégies de réduction de l'agrégation par des inhibiteurs peptidiques ou chimiques ont montré une amélioration des troubles moteurs, de l'atrophie ou de la dégénérescence neuronale dans des modèles animaux de la MH (Nagai et al., 2003; Zhang et al., 2005; Takeuchi and Nagai, 2017). Cependant, ces molécules pourraient agir en modulant le niveau de mHtt soluble et donc indirectement impacter la formation des agrégats (Chopra et al., 2007).

En effet, plusieurs études montrent, au contraire, que les agrégats de mHtt seraient protecteurs en piégeant la protéine soluble mHtt mal conformée qui serait la forme la plus toxique (Ross and Poirier, 2005a). Plusieurs observations confirment cette hypothèse. Tout d'abord, les agrégats de mHtt se forment dans le striatum, qui subit une forte dégénérescence au cours de la MH, mais sont également très présents dans le cortex cérébral qui est sujet à une plus faible dégénérescence (Gutekunst et al., 1999). De plus, dans le striatum, les agrégats sont majoritairement

observés dans les interneurons par rapport aux SPNs qui meurent préférentiellement dans la MH (Kuemmerle et al., 1999). Les agrégats de mHtt ne sont donc pas uniquement présents dans la sous-population neuronale la plus affectée dans la MH. De plus, dans un modèle de la MH de culture primaire de neurones striataux, plusieurs expériences ont permis de mettre en évidence que la formation d'agrégats est dissociée de la mort neuronale (Saudou et al., 1998). Le laboratoire de Finkbeiner a développé une technique d'imagerie de cellules vivantes permettant de suivre individuellement les neurones en culture. Cette technique a permis de prouver que les neurones formant des agrégats meurent moins que ceux qui n'en forment pas (Arrasate et al., 2004). Cette étude montre également que la formation d'agrégats diminue aussi le niveau de mHtt soluble, ce qui suggère que les agrégats réduisent la concentration de mHtt soluble en la séquestrant. D'autres études dans des modèles murins de la MH ont confirmé que les agrégats de mHtt ne sont pas liés à la toxicité observée dans la MH (Arrasate and Finkbeiner, 2012).

Mais une des questions importantes est de savoir si l'espèce toxique de la mHtt est le monomère mal conformé ou une forme soluble d'agrégats comme les oligomères ou les protofibrilles (Ross and Poirier, 2005a). Plusieurs études reportent que la présence de formes oligomériques solubles serait la cause de la cytotoxicité observée dans la MH plutôt que les monomères de mHtt (Sánchez et al., 2003; Takahashi et al., 2008; Leitman et al., 2013). Par exemple, en utilisant la microscopie confocale FRET (fluorescence resonance energy transfer), Takahashi et collaborateurs montrent que les cellules neuronales contenant les oligomères de mHtt meurent plus rapidement que ceux contenant les monomères ou agrégats de mHtt (Takahashi et al., 2008). Les agrégats de mHtt pourraient donc être protecteurs en recrutant et neutralisant les formes oligomériques toxiques (Saudou et al., 1998; Arrasate et al., 2004; Takahashi et al., 2008). D'autres études proposent également que les oligomères sphériques et annulaires jouent un rôle dans les dysfonctions et la mort neuronale dans les MND (Caughey and Lansbury, 2003).

Les mécanismes par lesquels les oligomères solubles exercent leur toxicité semblent impliquer des interactions aberrantes entre les oligomères et des composants essentiels au bon fonctionnement cellulaire (Cox et al., 2018). En effet, une étude de l'interactome des oligomères solubles et des agrégats insolubles de mHtt montre que l'interactome des oligomères soluble est très complexe (Kim et al., 2016). On y retrouve des protéines de liaison à l'ARN, des protéines impliquées dans la biogenèse des ribosomes, dans la transcription, dans la traduction et dans le transport de vésicules, ce qui suggère que les oligomères interfèrent avec des mécanismes cellulaires centraux. A l'inverse, les agrégats sont moins interactifs et sont fortement associés avec les protéines du contrôle-qualité cellulaire comme la chaperonne Hsp40 et des facteurs impliqués dans le système de dégradation Ubiquitine-Protéasome (Kim et al., 2016). Les agrégats de mHtt pourraient donc également en partie contribuer aux dysfonctions cellulaires en séquestrant des composants du système d'homéostasie cellulaire comme expliqué au début de ce paragraphe (Qin and Gu, 2004).

Il existe donc deux modèles opposés pour expliquer la relation entre la formation des agrégats de mHtt et la toxicité liée à la mHtt (**Figure 18**). Le rôle des agrégats de mHtt est donc controversé avec d'un côté des agrégats toxiques qui interféreraient avec l'activité cellulaire en séquestrant avec la mHtt d'autres protéines essentielles, et de l'autre, des agrégats plutôt protecteurs en piégeant les oligomères solubles qui seraient les formes les plus toxiques. Cependant, il est techniquement compliqué de détecter les changements de conformation de la mHtt et l'oligomérisation *in vivo* et donc d'évaluer leurs conséquences pathologiques (Arrasate and Finkbeiner, 2012). De nouveaux outils deviennent disponibles comme des anticorps spécifiques contre une conformation donnée pouvant différencier les formes monomériques et oligomériques de la mHtt (Kayad et al., 2003; Peters-Libeu et al., 2005; Legleiter et al., 2009). D'autres molécules sensibles à la conformation de la mHtt permettent également de distinguer les monomères et les oligomères dans des cellules en culture (Ramdzan et al., 2010). Une étude récente a notamment utilisé cet outil et a montré que la mHtt soluble cause une hyperpolarisation de la membrane mitochondriale, ce qui provoque une augmentation de la production d'espères réactives de l'oxygène et induit l'apoptose (Ramdzan et al., 2017) (**Figure 18**). En se formant, les agrégats de mHtt réduisent ce potentiel mitochondriale et évitent l'apoptose mais co-agrègent également d'autres composants essentiels pour le métabolisme cellulaire et provoquent un état de quiescence de la cellule jusqu'à sa mort lente par nécrose (Ramdzan et al., 2017). Une autre étude a également montré que la capacité des cellules à former de larges agrégats et le temps de survie de ces cellules étaient corrélés (Gong et al., 2008). Les agrégats seraient donc dans un premier temps protecteurs en piégeant la forme soluble toxique de la mHtt puis en grossissant, ces agrégats deviendraient toxiques en séquestrant des composants cellulaires essentiels.

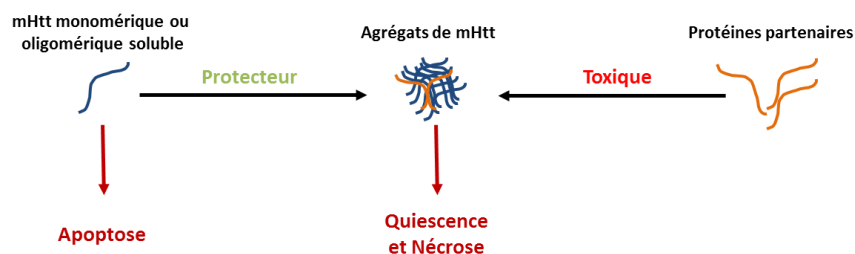


Figure 18- Les différentes hypothèses sur le double rôle des agrégats de mHtt. Les agrégats peuvent être à la fois délétères en séquestrant les protéines partenaires de la mHtt avec d'importantes fonctions cellulaires (facteur de transcription, chaperonnes...) et bénéfiques en piégeant la forme toxique de la mHtt qui induit l'apoptose. Cependant, les agrégats mènent à plus long terme à la mort cellulaire par nécrose. Adaptée de (Ramdzan et al., 2017).

iv. Localisation et transfert de la mHtt

Localisation intra et intercellulaire

Avec l'expansion de la queue polyQ, la mHtt devient insoluble et forme des agrégats dans le noyau cellulaire et le cytoplasme, à la fois dans la région périnucléaire et les neurites (Davies et al., 1997; DiFiglia et al., 1997; Gutekunst et al., 1999) (**Figure 19a et b**). Dans le cerveau de patients MH, les agrégats dans les prolongements cytoplasmiques sont plus abondants que les agrégats nucléaires dans les premiers stades de la maladie (DiFiglia et al., 1997; Gutekunst et al., 1999). Le défaut de

transport intracellulaire provoqué par les agrégats de mHtt pourrait expliquer l'accumulation préférentielle de la mHtt dans les prolongements neuronaux (Gunawardena et al., 2003; Trushina et al., 2004; Reddy and Shirendeb, 2012). De plus, une étude a récemment mis en évidence que les processus d'élimination de la mHtt sont moins efficaces au niveau de ces prolongements que dans le corps cellulaire des neurones (Zhao et al., 2016).

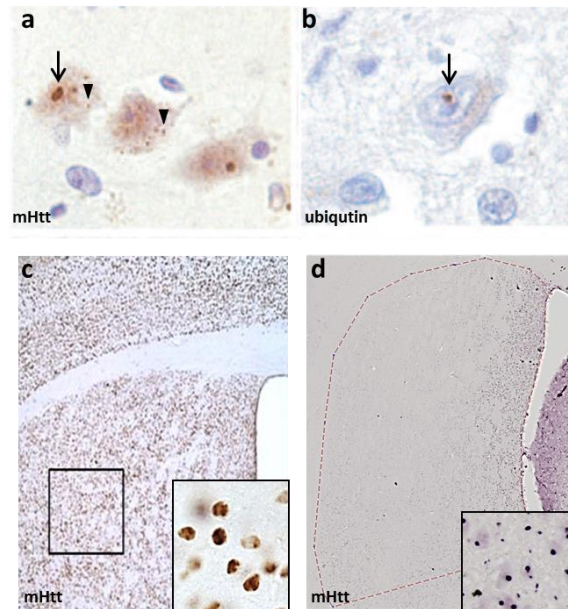


Figure 19- Différentes localisations des agrégats de mHtt. a-b. Les agrégats de mHtt se forment dans le noyau (flèche) et dans le cytoplasme (pointe) des cellules (a) et sont ubiquitinylés (b) dans le cortex de patients atteints de la MH. Adapté de (Ross and Poirier, 2005a). c-d. Dans les modèles murins de la MH, les agrégats de mHtt présentent des différences de taille et de localisation. De larges agrégats sont présents dans le cortex et le striatum des souris N171-82Q (c) alors que de petits agrégats sont présents seulement dans le striatum de souris Hdh140 (d).

Chez les patients atteints de la MH, les agrégats de mHtt sont majoritairement observés dans le cortex et le striatum (DiFiglia et al., 1997). Dans les modèles murins, la localisation des agrégats peut être variable, par exemple les souris KI Hdh140 présentent de petits agrégats principalement dans le striatum alors que dans les souris transgéniques N171-82Q se forment de gros agrégats corticaux et striataux (Schilling et al., 1999; Menalled et al., 2003) (**Figure 19c et d**).

Chez les patients MH, des agrégats sont également observés dans les cellules gliales mais beaucoup moins fréquemment que dans les neurones (Shin et al., 2005) (**Figure 20a**). Une étude de Jansen a notamment évalué le nombre d'agrégats de mHtt nucléaire dans les neurones et les cellules gliales dans le cerveau de modèles murins transgéniques et KI et de patients MH (Jansen et al., 2017). Ils ont montré que les agrégats nucléaires de mHtt étaient présents dans les neurones mais également dans les astrocytes, la microglie et les oligodendrocytes mais avec des fréquences très différentes (**Figure 20b**). En effet, dans les stades avancés de la maladie, environ 30 à 50% des agrégats sont dans les neurones, 30% dans les cellules gliales S100 β positive, 4 à 10% dans les astrocytes GFAP, 3 à 10% dans les oligodendrocytes et 0 à 2% dans la microglie. De plus, seuls les agrégats neuronaux s'élargissent en fonction de la progression de la maladie. Ces agrégats nucléaires dans les neurones persistent donc pendant une longue période dans le temps et l'augmentation de

leur taille peut être due à la séquestration de la mHtt nouvellement synthétisée mais également à la séquestration d'autres protéines partenaires. Les agrégats de mHtt dans les cellules gliales ne changent pas de taille, ces cellules ont donc une meilleure capacité à contenir les agrégats.

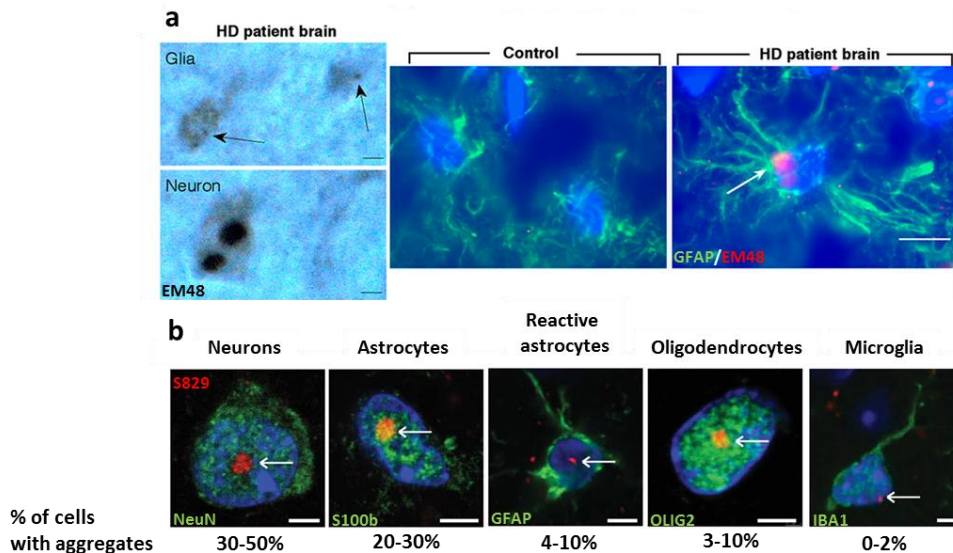


Figure 20- Les agrégats de mHtt sont présents dans différents types cellulaires. **a.** Dans le cerveau de patients MH, les agrégats de mHtt (EM48) sont observés dans les astrocytes (GFAP) mais sont majoritairement présents dans les neurones. (Shin et al., 2005). **b.** La fréquence des agrégats de mHtt (S829) est différente en fonction des types cellulaires. Adaptée de (Jansen et al., 2017).

Le nombre d'agrégats de mHtt peut être corrélé au niveau protéique de mHtt disponible dans la cellule, qui est régulé par la synthèse et la dégradation de la mHtt. Les différences de proportion des agrégats entre les neurones et les cellules gliales pourraient donc en partie s'expliquer par des capacités de dégradation de la mHtt différentes entre les types cellulaires du SNC (Jansen et al., 2017). C'est par exemple le cas des astrocytes qui dégradent plus efficacement la mHtt que les neurones (Tydlacka et al., 2008; Zhao et al., 2016) (voir paragraphe III.5). Ces différences de protéolyse peuvent même se retrouver au sein d'un même type cellulaire. En effet, le marqueur S100 β marque majoritairement les astrocytes alors que dans le striatum la GFAP marque les astrocytes réactifs. Dans les cellules GFAP, les agrégats sont moins fréquents que dans les cellules S100 β positives (Jansen et al., 2017) et il a été observé que les astrocytes réactifs surexprimaient des composants des systèmes de protéostasie cellulaire comme certaines sous-unités de l'immunoprotéasome et des protéines chaperonnes (Orre et al., 2014) (voir paragraphe III.5).

Le transfert intercellulaire de la mHtt

De récentes études ont également suggéré que la mHtt agrégée pouvait aussi se propager entre cellules et entre régions et ainsi répandre l'agrégation dans des cellules ou régions non-affectées (Walker and LeVine, 2012). La présence d'agrégats de mHtt dans des allogreffes faites dans le striatum de patients atteints de la MH prouve que le transfert de la mHtt est possible *in vivo* (Cicchetti et al., 2014).

Pour étudier la sécrétion de la mHtt, plusieurs modèles expérimentaux, de culture cellulaire et *in vivo* de drosophile et de souris, exprimant la Htt sauvage et la mHtt ont été développés (Pecho-Vrieseling et al., 2014; Babcock and Ganetzky, 2015; Jeon et al., 2016). Ces études montrent une sécrétion préférentielle de la mHtt. En effet, son niveau extracellulaire est supérieur à celui de la protéine sauvage (Babcock and Ganetzky, 2015; Trajkovic et al., 2017). Une fois libérée, la mHtt entre dans une nouvelle cellule et entraîne l'agrégation des protéines solubles présentes dans cette cellule réceptrice (Ren et al., 2009; Tan et al., 2015; Ast et al., 2018).

Les protéines peuvent être sécrétées dans le milieu extracellulaire par plusieurs mécanismes appartenant aux voies de sécrétion conventionnelles ou non-conventionnelles. La voie de sécrétion appelée conventionnelle utilise un peptide signal présent dans la protéine qui est transloquée de la lumière du réticulum endoplasmique jusqu'à l'appareil de Golgi puis des vésicules dérivées de l'appareil de Golgi fusionnent avec la membrane plasmique libérant ainsi la protéine dans l'environnement extracellulaire (Lee et al., 2004). Les protéines sécrétées peuvent également emprunter plusieurs autres voies alternatives, appelées voies non conventionnelles, par transfert via des vésicules extracellulaires (exosomes) ou sous forme libre. Les formes libres des protéines peuvent être sécrétées par translocation à travers la membrane plasmique, par exocytose via les endolysosomes ou même via le processus d'autophagie (Andrews, 2000; Ponpuak et al., 2015) (**Figure 21**). Les neurones peuvent également utiliser les synapses pour sécréter des protéines. Enfin, plusieurs types cellulaires, dont les neurones et les astrocytes, forment des nanotubes afin d'effectuer des échanges intercellulaires de protéines (Abounit and Zurzolo, 2012).

Bien que les mécanismes précis ne soient pas complètement compris, plusieurs voies de transfert de la mHtt agrégée ont été proposées (Tang, 2018). La mHtt pourrait être sécrétée via les synapses (Pecho-Vrieseling et al., 2014), le transport vésiculaire (Babcock and Ganetzky, 2015), les exosomes (Jeon et al., 2016; Zhang et al., 2016), les endolysosomes tardifs (Trajkovic et al., 2017) et la formation de nanotubes (Costanzo et al., 2013). Ces études montrent principalement le transfert de la mHtt entre deux neurones mais récemment, la possibilité de transfert entre les neurones et les autres types cellulaires du SNC a été mise en évidence. En effet, une étude a récemment montré dans un modèle de drosophile de la MH que la propagation de la mHtt pourrait également se faire par phagocytose des agrégats de mHtt par la glie (Pearce et al., 2015). Ces agrégats provoquent l'agrégation de la Htt sauvage soluble présente dans la glie et entraînent ainsi la dissémination de la pathologie. Ce processus de phagocytose de la glie est médiée par le récepteur de la drosophile Draper, analogue aux récepteurs MEGF10 et MERTK chez les mammifères (Pearce et al., 2015). Les agrégats de mHtt pourraient être phagocytés avec la membrane des axones environnant par la glie via un mécanisme similaire à celui par lequel les synapses en surnombre sont éliminées par les astrocytes via les récepteurs MEGF10 et MERTK chez les mammifères (Chung et al., 2013).

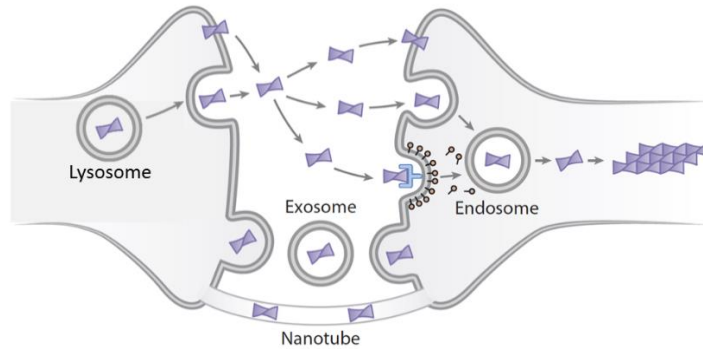


Figure 21- Les différentes voies non conventionnelles de transfert de protéines. Les protéines peuvent être sécrétées des cellules sous forme libre ou dans des vésicules. Les formes libres sont excrétées via la translocation de la membrane plasmique ou via le système endolysosomal. Les protéines peuvent également être sécrétées via des vésicules extracellulaires comme des exosomes ou encore via des nanotubes. Adaptée de (Goedert et al., 2014).

D'un point de vue anatomopathologique, la MH se caractérise donc par la présence d'agrégats intracellulaires de mHtt. La toxicité de ces agrégats dépend de leur nature, leur localisation ainsi que du stade de la pathologie. Ces agrégats sont majoritairement présents dans les neurones. Cela peut s'expliquer par 1/ une incapacité des neurones post-mitotiques à diluer la protéine toxique via les divisions cellulaires ; 2/ une plus faible efficacité de protéolyse dans les neurones ; 3/ un défaut des systèmes de protéolyse à détecter la mHtt et les agrégats ; 4/ une combinaison de l'ensemble de ces facteurs (San Gil et al., 2017). Plusieurs mécanismes d'élimination des protéines existent au sein du SNC (Boland et al., 2018). Dans les cellules, les trois principales voies de protéolyse sont les systèmes Ubiquitine-Protéasome (UPS), d'Autophagie-Lysosome ou macroautophagie, et l'autophagie-médiée par les chaperonnes (CMA) (**Figure 22**).

En condition physiologique, la balance entre la synthèse et la dégradation des protéines est essentielle pour le maintien de l'homéostasie protéique cellulaire, également appelée protéostasie (Pierzynowska et al., 2018). Les systèmes de protéolyse cellulaire jouent un rôle central dans ce contrôle qualité des protéines en dégradant efficacement les constituants dysfonctionnels de la cellule (Cortes and La Spada, 2014). La présence d'agrégats neuronaux dans le cerveau de patients ou de modèles de la MH suggère un défaut de ces systèmes d'homéostasie protéique, mais les mécanismes sous-jacents sont toujours mal compris : est-ce un mécanisme acteur dans la pathogenèse de la MH ou plutôt une conséquence suite au déclenchement de la MH ? (Ortega et al., 2007; Rubinsztein, 2007).

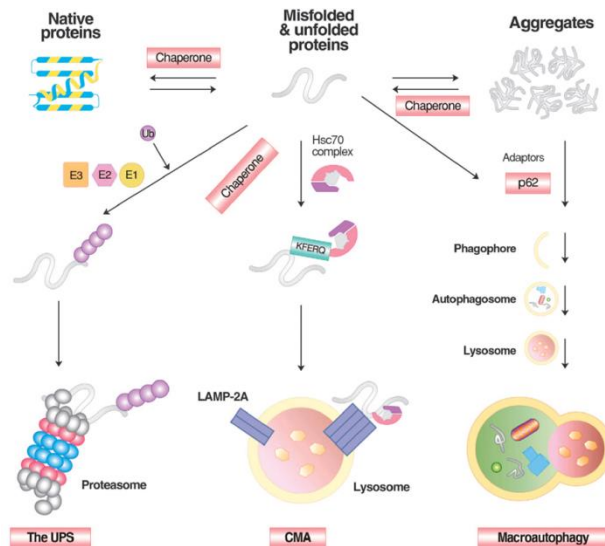


Figure 22- Les principaux systèmes de protéostasie cellulaire. Les protéines chaperonnes permettent le bon repliement des protéines dans leur conformation fonctionnelle. Si les protéines sont mal conformées, elles peuvent être directement dégradées par le système UPS ou s'agréger. Les protéines mal conformées et les agrégats peuvent également être dégradés par le système d'autophagie-lysosome. Les chaperonnes peuvent désagréger les agrégats de protéines et participer à la dégradation des protéines mal conformées par une forme alternative de l'autophagie, la CMA (Ciechanover and Kwon, 2017).

2. Le système ubiquitine-protéasome

a. Description de la voie ubiquitine-protéasome

i. Définition

L'UPS est un système de protéolyse cellulaire majeur chez les eucaryotes. Sa découverte a notamment valu le prix Nobel de Chimie en 2004 à trois grands chercheurs du domaine : Aaron Ciechanover, Avram Hershko et Irwin Rose. L'UPS a lieu dans le noyau et le cytoplasme des cellules et est responsable de la dégradation de 80 à 90% des protéines intracellulaires dont les protéines régulatrices à courte demi-vie et les protéines mal repliées et endommagées (Lilienbaum, 2013). L'UPS est donc impliqué dans le bon fonctionnement de nombreux mécanismes cellulaires notamment dans le contrôle du cycle cellulaire, la transcription, la transmission synaptique ou encore l'inflammation (Lilienbaum, 2013; Cortes and La Spada, 2014). L'UPS joue également un rôle majeur dans la défense contre les protéines mal repliées (Ortega and Lucas, 2014; Tai and Schuman, 2008).

La protéolyse par l'UPS est un mécanisme finement régulé. En effet, avant que la protéine ne soit dégradée par le protéasome, un processus complexe se met en place afin de sélectionner et de marquer la protéine cible par le système d'ubiquitination (Lilienbaum, 2013).

ii. L'UPS est composé de deux systèmes successifs

La dégradation par l'UPS est composée de deux étapes successives : l'ubiquitination qui cible et marque les protéines à dégrader puis le protéasome, un complexe multimérique qui assure la dégradation (**Figure 23**).

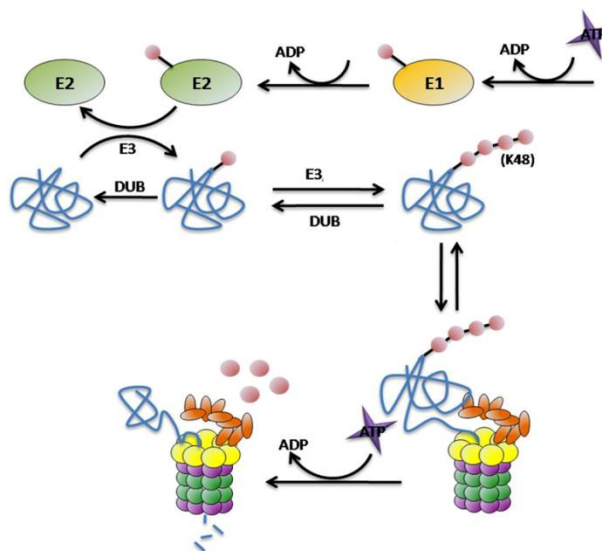


Figure 23- La dégradation par le système UPS. La molécule Ub est activée par l'enzyme E1 puis transférée à l'enzyme de conjugaison E2 et enfin liée à la protéine cible par la ligase E3. La protéine polyubiquitinylée est transportée jusqu'au protéasome où elle est reconnue, déubiquitinylée et dégradée par les sous-unités catalytiques du protéasome. Ce processus peut être régulé par la déubiquitination des protéines cibles par les enzymes DUB. (Ortega and Lucas, 2014).

L'ubiquitination des protéines cibles

Le signal de reconnaissance du substrat à dégrader par le protéasome est une chaîne de molécules d'ubiquitine (Ub), une petite protéine de 8,5 kDa conservée au cours de l'évolution (Glickman and Ciechanover, 2002). L'ubiquitination consiste en la formation d'une liaison covalente entre le groupement amine d'une lysine sur la protéine cible et le groupe carboxyle en position C-terminale de l'Ub. Ce processus est assuré par l'action séquentielle de trois enzymes. Dans la première étape, l'activation de l'Ub par l'enzyme d'activation E1 est dépendante de l'ATP. L'Ub activée est ensuite transférée à l'enzyme de conjugaison E2. Enfin, dans la troisième étape, la ligase E3 catalyse le transfert de l'Ub sur la protéine cible à dégrader (Pickart, 2001) (**Figure 23**). L'Ub peut également être ubiquitinylée à son tour sur une de ses sept lysines, ce qui induit la formation d'une chaîne polyubiquitinylée. Chez les eucaryotes, la majorité des protéines est polyubiquitinylée et les lysines 48 et 63 de l'Ub sont les sites les plus fréquents de polyubiquitinylation (Lilienbaum, 2013). Une chaîne composée d'au moins quatre Ub attachées par la lysine 48 est le principal signal pour la reconnaissance et la dégradation par le protéasome (Glickman and Ciechanover, 2002). Les autres chaînes Ub peuvent être impliquées dans des mécanismes biologiques différents comme la transduction de signaux (Finley, 2009).

L'ubiquitination est un processus réversible. L'Ub peut être retirée par une enzyme de déubiquitination (DUB) (Atkin and Paulson, 2014). Cette enzyme peut modifier les chaînes polyubiquitinylées existantes ou enlever complètement les Ub du substrat. Ce phénomène de déubiquitination joue deux rôles importants dans la cellule : il permet le recyclage des Ub libres

présentes en concentration limitée dans la cellule, et constitue la dernière chance d'échapper à la dégradation pour les protéines correctement conformées et ciblées par erreur par le système d'ubiquitination (Lilienbaum, 2013).

Après la conjugaison séquentielle d'Ub, les protéines ciblées sont reconnues et dégradées par le protéasome.

La dégradation par le protéasome

La majorité des protéines polyubiquitinylées sont dégradées par le protéasome 26S. Ce complexe protéolytique est composé d'une structure centrale appelé 20S et d'une ou deux sous-unités régulatrices 19S (Schmidt and Finley, 2014).

La partie centrale 20S du protéasome est une structure cylindrique, en forme de tonneau, abritant les sites actifs de protéolyse. Ce cylindre est constitué de deux types de sous-unités, α et β , formant quatre anneaux heptamériques autour d'une cavité (Groll et al., 1997) (**Figure 24**). Chez les eucaryotes, les deux anneaux extérieurs sont composés de sept sous-unités α distinctes alors que l'assemblage des sept sous-unités β forme les anneaux intérieurs. Trois des sous-unités β contiennent des sites catalytiques actifs avec chacune leur spécificité de clivage : $\beta 1$ possède une activité de type caspase et coupe après les acides aminés acides, $\beta 2$ avec son activité de type trypsine coupe après les acides aminés basiques et $\beta 5$ a une activité de type chymotrypsine coupant après les acides aminés hydrophobes (Schmidt and Finley, 2014). L'entrée dans la cavité est régulée par la partie N-terminale des sous-unités α qui forment un portail pour les protéines polyubiquitinylées (Groll et al., 2000). Par défaut, le cylindre 20S est fermé et inactif. Les sous-unités α doivent être déplacées afin de permettre l'entrée et la dégradation des protéines cibles dans la cavité protéolytique. L'ouverture du portail 20S est modulée par des activateurs du protéasome (Schmidt and Finley, 2014).

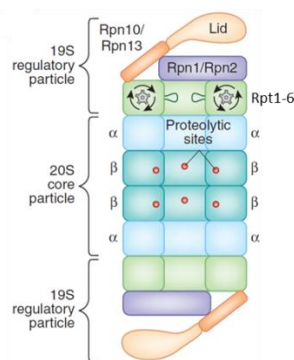


Figure 24- Structure du protéasome. Le cœur catalytique 20S est constitué de quatre anneaux constitués des sous-unités α et β , formant une cavité dans laquelle se trouve des sites protéolytiques au niveau des sous-unités β . Le cœur catalytique est entouré par un ou deux complexes régulateur 19S, composés d'un anneau de six sous-unités ATPases (Rpt1-6) et de sous-unités non ATPases (Rpn), comme Rpn1/Rpn2 servant d'échafaudage et Rpn10/Rpn13 servant de récepteurs aux protéines ubiquitinylées. Adaptée de (Schrader et al., 2009).

Le principal activateur est le complexe régulateur 19S, qui se lie au cylindre 20S afin de former le protéasome actif 26S. 19S est essentiel pour la reconnaissance, le dépliement et l'entrée dans la cavité protéolytique 20S des protéines cibles polyubiquitinylées (Schmidt and Finley, 2014). Le complexe 19S se situe à une ou aux deux extrémités de la cavité 20S et est composé de plusieurs sous-unités (Dikic, 2017; Vilchez et al., 2014) (**Figure 24**). Sa base est constituée d'un anneau de six

ATPases (Rpt 1 à 6). Ses six ATPases possèdent des fonctions cruciales : 1/ l'ouverture du portail formé par les sous-unités α de 20S, 2/ le dépliement des protéines substrats grâce à l'hydrolyse de l'ATP et 3/ la translocation vers la cavité centrale de 20S (Smith et al., 2007). Les sous-unités ATPases sont accompagnées de sous-unités non ATPases (Rpn) essentielles pour la reconnaissance et la déubiquitination des protéines cibles avant leur entrée et leur dégradation dans la cavité de 20S (Vilchez et al., 2014). En effet, les sous-unités Rpn 10 et 13 possèdent un domaine de liaison à l'Ub et agissent comme des récepteurs des substrats ubiquitinylés (Finley, 2009). La sous-unité Rpn11 a une activité déubiquitinase et permet de détacher les Ub du substrat; les chaînes polyubiquitinylées n'étant pas dégradées par le protéasome (Lander et al., 2012).

En plus de la sous-unité régulatrice 19S, d'autres activateurs du protéasome existent comme PA200, PA28 (ou 11S) ou PI31 (Schmidt and Finley, 2014). Ces activateurs interagissent également avec le cylindre 20S et forment ainsi des isoformes alternatives du protéasome 26S indépendamment de l'ATP. En cas de stress et de diminution du taux d'ATP, la cellule peut alors favoriser des mécanismes de dégradation indépendants de l'ATP comme la protéolyse par ces isoformes alternatives du protéasome mais également l'autophagie, un autre système de dégradation ne nécessitant pas l'ATP (voir paragraphe III.3.a) (Lilienbaum, 2013).

Le contrôle précis de la dégradation des nombreuses protéines par le système UPS permet une régulation fine de mécanismes cellulaires cruciaux comme la réparation de l'ADN, la prolifération cellulaire ou encore la transduction de signaux (Lilienbaum, 2013). Il est donc important que l'abondance, l'activité et la composition du protéasome dans la cellule soient finement contrôlées. Il existe plusieurs points de contrôle. Des facteurs de transcription peuvent réguler la transcription des sous-unités du protéasome, comme le facteur Nrf1 (Radhakrishnan et al., 2010; Schmidt and Finley, 2014). Les sous-unités du protéasome font également l'objet de nombreuses modifications post-traductionnelles, notamment des N-acétylation, myristoylation, phosphorylation et clivage par des caspases, qui modifient la stabilité du protéasome, son activité protéolytique ainsi que sa localisation (Dikic, 2017). Par exemple, la phosphorylation de la sous-unité $\alpha 7$ du complexe 20S stabilise son interaction avec le complexe régulateur 19S pour former le protéasome 26S (Bose et al., 2004). Au contraire, une ubiquitination excessive du protéasome lui-même induit sa dégradation par l'autre grand système de dégradation cellulaire, l'autophagie (Dikic, 2017) (voir paragraphe III.3.a.iv).

Au vu des nombreux mécanismes cellulaires régulés par l'UPS, il n'est pas surprenant que le système UPS soit impliqué dans plusieurs processus physiopathologiques comme le vieillissement, les cancers, les maladies auto-immunes et les MND (Dikic, 2017). En effet, une altération du protéasome a été observée dans plusieurs MND, caractérisées par l'accumulation de protéines toxiques dans le cerveau (Lin et al., 2013; Orre et al., 2013; Tashiro et al., 2012; Tydlacka et al., 2008).

b. Le système ubiquitine-protéasome dans la maladie de Huntington

Plusieurs études montrent un lien entre UPS et MH. En effet, l'inhibition pharmacologique du protéasome induit l'accumulation du fragment N-terminal de la mHtt soluble (Martín-Aparicio et al., 2001). A l'inverse, une augmentation de l'expression des sous-unités régulatrices du protéasome est bénéfique dans plusieurs modèles de la MH : Rpn6 chez *C.elegans* (Vilchez et al., 2012), Rpn11 chez la drosophile (Tonoki et al., 2009) et PA128 dans des neurones striataux en culture (Seo et al., 2007). Une augmentation de l'activité d'enzymes ligases E3, comme Hrd1, Parkin ou CHIP, améliore également l'élimination de la mHtt et la mort neuronale (Jana et al., 2005; Tsai et al., 2003; Yang et al., 2007). De plus, la Htt est ubiquitinylée et interagit avec les protéines du système d'ubiquitination comme l'enzyme de conjugaison E2 Ube2K (Kalchman et al., 1996), ce qui montre que la Htt peut être ciblée et dégradée par le système UPS (Thompson et al., 2009; Juenemann et al., 2013; Jansen et al., 2014).

Cependant, dès la fin des années 90, des études ont révélé, par des marquages histologiques, la présence d'Ub et de sous-unités du protéasome dans les agrégats de mHtt dans les cerveaux de modèles murins et de patients MH (Davies et al., 1997; DiFiglia et al., 1997). Cette séquestration d'Ub et du protéasome peut se faire directement via la mHtt ou indirectement par les protéines associées à la mHtt (voir paragraphe III.1.B.ii). L'accumulation d'agrégats de mHtt ubiquitinylés précocement dans la maladie suggère un défaut de l'UPS dans la MH. Cependant, le mécanisme par lequel la mHtt inhibe le protéasome est encore peu compris.

De nombreuses études ont cherché à mettre en évidence le rôle de ces agrégats de mHtt dans l'inhibition du protéasome mais les résultats sont controversés (Ortega and Lucas, 2014). En effet, des expériences, réalisées dans un modèle cellulaire de la MH ou sur du tissu de cerveaux de patients MH, montrent une diminution de l'activité du protéasome (Hunter et al., 2007; Seo et al., 2004). A l'inverse, d'autres études ne rapportent pas de défauts du protéasome lorsqu'ils incubent des protéasomes 26S isolés avec des agrégats de mHtt produits *in vitro* ou isolés à partir de cerveaux de modèles murins ou de patients MH, mais détectent une diminution de l'activité du protéasome lorsque celui-ci est incubé avec des filaments de mHtt isolés (Bennett et al., 2007; Díaz-Hernández et al., 2006). L'activité du protéasome n'est pas non plus diminuée dans les souris KI Hdh150Q par rapport aux souris sauvages (Tydlacka et al., 2008). Il est donc difficile de conclure sur l'effet des agrégats de mHtt sur l'activité du protéasome à cause des limites de chacune des techniques utilisées dans ces expériences pour mesurer l'activité de l'UPS (dégradation de peptides fluorescents ou de conjugués ou protéines ubiquitinylés) et les systèmes d'étude utilisés (incubation *in vitro* avec des espèces polyQ à différents stades d'agrégation ou utilisation d'homogénats de tissus animaux ou humains). De plus, une étude a récemment montré que le recrutement du protéasome au sein des agrégats serait dynamique et réversible et que l'accès des substrats et l'activité catalytique du protéasome seraient conservés (Schipper-Krom et al., 2014).

Sans inhiber directement l'activité du protéasome, la mHtt pourrait bloquer par sa conformation l'entrée du protéasome, altérant ainsi la protéolyse cellulaire par l'UPS. Le protéasome ne serait pas capable de cliver les longues queues polyQ et libèrerait, en dégradant le reste de la séquence de la protéine mHtt, le fragment N-terminal polyQ qui semble être la forme la plus toxique et la plus

encline à s'agréger (Holmberg et al., 2004; Koyuncu et al., 2017; Venkatraman et al., 2004). Une étude très récente a notamment émis l'hypothèse d'un mécanisme commun à plusieurs maladies neurodégénératives, dans lesquelles une forme particulière d'oligomères solubles se lierait à l'anneau formé par les sous-unités α du protéasome et bloquerait son ouverture pour accéder à la cavité protéolytique (Thibaudeau et al., 2018).

Toutes ces études cherchent à démontrer le défaut de l'UPS dans la MH et l'implication directe de la mHtt dans ce mécanisme, mais la diminution de la protéolyse cellulaire pourrait être la conséquence du défaut d'un autre mécanisme cellulaire lié à la mHtt. Par exemple, la mHtt interfère avec la chaîne respiratoire mitochondriale et diminue donc la production d'ATP (voir paragraphe I.3.b.iii). L'UPS étant un système dépendant de l'ATP, une diminution de l'ATP disponible pourrait ralentir la dégradation des protéines ubiquitinylées par l'UPS (Orr et al., 2008b). Plus récemment, l'hypothèse d'un dysfonctionnement global du système de protéostasie a été proposée (Hipp et al., 2012). Les protéines chaperonnes sont responsables du repliement correct des protéines et sont impliquées dans la modulation de l'agrégation protéique (Hartl et al., 2011) (voir paragraphe III.4.a.i). Au cours de la MH, la présence des différentes espèces monomériques ou oligomériques et des agrégats de mHtt détournerait les chaperonnes des autres protéines, ce qui induirait un retard de maturation des protéines et ainsi l'ubiquitination de ces protéines (Hipp et al., 2012). L'augmentation du nombre de protéines ubiquitinylées entraînerait une compétition entre toutes ces protéines au niveau de protéasome qui serait alors submergé (Hipp et al., 2012).

De plus, toutes ces expériences cherchent à mettre en évidence un défaut de l'UPS en s'intéressant à l'activité du protéasome sans étudier le système en amont, l'ubiquitination.

La mHtt pourrait donc inhiber directement la dégradation par l'UPS en interagissant avec le protéasome soit au niveau de la reconnaissance du substrat, soit au niveau du cœur catalytique, ou indirectement en saturant des protéines chaperonnes nécessaires aux fonctions de l'UPS (Bercovich et al., 1997; Díaz-Hernández et al., 2003). Malgré les nombreuses études, les mécanismes par lesquels la mHtt pourrait affecter la dégradation par l'UPS sont encore peu compris.

L'UPS est essentiel à de nombreuses fonctions vitales de la cellule. Plusieurs mécanismes cellulaires se mettent donc en place pour permettre à la cellule de réagir face à l'altération du protéasome. Parmi ces réponses, il existe des actions compensatoires par les autres composants du système cellulaire de contrôle qualité des protéines (Dikic, 2017).

3. Autophagie

a. L'autophagie en condition physiologique

i. Définition

Le mot autophagie, du grec « auto » pour soi-même et « phagie » pour manger, est un mécanisme cellulaire permettant la dégradation des protéines obsolètes et des organelles du cytoplasme par le lysosome (Ravikumar et al., 2010). Ce processus, très conservé au cours de l'évolution, a été élucidé pour la première fois grâce à des études sur la levure *S. Cerevisiae*. Les résultats de ces études ont été reconnus comme majeur dans la compréhension des processus cellulaires et le principal investigateur de ces études, le docteur Yoshinori Ohsumi, a reçu le prix Nobel en 2016 (Pierzynowska et al., 2018). L'analyse génétique des levures a permis l'identification de 32 gènes codant pour des protéines impliquées dans le processus d'autophagie (gènes Atg pour «AuTophagy-related genes»). La majorité de ces gènes ont des orthologues chez les mammifères. L'autophagie dépend d'une cascade d'interactions entre les protéines Atg (Pierzynowska et al., 2018).

Contrairement à l'UPS, qui est présent dans le noyau et cytoplasme, l'autophagie a lieu seulement dans le cytoplasme. L'autophagie est responsable de la dégradation du matériel cytoplasmique de grande taille qui ne peut pas être pris en charge par le protéasome (organelles, agrégats protéiques, gouttelettes lipidiques ou bactéries) (Dikic, 2017). Il existe trois grandes formes d'autophagie qui délivrent différemment le substrat au lysosome : la microautophagie, la macroautophagie et la CMA (Cuervo, 2004) (**Figure 25**). La microautophagie est un processus de dégradation de petits organelles ou composants cytoplasmiques qui sont directement invaginés par le lysosome (Mijaljica et al., 2011). Ce processus est encore peu caractérisé et son rôle, notamment dans les neurones, est mal compris. La CMA est impliquée dans la dégradation de protéines individuelles auxquelles se lient des chaperonnes puis le complexe substrat-chaperonnes est transporté jusqu'au lysosome (décrite au paragraphe III.4.a.ii) (Kaushik and Cuervo, 2018). La macroautophagie nécessite, contrairement aux deux précédentes, l'intervention de deux organelles : l'autophagosome et le lysosome. C'est la forme la plus commune d'autophagie (Pierzynowska et al., 2018). Nous décrivons dans ce paragraphe ce processus de macroautophagie que nous appellerons par la suite autophagie.

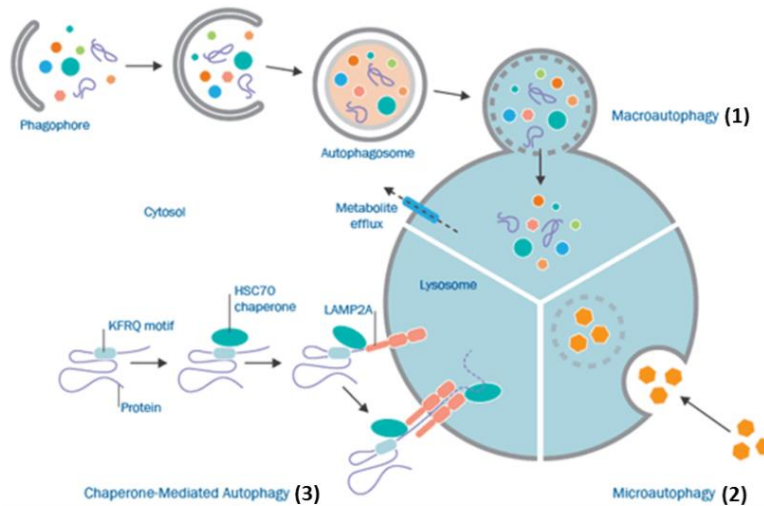


Figure 25- Les différents types d'autophagie. Il existe trois grandes formes d'autophagie dans la cellule : (1) la forme principale est la macroautophagie au cours de laquelle se forme un autophagosome autour du substrat à dégrader qui fusionne ensuite avec le lysosome où ce substrat est dégradé, (2) la microautophagie au cours de laquelle les substrats sont directement invaginés et fusionnés avec le lysosome et (3) la CMA qui fait intervenir les protéines chaperonnes pour amener le substrat jusqu'au lysosome. <https://www.novusbio.com/research-areas/autophagy>.

ii. Les étapes de l'autophagie

L'autophagie peut être divisée en quatre grandes étapes successives : 1/ l'initiation au cours de laquelle une double membrane, appelée phagophore, se forme autour des protéines et organelles à dégrader, 2/ l'élongation de la double membrane qui se referme et forme l'autophagosome, 3/ la fusion de l'autophagosome avec le lysosome, ce qui donne naissance à l'autophagolysosome et enfin 4/ la dégradation du contenu de l'autophagolysosome et de la membrane interne de ce dernier par les enzymes lysosomales, ce qui permet le recyclage des produits de dégradation (acides aminés, nucléotides, glucides, acides gras...) pour différents processus cellulaires (Pierzynowska et al., 2018) (**Figure 26**).

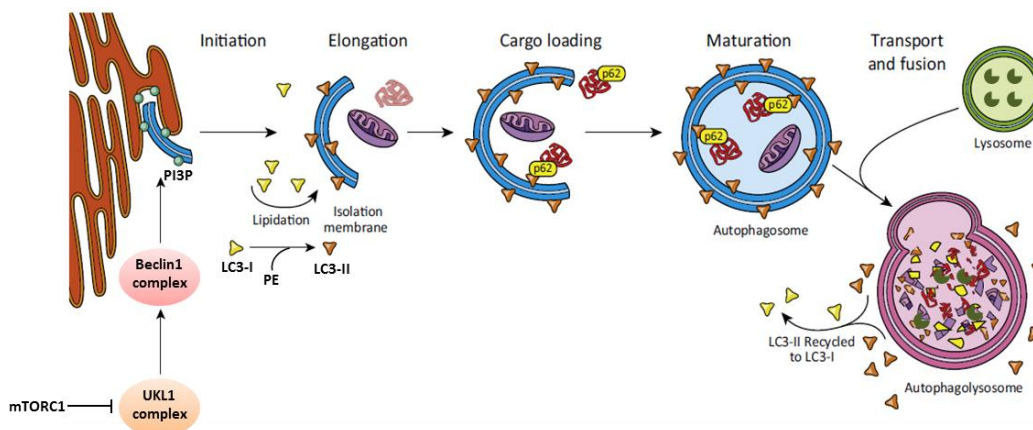


Figure 26- Les différentes étapes de l'autophagie. Les complexes moléculaires ULK1 et Beclin1 induisent l'initiation de l'autophagie au cours de laquelle une double membrane se forme. Au cours de l'élongation, la double membrane, sur laquelle s'associe LC3-II après lipidation, se referme autour du substrat à dégrader et forme l'autophagosome. L'autophagosome est transporté jusqu'au lysosome où ils fusionnent et forment l'autophagolysosome. Le contenu de l'autophagolysosome est dégradé par les enzymes lysosomales. Une autophagie sélective existe et utilise principalement le récepteur p62 pour sélectionner les protéines à dégrader. Adaptée de (Martin et al., 2015).

L'initiation

La source de cette nouvelle membrane qui se forme dans le cytoplasme de la cellule est débattue et pourrait être multiple. Le phagophore pourrait se former *de novo* à partir de précurseurs moléculaires présents dans le cytosol ou pourrait être généré à partir d'autres membranes cellulaires dérivées de la membrane plasmique, de l'appareil de Golgi, des mitochondries ou encore du réticulum endoplasmique (RE) (Guo et al., 2018a). Plusieurs études appuient la seconde hypothèse en démontrant la contribution du RE dans la formation du phagophore (Hayashi-Nishino et al., 2009).

Deux complexes macromoléculaires sont impliqués dans l'induction de l'autophagosome (**Figure 26**). Le premier est le complexe composé de FIP200/Atg17, la kinase ULK1/Atg1 (UNC-51-like kinase 1) et Atg13. La déphosphorylation d'Atg13 et ULK1 entraîne l'activation de cette dernière qui phosphoryle FIP200 pour induire la formation de la double membrane autophagique (Pierzynowska et al., 2018; Ravikumar et al., 2010). Le principal régulateur d'autophagie est la kinase mTOR (mammalian ou mechanistic target of rapamycin), appartenant au complexe mTORC1 qui inhibe l'activité de la kinase ULK1, ce qui bloque l'induction de l'autophagie (Pierzynowska et al., 2018) (**Figure 26**). L'autophagie est un mécanisme de dégradation sensible aux signaux de l'environnement de la cellule afin de renouveler les nutriments cellulaires. En cas d'épuisement des stocks nutritifs, le complexe mTORC1 est donc inhibé et l'autophagie activée.

Le second complexe impliqué dans cette étape d'initiation est le complexe PI3K-Beclin-1 composé de la kinase PI3K de classe III, PI3KIII/ Vps34, accompagnée des protéines Beclin-1/Atg6, Barkor/Atg14 et la sérine-thréonine kinase p150/Vps15. L'inhibition de l'activité de la kinase PI3KIII par le 3-méthyladenine (3-MA) ou la wortmannin entraîne l'inhibition de la formation de l'autophagosome (Seglen and Gordon, 1982; Blommaert et al., 1997). La stimulation de ce complexe entraîne la production de phosphatidylinositol-3-phosphate (PI3P) qui active la nucléation de la double membrane (Choi et al., 2013).

L'élongation

L'élongation de l'autophagosome requiert deux réactions de conjugaison similaires à l'ubiquitinylation (Choi et al., 2013). La protéine Atg 12 est conjuguée à Atg5 grâce aux enzymes Atg7 (similaire à l'enzyme E1) et Atg10 (similaire à l'enzyme E2). Le conjugué Atg12-Atg5 forme ensuite un complexe avec la protéine Atg16L1 formant un tétramère nécessaire pour l'élongation du phagophore qui se dissocie une fois l'autophagosome formé. Le deuxième système de conjugaison nécessite la protéine MAP-LC3/Atg8 (Microtubule-associated protein 1 light chain 3). Le précurseur LC3 est clivé par la protéase Atg4b pour former la forme LC3-I (forme libre). L'action séquentielle de Atg7 et Atg3 (similaire à l'enzyme E2) permet la conjugaison du lipide phosphatidylethanolamine (PE) à LC3-I et ainsi la formation de LC3-II (forme conjuguée LC3-PE) (Choi et al., 2013). Contrairement au complexe Atg12-Atg5-Atg16L1, LC3-II reste associé à la membrane de l'autophagosome jusqu'à fusion avec le lysosome et constitue ainsi un marqueur spécifique de cet organelle (Ravikumar et al., 2010) (**Figure 26**).

La fusion

Une fois mature, l'autophagosome se déplace sur le réseau de microtubules grâce aux moteurs protéiques, kinésine et dynéine, pour rejoindre les lysosomes (Ravikumar et al., 2005; Kimura et al., 2008). Dans les cellules de mammifères, le processus de fusion est plus compliqué que chez la levure et nécessite, dans un premier temps, une étape de fusion avec l'endosome précoce et tardif (Ravikumar et al., 2010). Cette étape intermédiaire permet de diminuer le pH dans l'autophagosome afin de fournir les conditions nécessaires à la fusion et l'action des enzymes lysosomales (Glick et al., 2010). En effet, l'inhibition de la pompe à protons, ATPase H⁺, par la bafilomycine A1 inhibe la fusion entre l'autophagosome et le lysosome, ce qui prouve la nécessité de l'acidité lysosomale pour une fusion normale (Yamamoto et al., 1998).

Plusieurs protéines sont impliquées dans la fusion entre l'autophagosome et le lysosome : la protéine membranaire LAMP1/2 (Lysosomal Membrane Protein), la GTPase Rab7, les protéines Vps de classe C, l'ESCRT (endosomal sorting complexes required for transport) et les protéines de la famille des SNAREs (SNAP (Soluble NSF Attachment Protein) Receptor) (Ravikumar et al., 2010).

Dans les neurones, l'autophagosome se forme dans les neurites et la région terminale des synapses puis est rétro-transporté jusqu'au soma où réside les lysosomes actifs (Cortes and La Spada, 2014).

La dégradation lysosomale

Le lysosome renferme plus de cinquante hydrolases acides (peptidases, phosphatases, nucléases...). Ces enzymes protéolytiques clivent de façon irréversible des chaînes peptidiques. Les protéases peuvent être des exopeptidases en clivant les chaînes polypeptidiques au niveau des parties N ou C-terminales, ou des endopeptidases si elles clivent au milieu de la chaîne peptidique (Barrett and Rawlings, 2007; Puente et al., 2003). Parmi les protéases, il existe trois sous-types en fonction de l'acide aminé présent dans le site actif : les cystéine, aspartyl et sérine cathepsines (Kirkegaard and Jäättelä, 2009). La majorité des protéases sont des endopeptidases même si les cathepsines B et H peuvent également agir comme exopeptidases et les cathepsines C et X sont strictement des exopeptidases (Stoka et al., 2005; Repnik et al., 2012). Les cathepsines sont synthétisées sous la forme de précurseurs inactifs, appelés préproenzymes, transférés à travers l'appareil de Golgi sous la forme de proenzymes puis sont activées dans le milieu acide du lysosome (Turk et al., 2000, 2001; Ishidoh and Kominami, 2002). Les cathepsines ont différents patrons d'expression, niveaux d'expression et spécificités, contribuant à leurs fonctions variées. Les cathepsines B, H, L et C semblent s'exprimer dans tout le SNC alors que d'autres cathepsines ont une expression plus spécifique au sein d'un tissu ou d'un type cellulaire (Pišlar and Kos, 2014). Bien qu'elles soient présentes dans tout le SNC, les cathepsines C et S sont préférentiellement exprimées dans les cellules phagocytaires et particulièrement dans les cellules microgliales et la cathepsine X dans les astrocytes et la microglie (Liuzzo et al., 1999; Wendt et al., 2007; Koike et al., 2013).

Les cystéines cathepsines B et L et l'aspartyl cathepsine D sont les plus abondantes dans le lysosome et participent activement à la dégradation autophagique. Au sein de l'autophagolysosome, l'environnement acide permet l'action des hydrolases qui digèrent les composants enfermés dans la structure ainsi que sa membrane interne. L'autophagolysosome devient alors un organite avec une simple membrane contenant des composés cytoplasmiques dégradés (Pierzynowska et al., 2018). Les

différentes cathepsines pourraient avoir des actions spécifiques lors de cette dégradation, la cathepsine B jouerait notamment un rôle dans la dégradation générale du contenu autophagolysosomal alors que la cathepsine L interviendrait plutôt dans la dégradation des protéines de la membrane comme du marqueur LC3-II (Kaminsky and Zhivotovsky, 2012).

iii. L'autophagie sélective

L'autophagie a d'abord été décrite comme un mécanisme de dégradation aspécifique, mais en réalité plusieurs formes d'autophagie sélective ont été identifiées. L'autophagie sélective se produit lors de la dégradation spécifique d'une organelle (par exemple mitophagie et ribophagie pour la mitochondrie et les ribosomes respectivement), ou d'un substrat (lipophagie, xénophagie ou agréphagie pour la dégradation des lipides, pathogènes ou agrégats de protéines). L'autophagie sélective est un mécanisme de protection cellulaire important qui peut être activé en dehors de carence nutritive par des signaux de stress (Zaffagnini and Martens, 2016). Des récepteurs autophagiques jouent un rôle majeur dans ce processus en reconnaissant le substrat cellulaire à dégrader afin de l'attacher à la membrane de l'autophagosome en formation. Pour cela, les récepteurs se lient à la protéine LC3 sur la membrane par l'intermédiaire de leur région LIR (LC3-interacting region). Chez la levure, des protéines d'échafaudage, comme Atg11, ont été identifiées dans ce processus de recrutement du substrat de dégradation (Lynch-Day and Klionsky, 2010). Chez les mammifères, la reconnaissance du substrat lors de l'autophagie sélective fait intervenir dans la majorité des cas le système ubiquitine (Dikic, 2017). p62 est le principal récepteur impliqué dans l'autophagie sélective, et en particulier dans l'agréphagie, en liant simultanément LC3 et le substrat ubiquitinylé (**Figure 26**).

En condition physiologique, l'autophagie régule l'homéostasie cellulaire en permettant le renouvellement des précurseurs métaboliques et l'élimination des débris cellulaires. Mais avec l'âge, l'autophagie devient de moins en moins efficace et l'expression de certains gènes liés à l'autophagie est diminuée (par exemple Atg 5 et 7 ou beclin-1), ce qui entraîne une baisse de la protéostasie cellulaire (Choi et al., 2013; Cuervo and Dice, 2000a). L'autophagie est également impliquée dans de nombreux processus pathologiques dans lesquels elle peut influencer positivement ou négativement la progression de la pathologie. Elle intervient, par exemple, dans l'élimination des mitochondries défectueuses et des agrégats de protéines, en particulier au cours des maladies neurodégénératives (Choi et al., 2013) (voir paragraphe III.3.b).

iv. Les interactions entre les systèmes de protéolyse

Les systèmes UPS et autophagie-lysosome ont longtemps été considérés comme des systèmes indépendants. Mais ces deux voies de protéolyse sont essentielles pour le maintien de l'homéostasie cellulaire et leurs activités doivent donc être finement orchestrées (Lilienbaum, 2013). Le fait que l'inhibition du protéasome ou sa surcharge induise l'autophagie dans une majorité des types cellulaires est un premier indice pour une connexion fonctionnelle de ces deux systèmes (Dikic, 2017). Dans ce sens, l'autophagie compense les défauts de dégradation du protéasome et prévient l'accumulation de protéines potentiellement toxiques. A l'inverse, les preuves montrant l'activation

du protéasome en cas de défaut de l'autophagie sont faibles. Ceci peut s'expliquer par le fait que les substrats de l'autophagie sont souvent trop larges et complexes pour le protéasome (Ding and Yin, 2008; Dikic, 2017).

Bien que la dégradation des protéines et organelles ne puisse pas être compensée dans les deux sens, il existe plusieurs niveaux de connexions entre l'UPS et l'autophagie (Lilienbaum, 2013). Les deux systèmes de dégradation partagent des effecteurs communs. Le plus évident est l'ubiquitine qui peut marquer des protéines pour être dégradées via les deux voies de protéolyse (Dikic, 2017). Le choix entre UPS et autophagie va ensuite dépendre de plusieurs paramètres comme le type de polymérisation de l'ubiquitine et la structure de la protéine (Lilienbaum, 2013). Après avoir été ubiquitinylée, la protéine peut être prise en charge par des adaptateurs protéiques contenant un domaine de liaison à l'ubiquitine. Parmi ces adaptateurs, p62, qui peut se lier à la fois à la protéine ubiquitinylée et à LC3 présent au niveau de l'autophagosome, entraîne la dégradation de la protéine cible par le système autophagie-lysosome (Pankiv et al., 2007). p62 peut également interagir avec les sous-unités du protéasome et ainsi amener des protéines cibles pour dégradation par le protéasome (Wooten et al., 2006). De plus, des études ont montré que p62 jouait un rôle central dans la coordination des deux systèmes en transportant des substrats polyubiquitinylés du protéasome vers un autophagosome en cas d'inhibition du protéasome (Dikic, 2017).

Les deux systèmes de protéolyse peuvent également être connectés via leurs protéines régulatrices (Lilienbaum, 2013; Dikic, 2017). En effet, une protéine régulatrice qui active ou inhibe une des deux voies de protéolyse, peut être dégradée par l'autre voie. Si la seconde voie de dégradation est inhibée, la quantité de la protéine régulatrice est augmentée, ce qui affecte à son tour la première voie de protéolyse. C'est par exemple le cas de la protéine LC3, impliquée dans la formation de l'autophagosome et la sélection du substrat lors de l'autophagie, ou ULK1, modulant l'induction de l'autophagie, qui sont dégradées par le protéasome (Gao et al., 2004; Kuang et al., 2013; Liu et al., 2016).

Enfin, l'environnement cellulaire peut orchestrer l'activité des systèmes de protéolyse. Par exemple, le niveau d'énergie cellulaire coordonne les deux voies (Lilienbaum, 2013). Lorsque le niveau d'ATP est élevé, le système UPS, ATP-dépendant, fonctionne correctement. Au contraire, lorsque le niveau d'ATP est faible, l'autophagie qui est indépendante de l'ATP, est stimulée. De plus, l'augmentation d'AMP par la diminution d'ATP active la kinase AMPK qui inhibe à son tour mTOR et finalement active l'autophagie. Ce mécanisme d'activation de l'autophagie permet de maintenir la protéolyse cellulaire et également le recyclage d'acides aminés sans consommer d'ATP (Lilienbaum, 2013).

b. L'autophagie dans la maladie de Huntington

L'autophagie est importante pour le bon fonctionnement des neurones. En effet, la délétion conditionnelle des gènes *Atg5* et *Atg7*, intervenant dans l'étape d'élongation de l'autophagosome, induit une neurodégénérescence et l'accumulation d'inclusions ubiquitinylées, deux caractéristiques observées dans les maladies neurodégénératives, et notamment dans la MH (Hara et al., 2006; Komatsu et al., 2006). Dans de nombreuses maladies neurodégénératives, le mécanisme d'autophagie est dérégulé. Malgré leur étiologie différente, une accumulation de vacuoles

d'autophagie dans les neurones en dégénérescence est observée dans toutes ces maladies (Cortes and La Spada, 2014).

i. La mHtt, cible de l'autophagie

DiFiglia et ses collaborateurs ont été les premiers à observer une colocalisation entre les agrégats cytoplasmiques de mHtt et les autophagolysosomes dans le cerveau de patients MH (Sapp et al., 1997). Il a été montré plus tard que les formes solubles et agrégées de la mHtt sont toutes les deux dégradées par autophagie (Cortes and La Spada, 2014). En effet, l'inhibition de la formation de l'autophagosome par le 3-MA ou de la fusion entre l'autophagosome et le lysosome par la bafilomycine A1 augmentent le niveau de mHtt soluble et agrégée dans des modèles cellulaires de la MH. Au contraire, l'induction de l'autophagie par la rapamycine, qui inhibe mTOR, stimule la dégradation de la mHtt et diminue le niveau protéique de la mHtt soluble et agrégée (Ravikumar et al., 2002).

Comme les deux systèmes de protéolyses de la cellule se compensent (voir paragraphe III.3.a.iv), le dysfonctionnement de l'UPS dans la MH induit une augmentation de l'activité autophagique (Cortes and La Spada, 2014).

ii. La Htt dans l'autophagie

Les mHtt et les agrégats de mHtt sont des substrats de l'autophagie mais la protéine Htt semble directement être impliquée dans la régulation de l'autophagie.

La séquence protéique de la Htt partage des similitudes avec celles de trois protéines impliquées dans différentes étapes de l'autophagie : Atg11 (reconnaissance du substrat), Atg23 (régulation de la formation de l'autophagosome) et Vac8 (induction du phagophore) (Ochaba et al., 2014).

La Htt participe également à la reconnaissance du substrat de dégradation en facilitant la liaison de p62 au substrat ubiquitinylé et à LC3 (Rui et al., 2015). De plus, la Htt interagit avec la kinase ULK1, ce qui libère cette dernière de son interaction avec l'inhibiteur mTORC1 et permet ainsi d'induire la formation du phagophore. mTOR et la Htt contiennent tous les deux des séquences HEAT riches en leucine, ce qui pourrait être à la base de leur interaction avec ULK1 (Rui et al., 2015). La Htt apparaît donc comme une protéine d'échafaudage impliquée dans deux étapes majeures de l'autophagie sélective : l'initiation de l'autophagosome et la reconnaissance du substrat à dégrader. La Htt intervient également dans le transport cellulaire notamment via le réseau de microtubules et régule notamment le transport des autophagosomes qui rejoignent les lysosomes pour fusionner (Martin et al., 2015).

La Htt est impliquée dans au moins trois types d'autophagie sélective : l'agrégation, la lipophagie ainsi que la mitophagie (Rui et al., 2015).

iii. Les dysfonctions de l'autophagie dans la maladie de Huntington

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer le dysfonctionnement de l'autophagie dans la MH (**Figure 27**).

Dans les modèles cellulaires et animaux et même chez les patients MH, une diminution de l'activité protéolytique par autophagie est observée mais contrairement aux autres maladies neurodégénératives, le flux autophagique ne semble pas impacté et est même augmenté dans la MH (Martinez-Vicente et al., 2010; Wong and Cuervo, 2010). De plus, l'augmentation du nombre de vacuoles autophagiques a été observée dans le striatum de plusieurs modèles murins et chez les patients MH (Cortes and La Spada, 2014). Les travaux du groupe d'Ana-Maria Cuervo ont montré que la formation des autophagosomes, la fusion avec le lysosome et l'activité protéolytique dans le lysosome n'étaient pas impactées. Ce groupe a cependant observé la présence d'autophagosomes vides dans des modèles cellulaires et murins de la MH due à une altération dans la reconnaissance du substrat à dégrader (Martinez-Vicente et al., 2010) (**Figure 27**). L'interaction anormale entre la mHtt et p62 pourrait être à l'origine de ce défaut de reconnaissance du substrat (Martinez-Vicente et al., 2010). La présence de la mHtt dans les membranes de plusieurs organelles cellulaires peut également diminuer leur reconnaissance lors de la formation de l'autophagosome (Wong and Cuervo, 2010). Cette séquestration inefficace du substrat à dégrader lors de l'autophagie entraîne une dérégulation importante de l'homéostasie cellulaire comme des défauts du métabolisme mitochondrial avec production accrue d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et l'agrégation de protéines (Wong and Cuervo, 2010). De plus, la mutation de la mHtt altère sa régulation du transport vésiculaire, ce qui affecte la motilité des autophagosomes (Wong and Holzbaur, 2014; Martin et al., 2015) (**Figure 27**).

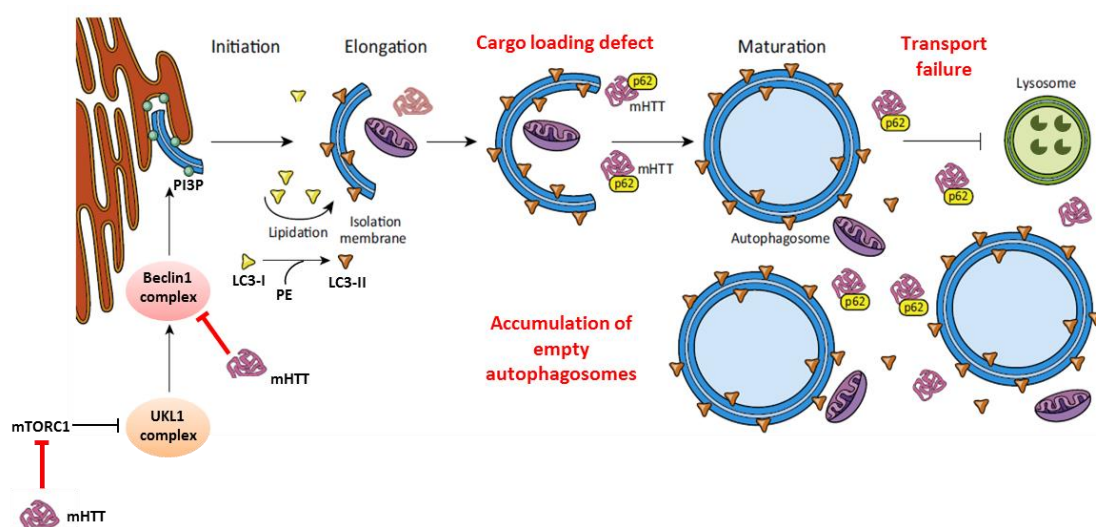


Figure 27- Les défauts de l'autophagie au cours de la MH. Le processus d'autophagie peut être impacté à plusieurs étapes par l'expression de la mHtt au cours de la MH. Les agrégats de mHtt peuvent séquestrer la protéine mTOR et ainsi induire l'autophagie. Un défaut de reconnaissance du substrat, en partie dû à l'interaction entre la mHtt et p62, et un défaut de transport des autophagosomes jusqu'au lysosome entraîne l'accumulation d'autophagosomes vides. A l'inverse, la séquestration de Beclin-1 entrainerait une inhibition de l'induction de l'autophagie. Adaptée de (Martin et al., 2015).

Les agrégats de mHtt séquestrent d'autres protéines qui sont souvent inactivées sous forme agrégées dont mTOR, dont l'inhibition active l'autophagie (**Figure 27**). L'inhibition de mTOR par son agrégation pourrait être un effet protecteur des agrégats de mHtt (Ravikumar et al., 2004). Cependant, à cause du défaut de reconnaissance du substrat et de transport des autophagosomes dans la MH décrits ci-dessus, le flux autophagique reste inefficace et les autophagosomes vides s'accumulent dans le cytoplasme. La séquestration de Beclin-1 dans les agrégats de mHtt a également été observée dans les souris transgéniques R6/2 et le cerveau de patients MH (Shibata et al., 2006). Beclin-1 fait partie du complexe PI3K, essentiel pour l'induction de l'autophagie. La séquestration de Beclin-1 dans les cellules neuronales de patients MH pourrait donc avoir l'effet inverse à la séquestration de mTOR (**Figure 27**).

De plus, chez les patients atteints de la MH, une augmentation de l'activité des cathepsines est observée, notamment les cathepsines B, D, L et H (Mantle et al. 1995). Plus récemment, dans des modèles cellulaires, l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques et d'ARN interférents a permis d'identifier les cathepsines L et Z comme essentielles dans la dégradation spécifique des protéines comportant une queue polyglutamine comme la mHtt (Bhutani et al. 2012). En effet, les cathepsines L et Z mais également B et D sont particulièrement impliquées dans le métabolisme du fragment N-terminal de la Htt et jouent donc un rôle important dans la MH (Stoka et al. 2016). Dans le SNC, d'autres cathepsines moins connues, comme les cathepsine C et S, sont majoritairement présentes dans la microglie activée et seraient impliquées dans les processus de neuroinflammation (Koike et al. 2013 ; Wendt et al. 2008).

La macroautophagie semble donc être généralement activée dans la MH mais le défaut de reconnaissance du substrat à dégrader et de transport des autophagosomes rend inefficace la protéolyse par ce mécanisme. D'autres formes d'autophagie existent dans la cellule comme la CMA, qui fait intervenir un ensemble de protéines appartenant à la famille des chaperonnes.

4. Les protéines chaperonnes

a. Définition

i. Les protéines chaperonnes

Les cellules des mammifères expriment plus de 10 000 protéines différentes qui sont synthétisées par les ribosomes sous forme d'une chaîne linéaire d'acide aminés (Hartl et al., 2011). Ces nouvelles protéines doivent atteindre une conformation tridimensionnelle pour effectuer correctement leurs fonctions biologiques (Sheikh et al., 2013). Le bon repliement des nouvelles protéines synthétisées est assuré par les chaperonnes, protéines majeures du système contrôle-qualité protéique de la cellule. Elles contrôlent également la bonne conformation des protéines tout au long de leur vie dans la cellule en corrigeant le repliement de protéines mal conformées et prévenant ainsi leur agrégation (Hartl et al., 2011; Bose and Cho, 2017). Cette surveillance permanente est essentielle puisque les protéines mal conformées peuvent être toxiques pour la

cellule. Les protéines chaperonnes participent également à la dégradation de ces protéines mal conformées en interagissant avec les systèmes de protéolyse (**Figure 30**) (voir paragraphe III.4.a.iii). Les chaperonnes sont donc des protéines ubiquitaires définies comme des protéines qui interagissent et stabilisent les protéines ou les aident à acquérir une conformation appelée native sans être présentes dans leur structure finale et fonctionnelle (Hartl and Hayer-Hartl, 2009). La majorité des chaperonnes appartiennent aux protéines du stress (Hsp, heat shock proteins), qui sont induites par différentes situations de stress cellulaire comme les chocs thermiques ou le stress oxydatif (Ciechanover and Kwon, 2017). La régulation transcriptionnelle de cette réponse est contrôlée par les facteurs de transcription HSF (Heat Shock transcription Factor) dont l'activité dépend du niveau cellulaire de chaperonnes et de protéines mal conformées (Bose and Cho, 2017). Le génome humain code pour quatre HSF, HSF1-4, mais le facteur HSF1 est le principal régulateur de la réponse des protéines Hsp face à un stress (Morimoto, 2011). L'activité de HSF est régulée par une boucle auto-régulatrice dans laquelle l'expression des chaperonnes Hsp, particulièrement Hsp70 et Hsp90, inhibe la transcription de HSF1. Bien que ces chaperonnes aient été initialement décrites comme des protéines répondant à un stress cellulaire, il est maintenant établi que la majorité de ces protéines chaperonnes sont exprimées constitutivement et impliquées dans le maintien permanent de la protéostasie cellulaire (Reis et al., 2017).

Il existe plusieurs classes de chaperonnes basées sur leur poids moléculaires : Hsp40, Hsp60, Hsp70, Hsp90, Hsp100 et les petites Hsp (sHsp) (Hartl et al., 2011). Chaque classe est composée de plusieurs membres qui ont des séquences et des domaines fonctionnels communs. Plusieurs co-chaperonnes assistent les chaperonnes dans leur fonction comme la famille des protéines BAG (Bcl-2-associated athanogene), les protéines TPR (tetratricopeptide repeat ; par exemple CHIP, Hip, Hop) et les co-chaperonnes contenant un domaine J (DnaJ/Hsp40) (Bose and Cho, 2017). Les différentes chaperonnes peuvent avoir une spécificité de substrat, une localisation et un mécanisme d'action différent (Bose and Cho, 2017). Les chaperonnes et co-chaperonnes font partie d'un réseau complexe appelé « chaperome » qui régule la fonction du protéome cellulaire. Alors que les fonctions des chaperonnes individuelles sont assez bien connues, les analyses sur la dynamique du chaperome et les connections entre toutes ces protéines sont limitées (Brehme et al., 2014). Les sHsps ont toutes en commun leur petite taille (inférieur à 40 kDa) ainsi qu'un domaine α -cristalline conservé de 90 résidus (Muchowski and Wacker, 2005). Elles s'assemblent en une large structure oligomérique afin d'inhiber par exemple l'agrégation des protéines en collaboration avec Hsp70 ou de participer à la dégradation des protéines mal conformées ou dénaturées par UPS (Sun and MacRae, 2005). La famille des Hsp60 intervient aux premiers stades du repliement des protéines et possède un mode d'action particulier en enfermant le substrat dans une cavité (Saibil, 2013). Chez les eucaryotes, Hsp60 (chaperonine du groupe I) est présente dans la mitochondrie et coopère avec Hsp10 alors qu'une seconde classe de chaperonine (groupe II) agit dans le cytosol des eucaryotes sans Hsp10 (Muchowski and Wacker, 2005). Les chaperonnes Hsp100 appartiennent à la famille des protéines AAA+ (adenosine triphosphatase) qui ont en commun un domaine ATPase et forme une large structure composée d'anneaux (Muchowski and Wacker, 2005). Elles sont principalement impliquées dans la régulation de l'agrégation et peuvent désagréger les protéines ou solubiliser les

agrégats existants en collaboration avec Hsp70 (Saibil, 2013; Maiti et al., 2014). L'ensemble des protéines chaperonnes représente environ 10% du protéome cellulaire et les familles Hsp70 et Hsp90 correspondent à eux seuls presque à la moitié des chaperonnes (Ciechanover and Kwon, 2017; Reis et al., 2017). Hsp70 et Hsp90 sont des chaperonnes très interactives et fonctionnent avec de nombreux partenaires et co-facteurs (Saibil, 2013; Lackie et al., 2017).

Hsp70 est la famille des chaperonnes la plus conservée à travers l'évolution. Cette chaperonne, abondante et ubiquitaire, participe à la régulation de nombreux processus biologiques. En effet, elle intervient dans les premiers stades de la conformation des protéines néosynthétisées, le trafic des protéines vers la membrane, les interactions protéiques, le repliement ou dégradation des protéines mal conformées et la désagrégation (Kampinga and Craig, 2010; Lackie et al., 2017; Bose and Cho, 2017). Ce large spectre de fonctions est permis par l'existence de plusieurs formes de Hsp70, constitutive (Hsc70) ou induite par un stress (Hsp70) mais également par le recrutement de co-chaperonnes et par la coopération avec d'autres protéines chaperonnes (Mayer and Bukau, 2005). Hsp70 est composée de deux domaines distincts : un domaine N-terminal de liaison à l'ATP et un domaine C-terminal qui se lie au substrat (**Figure 28a**). Hsp70 reconnaît le substrat protéique par l'intermédiaire d'une courte séquence hydrophobe riche en leucine exposée à la surface des protéines (Rüdiger et al., 1997). L'activité de Hsp70 dépend de son interaction avec plusieurs co-chaperonnes dont les plus importantes sont les Hsp40 et les facteurs d'échange nucléotidique (NEF) (Kampinga and Craig, 2010) (**Figure 28b**). Hsp40, également appelé protéine J, est une vaste famille de chaperonnes. Elle joue principalement le rôle de co-chaperonne de Hsp70 en interagissant directement avec et en stimulant son activité ATPase. Hsp40 est constitué de trois domaines (**Figure 28a**). En N-terminal se situe un domaine J très conservé d'environ 70 acides aminés. Ce domaine J est suivi d'une région riche en glycine et phénylalanine (G/F) servant de domaine de liaison. Enfin, le domaine de liaison au substrat en C-terminal peut contenir un motif en doigt de zinc (Cheetham and Caplan, 1998). Les protéines J peuvent être divisées en trois sous-types suivant la composition de leur domaine (Cheetham and Caplan, 1998). La classe I (DNAJA) contient les trois domaines décrit ci-dessus. La classe II (DNJAB) contient le domaine J suivi de la région G/F mais pas de motif en doigt de zinc. La classe III (DNAJC) n'est composé que du domaine J qui peut se retrouver n'importe où dans la protéine. La présence d'un motif Histidine-Proline-Acide aspartique (HPD) en position 32-34 du domaine J est essentielle pour l'interaction avec Hsp70. La substitution de l'histidine par une glutamine empêche le domaine J d'interagir avec Hsp70 (Michels et al., 1999). Une protéine Hsp40 tronquée avec seulement le domaine J ne stimule plus l'activité ATPase de Hsp70 et agit comme un mutant dominant négatif sur la protéine Hsp40 endogène (Michels et al., 1999).

Hsp90 est également une famille de chaperonnes très conservées et abondantes dans la cellule mais contrairement à Hsp70, elle intervient plus tardivement dans le repliement des protéines. En effet, Hsp90 facilite la maturation finale de ses substrats et permet de stabiliser leur conformation (Bose and Cho, 2017; Lackie et al., 2017). Il existe dans le protéome humain une forme constitutive (Hsp90 α) et une forme inductible (Hsp90 β) (Maiti et al., 2014). Les kinases, les facteurs de transcriptions et les récepteurs aux hormones stéroïdiennes font partie des clients de Hsp90, ce qui

indique que Hsp90 n'intervient pas uniquement dans la régulation du repliement des protéines mais contribue à d'autres processus cellulaires variés comme la signalisation, le transport intracellulaire ou encore la dégradation des protéines (Lackie et al., 2017).

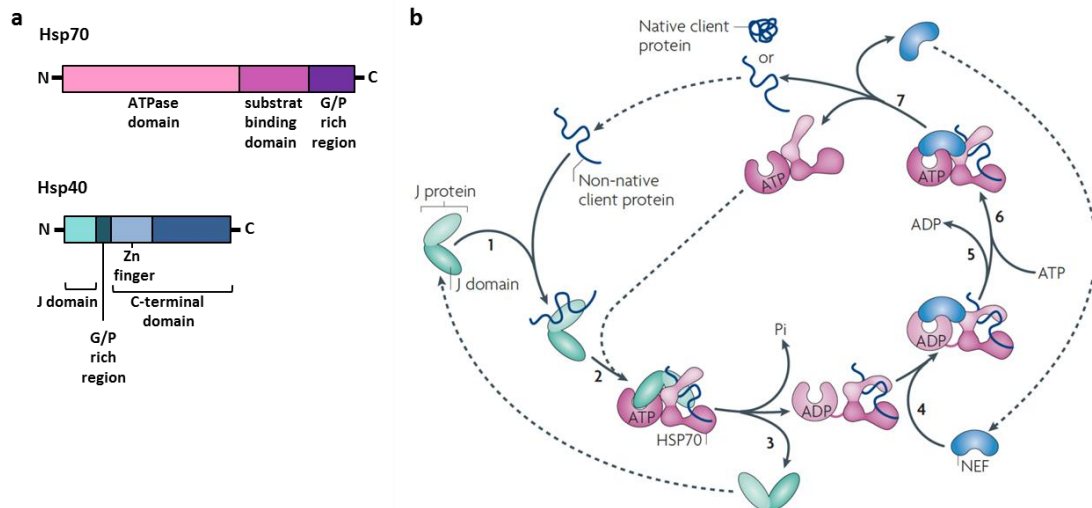


Figure 28- Le repliement des protéines par le système Hsp70/Hsp40. **a.** Structure des chaperonnes Hsp70 et Hsp40. **b.** A l'état basal, l'activité ATPase de Hsp70 est faible. Les protéines J/Hsp40 recrutent le substrat (1) et stimulent l'activité ATPase de Hsp70 qui acquiert une haute affinité pour le substrat protéique (2). L'hydrolyse de l'ATP permet le repliement de la protéine cible par Hsp70 (3). Les protéines NEF sont ensuite recrutées (4) et facilitent la libération de l'ADP (5) et le recrutement de l'ATP (6). Hsp70 retrouve ainsi son état basal et peut de nouveau recruter une protéine non repliée via la protéine J (7). (Kampinga and Craig, 2010).

Les chaperonnes sont donc des protéines essentielles dans le maintien de l'homéostasie cellulaire en se chargeant du bon repliement des protéines dès leur synthèse et tout au long de leur vie leur permettant ainsi d'agir correctement. Si ce repliement se fait mal, les chaperonnes interviennent également dans la dégradation des protéines mal conformées.

ii. L'autophagie médiée par les chaperonnes

Afin de prévenir l'accumulation de protéines agrégées à l'origine de pathologies, les neurones utilisent un ensemble de protéines chaperonnes qui participent au bon repliement des protéines. Si cette tentative échoue, les chaperonnes peuvent également faciliter la dégradation de ces protéines mal conformées en interagissant avec l'UPS ou le système autophagie-lysosome (Ciechanover and Kwon, 2017). De plus, la CMA est un type d'autophagie très sélectif et constitutif faisant intervenir les protéines chaperonnes et des récepteurs lysosomaux pour dégrader les protéines cibles. La CMA a été, jusqu'à présent, seulement décrit chez les oiseaux et les mammifères (Kaushik and Cuervo, 2018). Une des caractéristiques de cette voie de dégradation est qu'elle sélectionne individuellement ces substrats via un motif pentapeptidique consensus, KFERQ, présent dans leur séquence. Ce motif de reconnaissance est présent dans environ 40% des protéines des mammifères. Mais ce même type de motif peptidique peut être également généré à partir d'autres séquences protéiques par des modifications post-traductionnelles, augmentant ainsi le nombre de

substrats potentiels pour la CMA (Kaushik and Cuervo, 2018). Ce grand nombre de substrats indique que la CMA est un système régulant de nombreux processus biologiques dans la cellule.

La CMA s'effectue en plusieurs étapes : 1/ la reconnaissance du substrat et le ciblage au lysosome, 2/ la liaison au lysosome et le dépliement du substrat, 3/ la translocation du substrat dans la lumière du lysosome et 4/ la dégradation du substrat (Cuervo and Wong, 2014) (**Figure 29**). Lors de la première étape, la protéine cible contenant le motif KFERQ est reconnue par la chaperonne Hsc70 dans le cytosol. Plusieurs autres chaperonnes sont impliquées dans ce processus comme Hsp40, Hsp70 et Hip (Cai et al., 2015). Une fois lié à Hsc70, le substrat est transporté à la surface du lysosome où il interagit avec la queue cytosolique du récepteur LAMP2A (lysosome-associated membrane protein type 2A). Le niveau cellulaire et la conformation de LAMP2A sont critiques pour le déroulement de la CMA, c'est le point limitant de ce processus. Il existe 3 variants d'épissage du gène codant pour LAMP2. LAMP2A, LAMP2B et LAMP2C ont des régions luminales identiques mais des régions transmembranaires et cytosoliques différentes. LAMP2A est le seul requis pour la CMA et le meilleur critère pour déterminer si la dégradation d'une protéine se produit via la CMA (Kaushik and Cuervo, 2018). La protéine substrat peut se lier au récepteur LAMP2A dans un état replié, mais pour traverser la membrane lysosomale, elle doit impérativement être dépliée (Salvador et al., 2000). Ce dépliement est effectué par la chaperonne Hsc70 avec l'aide de ses co-chaperonnes (Cuervo and Wong, 2014).

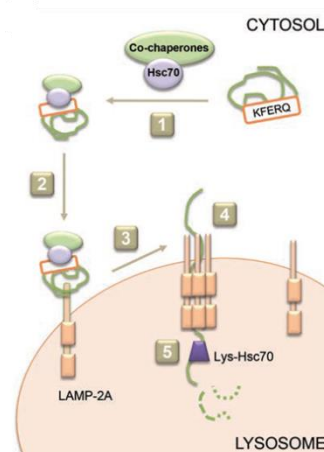


Figure 29- Les différentes étapes de la CMA. Dans le cytosol, Hsc70, avec ses co-chaperonnes, reconnaît la protéine cible exhibant un motif KFERQ (1) et les transporte jusqu'au lysosome (2). À la surface du lysosome, la protéine cible interagit avec le récepteur LAMP2A. LAMP2A s'oligomérisse (3) et permet la translocation de la protéine cible avec l'aide de Lys-Hsc70, la forme lysosomale de Hsc70 (4). Une fois dans la lumière du lysosome, la protéine cible est dégradée (5). LAMP2A revient alors à sa conformation monomérique. (Cuervo and Wong, 2014).

LAMP2A est présent sous forme de monomère au niveau de la membrane du lysosome mais peut former un complexe multimérique en s'associant à d'autres protéines (Bandyopadhyay et al., 2008). Dans un premier temps, le substrat CMA se lie à la forme monomérique de LAMP2A et cette interaction conduit à l'oligomérisation de LAMP2A en un complexe de 700 kDa indispensable à la translocation du substrat dans la lumière du lysosome (Cai et al., 2015). Hsp90 stabilise LAMP2A à la membrane du lysosome et participe à la régulation de son oligomérisation (Bandyopadhyay et al., 2008). La translocation de la protéine cible nécessite également la présence d'une forme particulière de Hsc70 résidente dans le lysosome (lys-Hsc70) (Cuervo and Wong, 2014). Les lysosomes ne

comportant pas cette chaperonne ne peuvent pas dégrader le substrat via la CMA (Kaushik and Cuervo, 2018).

Une fois transloquée dans la lumière du lysosome, la protéine cible est dégradée par les protéases lysosomales et LAMP2A se désassemble rapidement du complexe de translocation pour revenir à sa forme monomérique et ainsi se lier à de nouveaux substrats (**Figure 29**). L'activité CMA est fortement associée au niveau de LAMP2A à la membrane du lysosome (Cuervo and Dice, 1996). La synthèse et la dégradation de LAMP2A et sa redistribution de la lumière à la membrane lysosomale contribuent à la modulation du niveau de LAMP2A et ainsi à l'activité de la voie de dégradation CMA (Cai et al., 2015). Jusqu'à ce jour, il a été montré que deux protéines, GFAP et EF1 α , étaient impliquées dans la régulation de l'assemblage/désassemblage de LAMP2A. En effet, l'association de la GFAP au complexe de translocation contribue à sa stabilisation (Cuervo and Wong, 2014).

iii. Interactions entre les chaperonnes et les systèmes de protéolyse

Les protéines chaperonnes sont en première ligne pour détecter les protéines mal conformées et les diriger, si nécessaire, vers les systèmes de dégradation (Tyedmers et al., 2010; Lilienbaum, 2013).

Comme nous avons pu le voir, Hsp70 et Hsp90, en association avec leur co-chaperonnes, jouent un rôle majeur dans le système de contrôle-qualité protéique de la cellule et interagissent ainsi avec les autres voies de ce système, UPS et autophagie (Reis et al., 2017). Hsp90 participe à la stabilisation des protéines et inhibe leur ubiquitination et leur dégradation. Au contraire, Hsp70 peut rediriger des protéines mal repliées vers les systèmes de dégradation en favorisant leur ubiquitination (Kettern et al., 2010; Reis et al., 2017) (**Figure 30**). Par exemple, CHIP, une co-chaperonne des deux grandes familles Hsp, peut atténuer l'activité ATPase et de repliement de Hsp70 et agir comme une ligase E3 pour faciliter le transfert d'une chaîne polyubiquitinylée sur la protéine mal repliée (Ballinger et al., 1999; Jiang et al., 2001). D'autres co-chaperonnes comme les BAG participent également à la coordination entre les différents systèmes de protéostasie. Bag-1 joue un rôle dans l'interaction entre Hsp70 et le protéasome alors que Bag-3, qui est associé aux Hsps et également à p62, favorise la dégradation des substrats par autophagie (Gamerding et al., 2011; Lilienbaum, 2013) (**Figure 30**). Le ratio BAG3/BAG1 régule donc la dégradation par autophagie comparée à celle par UPS et augmente au cours du vieillissement afin de favoriser l'autophagie (Gamerding et al., 2011).

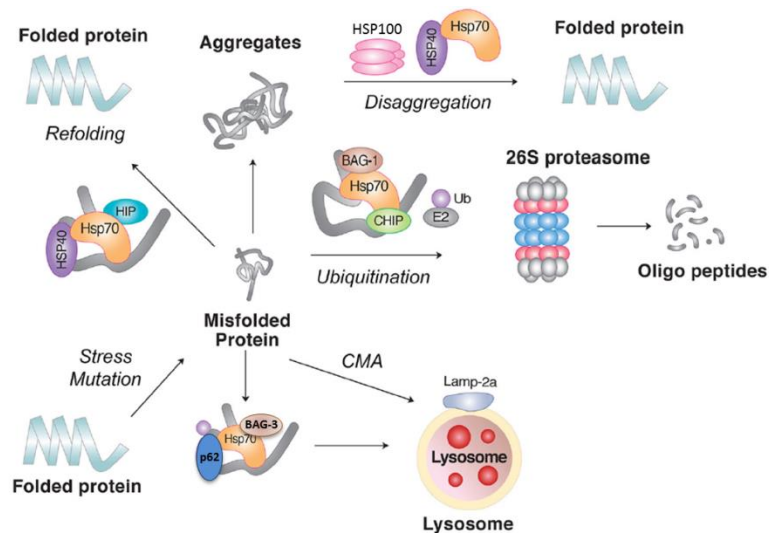


Figure 30- Interactions des chaperonnes avec les systèmes de protéolyse cellulaire. Les chaperonnes sont responsables du repliement des protéines. Si ce repliement se fait mal, les chaperonnes peuvent également diriger les protéines vers les systèmes de dégradation de la cellule, UPS, autophagie et CMA. Certains complexes de chaperonnes sont également capable de désagréger les agrégats formés par les protéines mal conformées. Adapté de (Ciechanover and Kwon, 2017).

La CMA n'agit pas non plus complètement indépendamment des autres voies de dégradation. Au contraire, l'activité de la CMA est étroitement coordonnée aux autres formes d'autophagie mais également avec le système UPS (Wong and Cuervo, 2010; Park and Cuervo, 2013). Les points d'interactions entre la CMA et les autres systèmes de protéolyse sont multiples et vont dans les deux sens. En effet, lorsque l'activité de la macroautophagie et de l'UPS est diminuée, la CMA est suractivée (Kaushik et al., 2008; Koga et al., 2011a). A l'inverse, une forte activation de la macroautophagie est induite lorsque la CMA est bloquée (Massey et al., 2006). Bien que la macroautophagie et la CMA puissent se compenser en général, leurs fonctions sont bien distinctes et non redondantes et leur perte de fonctions finit par devenir évidente (Cuervo and Wong, 2014; Kaushik and Cuervo, 2018). L'inhibition de la CMA impacte également le fonctionnement du système UPS en perturbant le recyclage des sous-unités du protéasome et donc son assemblage (Massey et al., 2008).

L'interaction de ces systèmes permet le maintien de la protéostasie (Schmidt and Finley, 2014). La compensation entre ces systèmes peut en partie expliquer l'apparition tardive de plusieurs maladies liées à l'âge dans lesquelles une perte de l'homéostasie protéique est finalement observée (Cuervo and Wong, 2014).

b. Les chaperonnes dans la maladie de Huntington

i. Les protéines chaperonnes

Les maladies neurodégénératives, caractérisées par l'agrégation de protéines, défient le système de protéostasie cellulaire. Dans la MH, il a été montré que plusieurs chaperonnes peuvent moduler la toxicité liée à la mHtt par différents mécanismes et agir en synergie afin d'atténuer la progression de la maladie (Koyuncu et al., 2017).

Les chaperonnes peuvent inhiber l'agrégation de la mHtt en prévenant les changements conformationnels dans la protéine mutée. Hsp40 et Hsp70 ont été étudiés seules ou en combinaison dans différents modèles de la MH. Alors que la surexpression de Hsp40 inhibe efficacement l'agrégation de la mHtt et sa toxicité en culture cellulaire (Jana et al., 2000; Sittler et al., 2001; Rujano et al., 2007), en culture de neurones primaires (Zhou et al., 2001) et dans des modèles murins de la MH (Labbadia et al., 2012; Popiel et al., 2012; Kakkar et al., 2016), les effets de la surexpression de Hsp70 sur la réduction des agrégats de mHtt sont plus controversés (Reis et al., 2017). En effet, l'efficacité d'inhibition de l'agrégation de la mHtt dépendrait de l'isoforme de Hsp70 utilisée. Par exemple, la surexpression de la forme constitutive Hsc70 diminue le nombre d'agrégats de mHtt dans des cellules Neuro2a, alors que la surexpression de la forme inductible Hsp70 ne modifie pas ce nombre (Jana et al., 2000). En revanche, la co-expression de Hsp40 et Hsp70 réduit de manière synergique l'agrégation de la mHtt (Sittler et al., 2001; Rujano et al., 2007).

L'implication dans la diminution de l'agrégation d'autres familles de chaperonnes a également été étudiée au cours de la MH, comme les sHsps et Hsp100. Il a été notamment montré que Hsp27 et Hsp104 réduisent la toxicité liée à la mHtt dans des cultures primaires de neurones striataux et *in vivo* dans un modèle lentiviral de rat sans diminuer le nombre total d'agrégats de mHtt (Perrin et al., 2007). En effet, la surexpression de ces deux chaperonnes entraînent un changement de la distribution des agrégats avec moins de gros agrégats nucléaires et plus de petits agrégats non nucléaires. Le fait de ne pas voir de modifications du nombre total d'agrégats peut partiellement être expliqué par la survie des neurones striataux qui gardent ainsi leurs agrégats. Dans une étude similaire, la surexpression de Hsp27 dans un modèle cellulaire de la MH diminue la toxicité liée à la mHtt et la production de radicaux libres sans altérer le nombre d'agrégats (Wytttenbach et al., 2002). Comme dernier mécanisme de défense, les protéines chaperonnes peuvent aussi directement dissoudre les agrégats déjà formés. Chez les mammifères, la famille des Hsp100 et le duo Hsp70/Hsp40, notamment les protéines HSP110, HSPA1A et DNAJA1 et DNAJB1, sont connues pour avoir ses capacités désagrégantes (Ciechanover and Kwon, 2017). L'ensemble de ces études montrent que les chaperonnes peuvent améliorer la neurodégénérescence par plusieurs mécanismes différents.

Les chaperonnes peuvent également agir à différents stades du processus d'agrégation de la mHtt comme la nucléation, l'élongation et la fragmentation des fibrilles (Balchin et al., 2016). Par exemple, les protéines DNAJB6 et DNAJB8 de la famille des HSP40 interagissent directement avec le noyau d'agrégation et préviennent ainsi l'agrégation de la mHtt, alors que la majorité des autres chaperonnes interviennent plus tard en inhibant la formation des formes oligomères plus toxiques ou l'expansion des agrégats avec la séquestration des autres protéines (Muchowski et al., 2000; Gillis et al., 2013; Koyuncu et al., 2017). La chaperonine TRiC piège, par exemple, la partie N-terminale de queue polyQ de la mHtt et force son changement de conformation oligomérique en conformation fibrillaire moins toxique (Tam et al., 2009).

La famille de Hsp90 ne module pas directement l'agrégation de la mHtt. En effet, la surexpression de plusieurs membres de cette famille ne réduit pas le nombre d'agrégats (Koyuncu et al., 2017). Au contraire, l'inhibition de Hsp90 entraîne une diminution de l'agrégation de la mHtt dans des cultures

cellulaires et des organismes modèles de la MH (Koyuncu et al., 2017). Hsp90 interagit avec la mHtt et la stabilise. Par conséquent, lorsque Hsp90 est inhibée, la mHtt n'est plus stabilisée et va ainsi être plus dégradée (Baldo et al., 2012). De plus, l'inhibition de Hsp90 induit l'activation du facteur HSF1 qui induit la transcription des chaperonnes qui peuvent alors moduler l'agrégation de la mHtt.

Enfin, les chaperonnes peuvent favoriser la dégradation de la mHtt par les systèmes de protéolyse de la cellule (Koyuncu et al., 2017). En effet, il a été montré que la co-chaperonne CHIP, une ligase E3, interagit avec la mHtt et induit son ubiquitination et ainsi sa dégradation par le protéasome (Connell et al., 2001; Jana et al., 2005). La co-chaperonne Bag-1 interagit également avec la mHtt et favorise sa dégradation (Jana and Nukina, 2005; Sroka et al., 2009).

L'ensemble de ces études montre que les protéines chaperonnes sont des modulatrices importantes de l'agrégation de la mHtt et de sa toxicité dans la MH. Mais il a été montré que les agrégats peuvent séquestrer les chaperonnes comme Hsc70 et Hsp70 et leur co-chaperonnes Hsp40, ce qui pourrait contribuer au défaut de protéostasie observé dans la MH (Koyuncu et al., 2017; Reis et al., 2017). Cependant, Hsp70 aurait la capacité de s'associer et de se dissocier rapidement des agrégats de mHtt et resterait ainsi actif (Kim et al., 2002; Chai et al., 2002). Hsp70 pourrait donc réguler la formation des agrégats en s'occupant du bon repliement, de la solubilisation ou de la dégradation des protéines agrégées, ou en favorisant la séquestration des formes toxiques de la mHtt dans les agrégats (Muchowski and Wacker, 2005).

Cependant, l'expression de ces chaperonnes, et plus particulièrement de Hsp70 et Hsp40, est progressivement diminuée dans le cerveau de modèles animaux de la MH due à la combinaison d'une séquestration de facteurs de transcription et d'une dérégulation transcriptionnelle (Hay et al., 2004; Yamanaka et al., 2008; Labbadia and Morimoto, 2013). De plus, une analyse de l'expression du chaperome dans le cerveau humain de Brehme et collaborateurs a identifié un ensemble de chaperonnes présentant un changement important d'expression au cours du vieillissement et des maladies neurodégénératives dont la MH (Brehme et al., 2014). Pour étudier la dynamique du chaperome, cette étude a combiné l'analyse bioinformatique d'expression des chaperonnes avec une validation expérimentale, en interagissant avec l'expression des chaperonnes dans le modèle *C. Elegans* ainsi que dans des cellules humaines exprimant la mHtt. Ils ont ainsi identifié 16 gènes chez *C. Elegans*, comprenant Hsc70, Hsp90, TRiC, Hsp40 et les co-chaperonnes TPR, dont l'expression est altérée dans le cerveau humain âgé et qui sont fonctionnellement requises chez *C. Elegans* pour prévenir la toxicité protéique observée dans la MH. Cette étude a révélé un réseau de chaperonnes affectées au cours du vieillissement et de la MH qui sont donc essentielles au maintien de la protéostasie (Brehme et al., 2014).

Les protéines chaperonnes jouent donc un rôle important dans la prévention de l'agrégation de la mHtt, en particulier Hsp70 et Hsp40, en inhibant l'agrégation, en intervenant à différents stades de l'agrégation afin de favoriser les formes moins toxiques de la mHtt ou encore en participant à la dégradation de la mHtt par les systèmes de protéolyse cellulaire.

ii. L'autophagie médiée par les chaperonnes

La CMA et la MH sont également étroitement associées. En effet, la mHtt interagit avec les deux principaux acteurs de la CMA, Hsc70 et LAMP2A.

Des études *in vivo* ont montré une interaction entre la mHtt et Hsc70 notamment dans des modèles de drosophile et de souris de la MH (Gunawardena et al., 2003; Bauer et al., 2010). L'augmentation de l'interaction entre mHtt et Hsc70 chez les souris R6/2 réduit l'agrégation de mHtt et améliore le phénotype et la durée de vie des souris (Bauer et al., 2010). D'autres études ont montré l'implication de LAMP2A dans la dégradation de la mHtt et l'amélioration de la viabilité cellulaire par des expériences sur des cultures neuronales de rat et humaines (Yamamoto et al., 2006; Thompson et al., 2009; Qi et al., 2012). Hsc70 semble donc se lier à la mHtt dans le cytosol et la transporter jusqu'au lysosome où elle interagit avec LAMP2A puis est dégradée.

Pour être un substrat de la CMA, une protéine doit contenir dans sa séquence un motif KFERQ. La partie N-terminale de la mHtt contiendrait deux de ces motifs en position 99 et 248 (Thompson et al., 2009). Thompson et collaborateurs ont également montré qu'une autre séquence présente en position 14 pourrait devenir un motif similaire à KFERQ une fois phosphorylé (Thompson et al., 2009). En effet, la phosphorylation de la mHtt régule d'autres modifications post-traductionnelles, comme l'ubiquitination, la SUMOylation et l'acétylation, qui augmenteraient l'affinité de la mHtt pour Hsc70 et LAMP2A et ainsi la dégradation de la mHtt via la CMA (Thompson et al., 2009; Cuervo and Wong, 2014; Cai et al., 2015). Malgré la présence des motifs KFERQ, ce serait majoritairement l'exon 1 de la Htt et de sa forme mutée qui serait dégradé par la CMA et peu la Htt et mHtt entières (Koga et al., 2011b). Il est possible que des changements de conformation ou des modifications post-traductionnelles dans la région autour des motifs de ciblage de la CMA dans la forme tronquée de la mHtt facilitent l'interaction avec Hsc70 et son transport jusqu'au lysosome (Koga et al., 2011b). La forme entière de la Htt est tout de même observée au niveau de la membrane des lysosomes où elle pourrait jouer un rôle dans le transport lysosomal (Koga et al., 2011b).

La CMA est donc impliquée dans la dégradation de la mHtt. Au cours de la MH, il a été observé une augmentation de cette voie de dégradation (Koga et al., 2011b; Cai et al., 2015). Cette augmentation servirait notamment à compenser les dysfonctionnements des autres systèmes de protéostasie, macroautophagie et UPS, décrits dans la MH (Kaushik et al., 2008; Hipp et al., 2012; Cuervo and Wong, 2014). Une analyse de la distribution de LAMP2A révèle une localisation préférentielle au niveau de la membrane des lysosomes isolés au cours de la MH, similaire à celle observée lors d'une activation maximale de la CMA au cours d'un jeûne prolongé (Koga et al., 2011b; Cuervo and Dice, 2000b). La même analyse a montré une augmentation de Hsc70 au niveau de la membrane et de la lumière du lysosome, montrant l'importance des deux formes, cytosolique et luminale, de Hsc70 dans la CMA. Le niveau de LAMP2A est également augmenté *in vivo* dans le striatum de souris MH (Koga et al., 2011b). Cette augmentation pourrait être partiellement expliquée par une diminution des niveaux de cholestérol et du ganglioside GM1 dans les membranes lysosomales au cours de la MH, et par conséquent un plus faible pourcentage de LAMP2A dans des microdomaines riches en lipides dans lesquels elle est dégradée (Koga et al., 2011b).

Cependant, le vieillissement a un effet négatif sur la CMA (Kaushik and Cuervo, 2018). L'augmentation de la CMA observée dans la MH n'est pas maintenue dans les stades plus tardifs de la maladie (Koga et al., 2011b). La diminution de stabilité de LAMP2A et donc de son expression au niveau de la membrane du lysosome serait une des principales causes du déclin de l'activité de la CMA (Kiffin et al., 2007). De plus, la très forte affinité de la mHtt avec Hsc70 et LAMP2A retarde le passage de la mHtt à travers la membrane du lysosome et donc sa dégradation (Qi et al., 2012; Ciechanover and Kwon, 2015). Ce retard finit par créer un bouchon au niveau de la dégradation par CMA, altérant ainsi l'homéostasie protéique de la cellule au cours de la MH (Ciechanover and Kwon, 2015).

5. La protéostasie et les astrocytes dans la MH

Au cours des maladies neurodégénératives, et notamment dans la MH, l'agrégation et la dégénérescence sont principalement observées dans les neurones (voir paragraphe III.1.b.iv). De plus, les agrégats de mHtt qui se forment dans les cellules gliales, et notamment dans les astrocytes, sont de plus petites tailles que ceux dans les neurones (Shin et al., 2005; Meunier et al., 2016; Jansen et al., 2017). Cette différence de sensibilité face à l'agrégation entre les neurones et les cellules gliales peut en partie s'expliquer par une variabilité d'homéostasie protéique dans ces différents types cellulaires. Mais en réalité, la majorité des études sur les systèmes de protéolyse ont été faites sur les neurones ou des lignées cellulaires *in vitro* et peu ont exploré la protéostasie dans les cellules gliales, en particulier dans la MH.

a. Le système ubiquitine-protéasome

La différence de fréquence des agrégats présents dans les neurones et dans les cellules gliales suggère que les systèmes de protéolyse, notamment l'UPS, sont plus efficaces dans la glie (Jansen et al., 2017). Une étude de Tydlacka et collaborateurs a notamment montré que les astrocytes avaient une plus forte activité du système UPS comparé aux neurones (Tydlacka et al., 2008). De plus, la déplétion du protéasome 26S spécifiquement dans les neurones, favorisant la formation des agrégats et la neurodégénérescence, entraîne également un changement du statut des astrocytes qui surexpriment la GFAP et la vimentine, deux marqueurs de réactivité astrocytaire (Bedford et al., 2008; Elkhaz et al., 2013). Une réaction inflammatoire impliquant les astrocytes peut donc se mettre en place face à un défaut d'UPS dans les neurones. Chez les mammifères, il existe une forme spécialisée du protéasome 20S, appelée immunoprotéasome, stimulée par l'interféron γ (IFN γ). Cette cytokine induit la production de sous-unités β alternatives, β 1i, β 2i et β 5i, qui remplacent les sous-unités constitutives (Griffin et al., 1998). Cet immunoprotéasome serait prévalent dans les cellules présentatrices d'antigènes (Lilienbaum, 2013). Dans le cerveau de patients et de modèles murins de la MH, une augmentation de certaines sous-unités de l'immunoprotéasome a été observée au niveau du cortex et du striatum (Diaz-Hernandez et al., 2003). De plus, des composants de cet immunoprotéasome sont surexprimés dans les astrocytes réactifs du cortex de modèles murins de la MA (Orre et al., 2013). Cependant, une augmentation de

l'immunoprotéasome dans les cellules gliales au cours de la MH, et le bénéfice de cette induction pour la pathologie n'ont pas encore été décrit (Jansen et al., 2014).

b. L'autophagie

Peu d'études se sont intéressées au lien entre l'autophagie et les cellules gliales au cours de la MH (Plaza-Zabala et al., 2017). Quelques études ont cependant montré que l'accumulation de protéines pouvait entraîner une induction de l'autophagie dans les cellules gliales mais l'efficacité de cette réponse n'est pas établie (Jänen et al., 2010; Schwarz et al., 2012). Les différents types de cellules gliales peuvent développer une réponse adaptée de l'autophagie afin de favoriser certaines fonctions. Par exemple, les oligodendrocytes augmentent la myélinisation en réponse à une augmentation de l'autophagie dans un contexte de démyélinisation (Smith et al., 2013). Les astrocytes peuvent utiliser l'autophagie lors de l'élimination des axones (Song et al., 2008). L'activation immunitaire au cours de la MA est associée à une augmentation de l'activité des autophagosomes dans la microglie (Su et al., 2016). En effet, de plus en plus de données indiquent que l'autophagie pourrait jouer un rôle dans la régulation de l'inflammation microgliale au cours de la MH et de la MP. Mais aucune étude, connue à ce jour, n'a évalué l'implication de l'activation de des cellules gliales sur l'autophagie au cours de la MH (Plaza-Zabala et al., 2017).

c. Les chaperonnes

En réponse à un stress cellulaire, les astrocytes surexpriment des chaperonnes comme Hsp70, Hsp40, les sHsp (Hsp27 et l' α -B-crystalline (α -Bc)) et des co-chaperonnes (Acarin et al., 2002; Bajramović et al., 2000; Bidmon et al., 2004; Dabir et al., 2004). Par exemple, une plus forte activité de la co-chaperonne CHIP est observée dans les astrocytes par rapport aux neurones, ce qui induit une plus forte activité de Hsp70 et une dégradation plus rapide des protéines mal conformées dans les astrocytes (Zhao et al., 2017). Les neurones expriment plus abondamment HspBP1 qui inhibe l'activité de CHIP, ce qui pourrait contribuer à la plus forte accumulation des agrégats de mHtt dans les neurones (Zhao et al., 2017). Parmi les Hsps aux capacités anti-agrégantes, α -Bc est connue pour réduire l'agrégation de la mHtt et sa toxicité dans des modèles de drosophile et souris de la MH. Dans le cerveau, α -Bc s'expriment majoritairement dans les astrocytes et oligodendrocytes et son expression est réduite dans la MH. La surexpression astrocytaire de cette protéine dans le modèle de souris BACHD améliore les déficits moteurs et cognitifs, prévient la perte neuronale dans le cortex et le striatum et diminue le niveau de mHtt soluble et la taille des agrégats de mHtt (Oliveira et al., 2016). L' α -Bc astrocytaire régule l'agrégation de la mHtt en permettant le repliement correct de la mHtt ou en favorisant sa dégradation avec l'aide d'autres chaperonnes comme le complexe Hsp70/Hsp40.

De plus, des études ont récemment montré que les chaperonnes peuvent diminuer l'agrégation protéique par des mécanismes d'interaction cellulaire via une transmission par des exosomes (Takeuchi, 2018). C'est par exemple le cas des protéines chaperonnes Hsp70, Hsp40, Hsp90 et des sHsps. Cependant, les mécanismes par lesquels les Hsp sont sécrétées via les exosomes

ne sont pas encore établis. Une analyse fonctionnelle de la structure de Hsp40 a démontré que la sécrétion de Hsp40, et particulièrement de DNAJB1, nécessitait son domaine J (Popiel et al., 2012; Takeuchi et al., 2015). Les chaperonnes peuvent donc être transportées entre les cellules du SNC via des exosomes et ainsi inhiber la formation des agrégats dans la cellule réceptrice. Les astrocytes peuvent sécréter des exosomes, ce qui peut notamment leur permettre d'effectuer leur fonction de support aux neurones (Taylor et al., 2007; Guitart et al., 2016). Les exosomes astrocytaires peuvent contenir des chaperonnes comme Hsp70 et α -Bc (Taylor et al., 2007; Nafar et al., 2016). Cependant, une étude rapporte que la sécrétion des exosomes par les astrocytes est altérée dans la MH (Hong et al., 2017). En effet, l'accumulation de mHtt diminue la sécrétion d'exosomes astrocytaires et affecte la transcription de Hsp comme l' α -Bc. L'injection d'exosomes astrocytaires dans le striatum de souris KI Hdh140 réduit la densité des agrégats de mHtt et la surexpression d' α -Bc améliore la sécrétion des exosomes astrocytaires et la neuropathologie (Hong et al., 2017).

La MH est donc caractérisée par l'agrégation de la mHtt. Les agrégats de mHtt sont des structures très ordonnées et dynamiques dont le rôle bénéfique ou délétère dépendrait du stade de la pathologie. Au cours de la MH, les agrégats permettraient, dans un premier temps, de retarder la mort cellulaire en piégeant les formes solubles les plus toxiques de la mHtt mais l'accumulation d'agrégats de mHtt finirait par interférer avec le fonctionnement cellulaire et entraînerait la mort. Au cours de la MH, un déclin progressif des différents systèmes de protéostasie de la cellule (UPS, autophagie-lysosome, protéines chaperonnes et CMA) est observée et peut expliquer l'accumulation intracellulaire de mHtt. De plus, les agrégats de mHtt sont majoritairement présents dans les neurones par rapport aux cellules gliales. En effet, les systèmes de protéolyse semblent être plus efficaces dans la glie, et en particulier dans les astrocytes. De plus, les astrocytes, qui sont essentiels pour le bon fonctionnement neuronal dans le SNC, pourraient sécréter des protéines chaperonnes via des exosomes et ainsi contribuer à la régulation de l'agrégation dans les neurones. Au cours de la MH, les astrocytes deviennent réactifs. Le rôle de cette réactivité astrocytaire dans l'évolution de la MH, et en particulier sur l'agrégation de la mHtt, n'est pas connu.

IV. Problématique et objectifs de la thèse

La MH est maladie neurodégénérative caractérisée par une dégénérescence préférentielle des neurones striataux. Cette neurodégénérescence s'accompagne de la présence d'astrocytes réactifs. La réactivité astrocytaire est une réaction complexe et son rôle dans les MND, et particulièrement dans la MH, est toujours peu compris. Il est nécessaire de pouvoir moduler cette réactivité astrocytaire *in vivo* dans des modèles murins de la MH afin d'étudier son impact sur la pathologie.

Notre équipe a montré que la voie JAK2-STAT3 était une voie centrale activée dans les astrocytes réactifs de plusieurs modèles de MND, et notamment dans la MH. Le vecteur viral, surexprimant l'inhibiteur de la voie SOCS3, inhibe efficacement la réactivité astrocytaire dans plusieurs espèces et modèles de MND (Ben Haim et al., 2015a). Notre équipe a également développé la stratégie inverse avec des vecteurs viraux surexprimant une forme constitutivement active de JAK2 (JAK2ca) permettant d'activer la voie JAK2-STAT3 et ainsi les astrocytes réactifs ((Ceyzériat et al., 2018), **Article 2**, Annexe 1). La voie JAK2-STAT3 est nécessaire et suffisante à l'induction de la réactivité astrocytaire dans des modèles de MND. Notre équipe a donc développé des outils permettant de moduler *in vivo* la voie JAK2-STAT3 et ainsi de contrôler la réactivité astrocytaire. L'utilisation de ces vecteurs viraux *in vivo* chez la souris a permis d'étudier l'impact de la réactivité astrocytaire dans deux MND, la maladie d'Alzheimer (MA) ((Ceyzériat et al., 2018), **Article 2**, Annexe 1 dont je suis co-auteur) et la MH (**Article 1**).

Le cœur de mon projet de thèse a été de comprendre le rôle des astrocytes réactifs dans le contexte de la MH (**Figure 31**). L'utilisation du vecteur lentiviral SOCS3 a permis de mettre en évidence que l'inhibition de la réactivité astrocytaire augmentait le nombre d'agrégats de mHtt dans le modèle lentiviral de la MH (Ben Haim et al., 2015a). Le premier objectif de mon projet de thèse a été de confirmer l'effet de la réactivité astrocytaire sur l'agrégation de la mHtt notamment en effectuant la manipulation inverse, c'est-à-dire activer les astrocytes réactifs dans un modèle KI plus progressif de la MH, les souris Hdh140. Le deuxième objectif de ma thèse a été de comprendre les mécanismes sous-tendant cet effet des astrocytes réactifs sur l'agrégation de la mHtt en s'intéressant particulièrement aux systèmes de protéostasie (UPS, autophagie-lysosome et chaperonnes). Cette étude dans le contexte de la MH a fait l'objet d'un second article dont je suis premier auteur (**Article 1**) et révèle, qu'au cours de la MH, les astrocytes ne perdent pas seulement leurs fonctions de support comme décrit dans la littérature, mais peuvent, en devenant réactifs, acquérir des propriétés bénéfiques en diminuant l'agrégation de la mHtt.

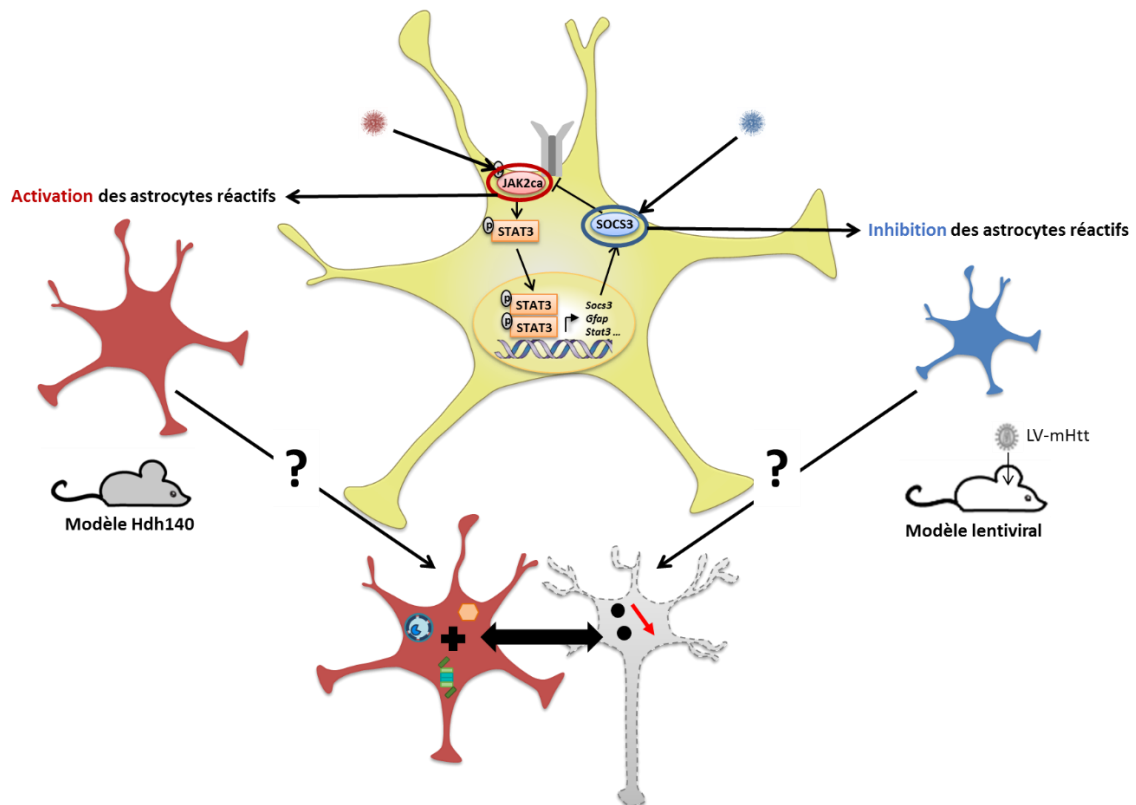


Figure 31- Etude de l'impact de la réactivité astrocytaire sur l'agrégation de la mHtt au cours de la MH. Nous modulons la réactivité astrocytaire *in vivo* dans deux modèles de la MH en ciblant la voie JAK2-STAT3 spécifiquement dans les astrocytes. Nous étudions particulièrement l'effet de la réactivité astrocytaire sur l'agrégation de la mHtt dans les neurones et des mécanismes impliqués dans cet effet, notamment les systèmes de protéostasie dans les astrocytes réactifs.

Ce manuscrit de thèse est une thèse sur article. Un article publié en 2018, dont je suis co-auteur, présente la caractérisation de la stratégie de modulation de la réactivité astrocytaire utilisée dans notre projet (**Article 2, Annexe 1**). Cet article a été mis en Annexe 1 afin de faciliter la lecture de ce manuscrit en se focalisant sur le cœur de ma thèse : l'étude des astrocytes réactifs au cours de la MH. L'article 1, dont je suis premier auteur, représente l'article principal de ma thèse portant sur l'effet anti-agrégant des astrocytes réactifs au cours de la MH et la compréhension des mécanismes sous-jacents cet effet (**Article 1, Résultats**). Au cours de ma thèse, j'ai également participé à l'écriture d'une revue sur la voie JAK-STAT3 et son rôle dans les astrocytes (**Article 3, Annexe 2**).

RÉSULTATS

ARTICLE 1

Reactive astrocytes acquire anti-aggregation capacities in Huntington's disease

Objectifs de l'article 1

Au cours de la MH, les fonctions de support des astrocytes, comme l'homéostasie glutamatergique et potassique, sont altérées. La présence d'astrocytes réactifs est également observée précocément dans le cerveau des patients MH, mais le rôle de cette réactivité est encore mal compris. Le développement de nos vecteurs viraux modulant la réactivité astrocytaire *in vivo* a permis d'étudier la contribution de la réactivité astrocytaire dans plusieurs modèles de la MH.

Nous avons utilisé deux modèles complémentaires de la MH. Le modèle lentiviral LV_N-mHtt présente une forte réactivité astrocytaire que nous inhibons par l'expression de SOCS3. Au contraire, une faible réactivité astrocytaire est observée tardivement dans le modèle plus progressif de la MH, les souris Hdh140. Nous activons les astrocytes réactifs dans ce modèle avec JAK2ca. Notre équipe a récemment montré que l'inhibition de la réactivité astrocytaire augmentait le nombre d'agrégats de mHtt dans le modèle lentiviral de la MH (Ben Haim et al. 2015). Dans ce nouvel article, nous avons confirmé la diminution du nombre mais également de la taille des agrégats de mHtt par les astrocytes réactifs dans le modèle LV_N-mHtt ainsi que dans les souris Hdh140. Ces agrégats de mHtt sont majoritairement observés dans les neurones. L'effet de la réactivité astrocytaire sur l'agrégation de la mHtt dans les neurones semble donc impliquer un dialogue entre les astrocytes réactifs et les neurones. Afin de comprendre les changements moléculaires induits par la réactivité astrocytaire, une étude transcriptomique par microarray sur des astrocytes réactifs hors contexte pathologique a été réalisée. Cette analyse transcriptomique révèle des changements d'expression importants des gènes impliqués dans les systèmes de protéostasie au sein des astrocytes réactifs. Nous avons donc étudié ces systèmes de protéostasie dans les astrocytes réactifs dans le contexte de la MH et mesuré l'impact de la réactivité astrocytaire sur certaines altérations neuronales observées dans la MH.

Notre étude montre que, contrairement à ce qui est généralement décrit dans la littérature, les astrocytes peuvent également, en devenant réactifs, acquérir des propriétés bénéfiques au cours de la MH.

Contribution à l'article 1

Dans cet article 1, j'ai réalisé l'ensemble des expériences sur les modèles murins de la MH. L'analyse transcriptomique microarray sur les astrocytes réactifs a été effectuée par une ancienne doctorante de l'équipe, Lucile Ben Haim, en collaboration avec la plate-forme de cytométrie du CEA de Fontenay-aux-Roses et le CNRGH (Centre National de Recherche en Génomique Humaine, Evry). J'ai réalisé l'ensemble des figures et participé à la rédaction de l'article.

Reactive astrocytes acquire anti-aggregation capacities in Huntington's disease

Abjean L.^{1,2}, Ben Haim L.^{1,2}, Carrillo-de Sauvage MA.^{1,2}, Hérard AS.^{1,2}, Derbois C.³, Gipchtein P.^{1,2},
Petit F.^{1,2}, Gaillard MC.^{1,2}, Guillermier M.^{1,2}, Gaudin M.^{1,2}, Bernier S.^{1,2}, Dufour N.^{1,2}, Joséphine C.^{1,2},
Robil N.⁴, Kabani M.^{1,2}, Melki R.^{1,2}, Deleuze J-F.³, De la Grange P.⁴, Bonvento G.^{1,2}, Bémelmans A.^{1,2},
Hantraye P.^{1,2}, Olaso R.³, Brouillet E.^{1,2}, Escartin C.^{1,2}

¹ Commissariat à l'Énergie Atomique et aux Energies Alternatives, Département de la Recherche Fondamentale, Institut de Biologie François Jacob, MIRCen, 92260 Fontenay-aux-Roses, France

² Centre National de la Recherche Scientifique, Université Paris-Sud, UMR 9199, Neurodegenerative Disease Laboratory, 92260 Fontenay-aux-Roses, France

³ Commissariat à l'Énergie Atomique et aux Energies Alternatives, Département de la Recherche Fondamentale, Institut de Biologie François Jacob, Centre National de Recherche en Génomique Humaine (CNRGH), 91000 Evry, France

⁴ GenoSplice technology, 75013 Paris, France

Short title

Reactive astrocytes reduce mHtt aggregation

Key words

Astrocyte reactivity, Huntington's disease, proteostasis, Neuron-astrocyte interactions, viral vectors

Corresponding author

Carole Escartin, Ph.D.

MIRCen, UMR9199

18, route du Panorama

92260 Fontenay-aux-roses

carole.escartin@cea.fr

Conflict of interest: The authors declare no competing financial interests.

Abbreviation list

AAV	Adeno-associated virus
BCA	Bicinchoninic acid assay
BSA	Bovine serum albumin
cDNA	complementary Deoxyribonucleic acid
CNS	Central nervous system
Cts	Cathepsin
D2R	D2 dopamine receptor
DARPP32	Dopamine- and cAMP-regulated neuronal phosphoprotein
DAVID	Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery
DNAJB1-DN	Dominant negative form of human DNAJB1
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
GFP	Green fluorescent protein
GO	Gene ontology
HBSS	Hank's balanced salt solution
HD	Huntington's disease
Hdh140	KI mouse model of HD with 140 CAG
Hsp	Heat shock protein
Htt	Huntingtin
<i>i.p</i>	Intraperitoneal
IR	Immunoreactivity
JAK2	Janus kinase 2
JAK2ca	Constitutive active form of JAK2
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
LV	Lentivirus
LVA	LV targeting astrocytes
LVN	LV targeting neurons
mHtt	mutant Htt
mRNA	messenger ribonucleic acid
ND	Neurodegenerative disease
NGS	Normal goat serum
OPC	Oligodendrocyte precursor cells
PBS	Phosphate buffer saline
PBST	PBS with 0.2% Triton X-100
PFA	Paraformaldehyde
RT	Room temperature
<i>s.c</i>	Subcutaneous
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SOCS3	Suppressor of cytokine signaling 3
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
STRING	Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins
TBS	Tris-buffered saline
TBST	TBS with 0.1% Tween 20
Tx	Triton X-100
Ub	Ubiquitin
UPS	Ubiquitin-proteasome system
VG	Viral genome
WPRE	Woodchuck Hepatitis Virus Posttranscriptional Regulatory Element
WT	Wild type

ABSTRACT

Huntington's disease (HD) is a fatal genetic neurodegenerative disease characterized histologically by striatal neuron degeneration, aggregates of mutant Huntingtin (mHtt) and astrocyte reactivity. Astrocytes are crucial partners for neurons, performing key supportive functions. In pathological conditions, astrocytes become reactive. This is primarily characterized at the morphological level but it also involves significant changes in gene expression and still unclear functional alterations. Indeed, most studies report defects in astrocyte functions in HD mouse models, but these models do not reproduce strong astrocyte reactivity observed in patients.

To establish the roles of reactive astrocytes in HD, we took advantage of our recently developed viral vectors to induce or block astrocyte reactivity *in situ* by targeting the JAK2-STAT3 pathway. In a lentiviral and a knock-in mouse model of HD, we found that reactive astrocytes reduced the number and size of mHtt aggregates that mainly form in neurons. Reduced mHtt aggregation was associated with improved neuronal features. To identify underlying molecular mechanisms, genome-wide transcriptomic analysis of acutely sorted reactive astrocytes was performed and revealed significant changes in expression of genes linked to proteostasis. Lysosomal and proteosomal activities were increased in reactive astrocytes in HD mice, suggesting that these cells could siphon mHtt away from neurons. Alternatively, several chaperones were found upregulated in reactive astrocytes. In particular, the co-chaperone DNAJB1/Hsp40 was overexpressed by reactive astrocytes and was found in extracellular exosomes. Manipulation of DNAJB1/Hsp40 activity in reactive astrocytes impacted mHtt aggregation and neuronal survival in HD models, suggesting that reactive astrocytes can provide neurons with beneficial anti-aggregation molecules.

Overall, our study shows that astrocytes, by becoming reactive in HD, develop a protective response that involves complex bidirectional signaling with neurons to reduce mHtt aggregation and toxicity. Reactive astrocytes are not only defective cells as usually reported, but can also acquire enhanced capacities to promote mHtt clearance and neuronal function, which has strong therapeutic relevance for HD.

INTRODUCTION

Huntington's disease (HD) is a genetic neurodegenerative disease that causes involuntary movements, psychiatric symptoms and cognitive deficits, with no curative treatment yet available ([Bates et al., 2015](#); [McColgan and Tabrizi, 2018](#)). HD is caused by the mutation in the *Huntingtin* (*Htt*) gene, leading to a longer expansion of CAG triplets encoding glutamine ([The Huntington study group, 1993](#)). HD is thought to result from both a gain of toxic functions of mutant Htt (mHtt) and a loss of normal Htt functions ([Saudou and Humbert, 2016](#)). HD is characterized by the death of striatal neurons and the presence of mHtt aggregates mostly in neurons ([DiFiglia et al., 1997](#)), but also in glial cells ([Jansen et al., 2017](#)). The striatum of HD patients is also characterized by the presence of reactive astrocytes, which are classically characterized by their hypertrophic morphology and overexpression of Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP), an intermediate filament protein ([Selkoe et al., 1982](#); [Vonsattel et al., 1985](#)). In normal conditions, astrocytes are essential for neurons, they perform many key functions such as metabolic and trophic support, antioxidant defense and regulation of synaptic transmission and plasticity ([Verkhratsky and Nedergaard, 2018](#)). How are those functions changed in the HD brain? Most publications report defective astrocytes in HD ([Khakh et al., 2017](#)). This includes reduced glutamate uptake ([Lievens et al., 2001](#); [Shin et al., 2005](#)), altered K⁺ buffering ([Tong et al., 2014](#)), impaired regulation of blood flow ([Hsiao et al., 2015](#)), as well as reduced synthesis and release of antioxidants ([Rebec et al., 2002](#)), trophic factors ([Wang et al., 2012](#); [Hong et al., 2016](#)), gliotransmitters ([Wojtowicz et al., 2013](#)) and exosomes ([Hong et al., 2017](#)) by astrocytes. However, in most mouse models studied, astrocytes do not display the conventional hallmarks of reactivity [GFAP overexpression and hypertrophy ([Tong et al., 2014](#); [Ben Haim et al., 2015a](#); [Khakh et al., 2017](#))]. Therefore astrocyte reactivity, which is an early histopathological feature in the caudate-putamen of HD patients ([Vonsattel et al., 1985](#); [Faideau et al., 2010](#)), is not well recapitulated in these rodent models ([Khakh et al., 2017](#)). The consequences of the reactive status of astrocytes in HD is still mostly unexplored.

To study how reactive astrocytes contribute to diseases, we developed viral vectors that either activate or inhibit in mouse astrocytes the JAK2-STAT3 pathway, a master-regulator of astrocyte reactivity ([Ceyzériat et al., 2016](#)). They efficiently stimulate or prevent astrocyte reactivity in the mouse brain ([Ben Haim et al., 2015b](#); [Ceyzériat et al., 2018](#)). We previously reported that inhibition of astrocyte reactivity in an acute model of HD increases mHtt aggregates ([Ben Haim et al., 2015b](#)). mHtt aggregates are composed of N-terminal fragments of mHtt ([Gutekunst et al., 1999](#)), which co-aggregates different proteins like transcription factors, chaperones, or other housekeeping proteins ([Schaffar et al., 2004](#); [Hosp et al., 2017](#)). By trapping these important proteins and generating steric hindrance, mHtt aggregates may be toxic to cells. But aggregates are also thought to be an efficient

may of removing toxic soluble mHtt from intracellular environment ([Arrasate et al., 2004](#)). mHtt aggregates are thus integral features of HD, but their role is still difficult to pinpoint, as a change in their number or size can result from increased aggregate clearance, reduced aggregation of soluble mHtt with or without effects on soluble levels. Soluble mHtt can be degraded, although with reduced efficiency, by the ubiquitin proteasome system (UPS), while aggregates can only be cleared by autophagy coupled to lysosomal degradation ([Cortes and La Spada, 2014](#); [Ortega and Lucas, 2014](#)). How these systems are impaired in HD and whether they play a causal role in disease progression is still a matter of debate ([Rubinsztein, 2006](#); [Harding and Tong, 2018](#)). Interestingly, astrocytes were reported to have higher proteolytic capacity, in particular for mHtt, which could explain why fewer aggregates are found in astrocytes ([Tydlacka et al., 2008](#); [Zhao et al., 2017](#)). But it is unknown whether the UPS and autophagy/lysosomes systems are impacted by reactivity in HD ([Jansen et al., 2014](#)) and whether they contribute to mHtt clearance. Another important proteostasis mechanism to prevent mHtt aggregation is operated by chaperones, which promote Htt proper folding, prevent abnormal interactions with cellular proteins and guide mHtt to degradation systems ([Ciechanover and Kwon, 2017](#); [Koyuncu et al., 2017](#)). In particular, members of the Heat Shock Protein (Hsp) family have strong anti-aggregation properties towards mHtt in different cellular systems ([Koyuncu et al., 2017](#); [San Gil et al., 2017](#); [Harding and Tong, 2018](#)).

Here, we aimed to establish whether reactive astrocytes contribute to the clearance of toxic mHtt in neurons, in relevant HD models and understand the trans-cellular mechanisms involved. With different mouse models of HD, we found that induction of astrocyte reactivity reduces the number and size of mHtt aggregates that form in neurons, without increasing soluble mHtt levels. By genome-wide transcriptomics and functional analysis of acutely sorted reactive astrocytes, we found that these cells express a different profile of genes involved in proteostasis and have higher proteolytic activity. In parallel, they express higher levels of the co-chaperone DNAJB1/Hsp40, which is found in extracellular exosomes and is involved in reducing mHtt aggregation in neurons. Our results show that neurons and reactive astrocytes engage in a bi-directional communication during HD, eventually leading to reduced mHtt aggregation and improved neuronal status.

METHODS

Mice.

Heterozygous knock-in mice expressing a chimeric mouse/ human exon 1 containing 140 CAG repeats inserted into the murine Htt gene (Hdh140) and their control littermates on a 129 Sv x C57BL/6J background were used ([Menalled et al., 2003](#)). Male and female Hdh140 mice were injected at 7-10 months and studied 4 months later. Wild type (WT), adult male C57BL/6J mice were also used. They were injected at 10 weeks, with viruses encoding JAK2ca to induce astrocyte reactivity independently of a specific disease context or with a virus encoding mHtt to model HD. They were studied 6 weeks later.

All experimental protocols were reviewed and approved by the local ethics committee (CETEA N°44) and submitted to the French Ministry of Education and Research (Approval # APAFIS#4554-2016031709173407). They were performed in a facility authorized by local authorities (authorization #D92-032-02), in strict accordance with recommendations of the European Union (2010-63/EEC). All efforts were made to minimize animal suffering and animal care was supervised by veterinarians and animal technicians skilled in rodent healthcare and housing. Animals were housed under standard environmental conditions (12-hour light-dark cycle, temperature: 22 ± 1°C and humidity: 50%) with *ad libitum* access to food and water. Mice of the appropriate genotype were randomly allocated to experimental groups.

Viral vectors.

We either used lentiviral vectors (LV) or adeno-associated virus (AAV) to drive transgene expression in neurons or in astrocytes. Both AAV and LV transduce striatal astrocytes with high efficiency and selectivity (**Supplemental Fig. 1a**).

To target neurons, LV were pseudotyped with the G-protein of the vesicular stomatitis virus ([Naldini et al., 1996](#)). To target astrocytes, LV were pseudotyped with the rabies-related Mokola envelope and contained four repeats of the Mir124 target to repress transgene expression in neurons ([Colin et al., 2009](#)). Lentiviral vectors are referred to as “LVA- or LVN-name of the transgene” depending the cell type targeted: A for astrocytes and N for neurons. Lentiviral particles titers were determined by ELISA quantification of the nucleocapsid p24 protein.

AAV (AAV2, serotype 9) bear the gfaABC₁D promoter, a synthetic promoter derived from the GFAP promoter ([Lee et al., 2008](#)) and target astrocytes. Viral genome concentration was determined by qPCR on DNase resistant particles.

Viral vectors encoding murine SOCS3 or murine JAK2^{T875N}, a constitutive active form of JAK2 (JAK2ca) were used to inhibit or activate the JAK2-STAT3 pathway in mouse astrocytes, respectively

([Ben Haim et al., 2015b](#); [Ceyzériat et al., 2018](#)). They were co-injected with a viral vector encoding GFP or TdTomato to visualize infected cells (same total viral load). Depending on the experiment, bilateral injections of the same virus were performed and controls were generated in different mice or the contralateral striatum was injected with the control virus encoding GFP and data were analyzed by paired tests.

The first 171 N-terminal amino acids of human Huntingtin (Htt) cDNA with 82 polyglutamine repeats were encoded by a viral vector that target either striatal neurons ([LVN-mHtt; de Almeida et al., 2002](#)) or astrocytes ([LVA-mHtt; Faideau et al., 2010](#)).

Last, we generated LV expressing full-length human Hsp40 (LVA-DNAJB1) or the dominant negative mutant corresponding to the J-domain of human Hsp40 [LVA-DNAJB1-DN, ([Michels et al., 1999](#))]. The initial cDNA was generated by Genart based on published sequences and inserted into a Gateway transfer plasmid. LR clonase was used to clone these cDNA into appropriate SIN expression plasmid containing a phosphoglycerate kinase 1 promoter, a Woodchuck Hepatitis Virus Posttranscriptional Regulatory Element (WPRE) and four MIRT124 target sequence downstream of the transgene cDNA.

Stereotactic injections.

WT mice were anesthetized with an *i.p.* injection of ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg). For Hdh140 mice, xylazine was replaced by medetomidine (0.25 mg/kg) and anesthesia was reversed by an *s.c.* injection of atipamezole (0.25 mg/kg) at the end of the surgical procedure. Lidocaine (7 mg/kg) was injected subcutaneously at the incision site, 10 min prior to surgery. Mice were given paracetamol in drinking water (1.6 mg/ml) for 48 h after surgery. Viral vectors were injected in the striatum (coordinates from Bregma: anteroposterior: + 1 mm, lateral: +/- 2 mm; ventral: - 2.5 mm from the dura). LV were diluted in PBS with 1% bovine serum albumin (BSA), at a total final concentration of 100 ng p24/ μ l. AAV were diluted in 0.1 M phosphate buffer saline (PBS) with 0.001% pluronic acid, at a final total concentration of $2.5 \cdot 10^9$ viral genome (VG)/ μ l. Viral suspensions (2-3 μ l depending on the cohort) were injected at a rate of 0.2 - 0.25 μ l/min.

Immunohistology.

Some mice were killed by an overdose of sodium pentobarbital (180 mg/kg) and perfused with 4% paraformaldehyde (PFA). Alternatively, mice were killed by cervical dislocation and one brain hemisphere was rapidly dissected and drop-fixed in 4% PFA. Brains were post-fixed for 24h in 4% PFA, cryoprotected in 30% sucrose solution and cut on a freezing microtome into 30 μ m-thick

coronal sections. Series of slices were stored at -20°C in an anti-freeze solution until used for immunostainings.

Immunofluorescence. Slices were rinsed in PBS for 3x10 min and were blocked in 4.5% normal goat serum (NGS), 0.2% Triton X-100 in PBS (PBST) for 1h at room temperature (RT). Slices were incubated overnight at 4°C with the following primary antibodies diluted in 3% NGS/PBST: anti-GFP biotinylated antibody (1:500, Goat; Vector Laboratories, Burlingame, CA, #BA-0702), anti-DARPP32-647 (1:1,000, Mouse; Santa Cruz Biotechnology, #sc-271111 AF647), anti-GFAP-Cy3 (1:1,000, Mouse; Sigma, #C9205), anti-Vimentin (1:1,000, Chicken; Abcam, Cambridge, UK, #ab24525), anti-IBA1 (1:500, Rabbit; Wako, Richmond, VA, #019-19741), anti-MBP (1:500, Rabbit; Sigma, #M3821), anti-Olig2 (1:500, Rabbit, Millipore, #Ab9610), anti-S100 β (1:500, Mouse; Sigma #S2532) and NeuroTrace 640/660 (1:250; ThermoFisher Scientific, #N21483). For Hsp40 staining (1:100, Rabbit; Enzo Life Sciences, ADI-SPA-400), slices were pretreated in 0.1 M Tris-HCl, pH 9 at 95°C for 30 min and NGS was replaced by 5% BSA in blocking solution and antibody diluent. For NeuN staining (1:500, Mouse; Chemicon, Billerica, MA, #MAB377), the mouse on mouse kit (MOM, Vector Laboratories) was used, according to the manufacturer's instructions to reduce non-specific background. For EM48 (1:200, Mouse; Merck, MAB5374), slices was blocked in 3% BSA, 2% NGS/PBST and incubated with primary antibody in the same solution for 36 h.

Slices were rinsed 3x10 min in PBS and incubated with appropriate secondary Alexa Fluor-conjugated antibodies (1:1000, Goat; Invitrogen, Carlsbad, CA) or for GFP with Streptavidine-FITC (1:1,000, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, #SA100-02) in 3% NGS/PBST for 1h at RT. Slices were rinsed three times with PBS before being mounted on SuperFrost® Plus slides (ThermoFisher Scientific) and coverslipped with Fluorsave™ (Calbiochem, Darmstadt, Germany). Double or triple immunofluorescent stainings were performed successively, with each antibody incubated alone.

Immunohistochemistry with Ubiquitin or EM48 antibodies. Brain slices were pretreated in 0.3% H₂O₂, blocked in 10% NGS/PBST (Ubiquitin) or 3% BSA/PBST (EM48) and incubated overnight at 4°C in the same diluent, with primary antibodies directed against Ubiquitin (1:1000, Rabbit; Dako, z0458) or EM48 (1:200). After rinsing, brain slices were incubated with biotinylated secondary antibodies (Vector Laboratories) for 1 h at RT. Finally, they were incubated with the Vectastain Elite ABC Kit (Vector Laboratories) and revealed with the VIP kit (Vector Laboratories). Slices were rinsed three times with PBS before being mounted on SuperFrost® Plus slides, dehydrated and coverslipped with Eukitt (Sigma).

Microscopy and immunostaining quantification.

GFAP immunoreactivity was quantified on 10X-tiled images acquired with an epifluorescence microscope (Leica, Nussloch, Germany). Virally transduced GFP⁺ area was manually segmented and the corresponding GFAP mean signal was measured with Image J. Background signal was measured on unstained areas and subtracted to the GFAP total signal.

The total number and surface of EM48⁺ and Ubiquitin⁺ aggregates was quantified on images scanned with an Axio scanZ.1 at the 40X objective under white light, with multi-plan focusing (Zeiss, Oberkochen, Germany). Aggregates were automatically detected by the Morphostrider software (ExploraNova), through intensity, size and shape thresholding, after manual segmentation of the striatum on each section. To quantify the density of EM48⁺ aggregates in the lentiviral models, stacked confocal images (16 z-steps of 1 μ m, maximum intensity stack) were acquired on a Leica TCS SP8 confocal fluorescent microscope with a 40x objective (3 slices per animal, 3 fields per slice). Aggregates were automatically detected with ImageJ software, through intensity, size and shape thresholding. Laser intensity, detector setting and analysis parameters were kept constant within each cohort. The number of aggregates in each cell type was manually counted on multiple immunofluorescent stainings with the cell counter plugin of ImageJ software.

To quantify lesion size, images of DARPP32 immunostainings were acquired at the 5X objective with an epifluorescence microscope (Leica). DARPP32⁻ area in striatum was manually segmented with Image J on each serial section. The total volume was calculated with the Cavalieri method.

Protein extraction.

Mice were killed by cervical dislocation and their brains were rapidly collected. The striatum was dissected out on ice, snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until protein extraction. Samples were homogenized by sonication in 20 volumes of lysis buffer [50 mM Tris-HCl pH = 8, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100 (Tx) with 1:100 phosphatase inhibitors (Sigma, cocktail 2) and 1X protease inhibitors (PI, Roche, Basel, Switzerland)] and centrifuged at 16,000 g for 30 min at 4°C. The supernatant contains Tx-soluble proteins and was used for western blotting. The Tx-insoluble pellet was washed with PBS and centrifuged at 16,000 g for 5 min at RT. The pellet was sonicated in a second lysis buffer [50 mM Tris-HCl pH = 8, 2% Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) with 1:100 phosphatase inhibitors and PI and centrifuged at 16,000 g for 30 min at 4°C. The supernatant was collected and used for western blotting.

Exosome isolation.

Mice were killed by cervical dislocation and their brains were rapidly collected. The striatum was dissected out on ice, snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until processing as described in ([Vella et al., 2017](#)). Two or 3 striata were pooled by sample. Frozen striata were incubated in 75 U/ml collagenase III in Hibernate E solution (Fisher Scientific, 800 µl/100mg) at 37°C under agitation. After 5 min, striatal pieces were gently pipetted up and down with a 1ml pipette, then with a large diameter fire-polished Pasteur pipette and returned to incubation for 10 min. Then, the tube was gently inverted and returned to incubation bath for 5 min (total incubation at 37°C = 20 min). Tubes were collected on ice and PI were added at 1X final concentration (Roche). To discard debris, samples were sequentially centrifuged at 4°C at 300 g for 5 min, 2 000 g for 10 min and 10 000 g for 30 min. The supernatant was collected and Hibernate E with PI was added to reach a final volume of 3ml. The first pellet was resuspended in 150µl of 50 mM Tris-HCl, 1% SDS, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.4 + PI, and sonicated to serve as a reference total homogenate. A sucrose step was prepared for each sample as 0.3 ml of 2.5 M sucrose, 0.4 ml of 1.3 M sucrose, 0.4 ml of 0.6 M and 3 ml of sample in Hibernate E. Steps were then centrifuged at 180,000g for 3h10 at 4°C in a SW60 swinging rotor (Beckman, Brea, CA). After removing the top 2.6 ml of the step, three 0.4 ml-fractions (F1 to F3) were collected. Each fraction was diluted in 0.9 ml of cold dPBS with PI and centrifuged at 100,000g for 1h at 4°C on a fixed TL110 rotor (Beckman). The pellet containing vesicles was resuspended in 10 µl of cold dPBS with PI and further diluted in loading buffer for western blotting or frozen until used for electron microscopy.

The purity of exosomal fractions 2 and 3 was controlled by immunoblotting for known exosomal proteins (Flotillin-1 and TSG101) and for a mitochondrial protein Voltage-Dependent Anion Channel (VDAC), which is absent from exosomes (**Supplemental Fig. 1c**).

These fractions were also analyzed by electron microscopy (EM) as described previously ([Kabani and Melki, 2015](#)). Exosomal fractions were mixed with an equal volume of 4% paraformaldehyde and incubated for 20 min at 4°C. Fixed vesicles were then applied to carbon coated EM grids and allowed to adsorb for 20 min at RT. EM grids were then washed by sequential transfers on drops of PBS, incubated for 5 min at RT in 1% glutaraldehyde, and then washed by sequential transfers on drops of distilled water. Following negative-staining with 1% Gadolinium triacetate (EM stain 336, Agar Scientific) for 10 min at RT, samples were imaged in a Jeol 1400 transmission electron microscope. Images were recorded with a Gatan Orius CCD camera (Gatan, Pleasanton, CA) and processed with the ImageJ software (NIH).

Western blot.

Protein concentration was measured by the BCA test (Pierce, Waltham, MA). Samples were diluted in loading buffer with DTT (NuPAGE[®] LDS sample buffer and sample reducing agent, Invitrogen). Ten µg of proteins was loaded on a 7,5% or 4-12% Criterion[™] TGX Stain-Free[™] Protein Gels (Bio-Rad). Protein concentration was not measured on exosomal fractions because it is below detection. Instead, an equal volume of each fraction was loaded. Migration was performed at 200 V for 45 min in Tris-glycine 10X buffer (Bio-Rad) and proteins were transferred on a nitrocellulose membrane with the Trans-Blot[®] Turbo[™] Transfer System (Bio-Rad). After 3 x 10 min rinses in Tris buffer saline and 0.1% Tween 20 (TBST), membranes were blocked in 5% milk in TBST for 1h at RT and incubated for 3h at RT, or overnight at 4°C with the following primary antibodies: anti-Actin (1:5,000, Mouse; Sigma, #A2066), anti-Flotillin-1 (1:1,000, Rabbit; Sigma, F1180), anti-Hsp40 (1:1,000, Rabbit; Enzo Life Sciences, ADI-SPA-400), anti-Htt (2B4, 1:1,000, Mouse; Millipore, MAB5492), anti-mHtt (1C2, 1:1,000, Mouse; Millipore, MAB1574), anti-Ubiquitin (1:1,000, Rabbit; Dako, z0458), anti-TSG101 (1:500, Rabbit; Sigma, HPA006161), anti-αTubulin (1:5,000, Mouse; Sigma, T5168), and anti-VDAC (1:1,000, Rabbit; Abcam, ab15895). After 3 x 10 min washes in TBST, membranes were incubated for 1 h at RT with HRP-conjugated secondary antibodies (1:5,000, Vector laboratories) diluted in TBST with 5% milk. Membranes were incubated with the Clarity Western ECL substrate (Bio-Rad) and the signal was detected with a Fusion FX7 camera (ThermoFisher Scientific). Band intensity was quantified with Image J and normalized to actin or α-tubulin. For quantification of exosome proteins, the Stain-free technology (Bio-Rad) was used. Stain-free gels were exposed to UV light to activate tryptophan residues on proteins, resulting in UV-induced fluorescence of total loaded proteins. UV exposition and chemiluminescence acquisition were done with ChemiDoc XRS+ system (Bio-Rad). Flotillin-1 and Hsp40 bands were normalized to total stained protein using Image Lab Version 5.2.1 software (Bio-Rad), according to instructions. Each protein of interest was assessed on at least 2 different membranes.

Cell sorting, quantification of cathepsin and proteasome activity.

Mice were perfused for 4 min with cold PBS. Their two striata were rapidly collected in Hank's Balanced Salt Solution (HBSS; Sigma). Cells were mechanically and enzymatically dissociated with fire-polished Pasteur pipettes and the neural tissue dissociation kit with papain (Miltenyi Biotec), following manufacturer's instructions. After filtration through a 50 µm-filter, myelin removal beads II and MS columns (Miltenyi Biotec) were used to deplete myelin from cell suspensions, as described by the manufacturer's protocol. Cells were then resuspended in 0.5% of PNB buffer (Perkin Elmer, FP1020) for 30 min and incubated in 1 µM of the iABP cathepsin probe (Vergent Bioscience, #40200) or in 200nM of the proteasome UbiQ probe (UbiQ Bio BV, UbiQ-018). Cells were centrifuged at 300 g

for 5 min at 4°C and resuspended in 400 µl HBSS. They were sorted on a BD Influx cell sorter. GFP was detected at 530/40 nm (488 nm excitation) and iABP was detected at 670/30 nm (646 nm excitation). TdTomato was detected at 579/34 nm (561 nm excitation) and UbiQ at 530/40 nm (488 nm excitation). Control samples of unlabeled or mono-fluorescent brain cells were used to set up detector gains and position sort gates, which were kept constant for all sorted samples. No compensation was required to accurately quantify iABP and GFP signals or UbiQ and TdTomato signals within the same sample. Cells were gated on a side scatter/ forward scatter plot, then singlets were selected and finally the percentage of GFP⁺/iABP⁺ or TdTomato⁺/UbiQ⁺ astrocytes was quantified in each mouse, after setting the gates on GFP⁺ or TdTomato⁺ astrocytes not incubated with a probe (i.e. FMO controls, **Supplemental Figure 1b**).

RNA extraction and RT-qPCR.

Mice were euthanized with an overdose of sodium pentobarbital, their brains were rapidly collected, the striatum or the GFP⁺ area was dissected out under a fluorescent microscope (Leica) and lysed in Trizol with a Precellys system (MagNa Lyser instrument, Roche). Samples were stored at -80°C until further processing. Samples were placed 5 min at RT and chloroform was added to Trizol for 3 min. Samples were centrifuged at 12,000 g for 15 min at RT. Aqueous phase was collected and 1 volume of 70% ethanol was added. Samples were transferred onto an RNeasyMin Elute spin column and RNA was purified according to manufacturer's instructions, with on-column DNase treatment (RNeasy micro kit, Qiagen, Hilden, Germany). RNA was eluted with 14 µl of RNase-free deionized water and stored at -80°C before transcriptomic analysis. RNA quality and integrity was evaluated with an Agilent RNA 6000 Pico assay and the Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent technologies, Santa Clara, CA). Reverse transcription was performed with the VILO™ kit according to the manufacturer's protocol (SuperScript® VILO™ cDNA synthesis kit; Life Technologies, Carlsbad, CA). Samples were diluted in H₂O with 100 µg/ml BSA at 0.2 ng/µl and mixed with 250 nM of primers and iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-rad) for qPCR. PCR efficiency was between 85 and 110% for each set of primers (sequences shown in **Supplementary table 3**). Nuclease-free water and samples without reverse transcription were used as negative controls. Expression levels of transcripts of interest were normalized with the ΔCt method to the abundance of the best combination of normalizers among *Actin*, *Erp29*, *Ppia* *Rpl13a*, as identified with the Genorm method, implemented in Bio-rad CFX Manager software.

Microarray analysis on acutely sorted GFP and JAK2ca astrocytes.

Mice were killed and their striatum rapidly collected in Hank's Balanced Salt Solution (HBSS; Sigma). Two striata of four mice were pooled before processing. Astrocytes were isolated and their RNA extracted as described in the previous paragraphs, except that no staining or myelin removal was performed. Typically, 3,000 to 20,000 GFP⁺ astrocytes and 50,000 to 100,000 GFP⁻ cells were collected for each sample within 15-25 min.

A total of 10 sorted cell samples were processed for microarray analysis (4 GFP⁺ astrocytes of the control WT-GFP group, 4 GFP⁺ astrocytes of the WT-JAK2ca group and 2 GFP⁻ cells from the WT-GFP group to assess sorting efficiency). RNA quality and integrity was evaluated with an Agilent RNA 6000 Pico assay and the Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent technologies, Santa Clara, CA). RNA was amplified with the Ovation PicoSL VTA system V2 kit (NuGen technologies, San Carlos, CA). Single strand DNA and SPIA cDNA were purified with Agencourt RNAClean XP (NuGen technologies). cDNA concentration was measured with a Nanodrop-1000 spectrophotometer (Labtech France). The Encore biotinL kit (NuGen technologies) was used for the fragmentation and labeling of the purified SPIA cDNA prior to hybridization on the Illumina BeadChip mouse WG-6v2, which contains more than 45,000 unique 50-mer oligonucleotides (Illumina, San Diego, CA). BeadChips were scanned on the Illumina iScan. A control summary report was generated by the GenomeStudio software (Illumina) to evaluate the performance of built-in controls (variation in hybridization and background signals and background/noise ratio). Quantile normalization without background subtraction was applied to all samples within an analysis, with GenomeStudio software. First, to validate sorting efficiency, we compared the 4 GFP⁺ astrocyte samples with the 2 GFP⁻ other cell samples from the WT-GFP group. Hierarchical clustering was performed with GenomeStudio with the list of 1415 differentially expressed probes (t test, $p < 0.05$ and Fold change > 1.5) using Euclidian distance. Then, we compared the 4 GFP⁺ astrocyte samples from WT-GFP mice with the 4 GFP⁺ astrocyte samples from the WT-JAK2ca mice to identify transcriptional changes in reactive astrocytes. To study only genes with reliable expression levels, we included probes with a signal p value above 0.01 in more than 50% of the samples. In that case sample with a signal p value below 0.01 were arbitrarily given a signal value of 75 (the lowest value obtained on the microarray being 76.5). The levels of expression of the detectable probes were compared between WT-GFP and WT-JAK2ca astrocytes with the limma package. Analysis for enriched Gene ontology (GO) terms were performed with Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) Functional annotation Tool [v6.8, performed in July 2018 ([Huang da et al., 2009](#))]. All differentially expressed genes were also analyzed by the Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins (STRING) to identify functional

network of regulated genes (v10.5, <https://string-db.org/>, **Supplemental Fig. 4**). STRING was also used to represent the networks of differentially expressed genes involved in proteostasis (**Fig. 3d**). Microarray datasets are deposited on GEO under reference GSE107486.

Statistics.

Results are expressed as mean \pm SEM. No statistical method was used to predetermine sample size. Sample size was chosen based on prior experience for each experiment, to yield adequate power to detect specific effects. Statistical analysis was performed with Statistica software (StatSoft, Tulsa, OK) and graphs were prepared with GraphPad Prism 7 (La Jolla, CA). We used paired or unpaired two-tailed Student *t* test to compare two groups. For each analysis, normality of residues and homoscedasticity were assessed. If any condition of application was not fulfilled, we used non-parametric tests. Two groups were compared by the Mann-Whitney or Wilcoxon paired test and four independent groups were compared by a Kruskal-Wallis test followed by post-hoc comparison of mean ranks. Chi2 test was used to compare aggregate distribution. Investigators were partially blinded to the group when performing experiments and measuring outcomes (as the group can be guessed based on the presence of aggregates or GFP levels for example). The significance level was set at $p < 0.05$. Figure legends are encoded as follows * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

RESULTS

Reactive astrocytes reduce neuronal mHtt aggregation in two HD mouse models

To modulate astrocyte reactivity in mouse models of HD, we used our recently developed viral tools that target the JAK2-STAT3 pathway within astrocytes (Ceyzériat *et al.*, 2018). We first expressed the pathway inhibitor SOCS3 to block astrocyte reactivity in a lentiviral based model of HD that reproduces the strong astrocyte reactivity observed in HD patients (Faideau *et al.*, 2010; Ben Haim *et al.*, 2015b). This model is based on the neuronal expression of the 171 first amino acids of Htt with 82 CAG repeats (de Almeida *et al.*, 2002). WT mice received bilateral LV injections in the striatum and were analyzed 6 weeks later. The control left side was injected with a LV encoding mHtt and targeting neurons (LV_N-mHtt) and a LV encoding GFP and targeting astrocytes (LV_A-GFP). The right side was injected with LV_N-mHtt, a LV encoding SOCS3 and targeting astrocytes (LV_A-SOCS3) and LV_A-GFP to visualize infected astrocytes (Fig. 1a).

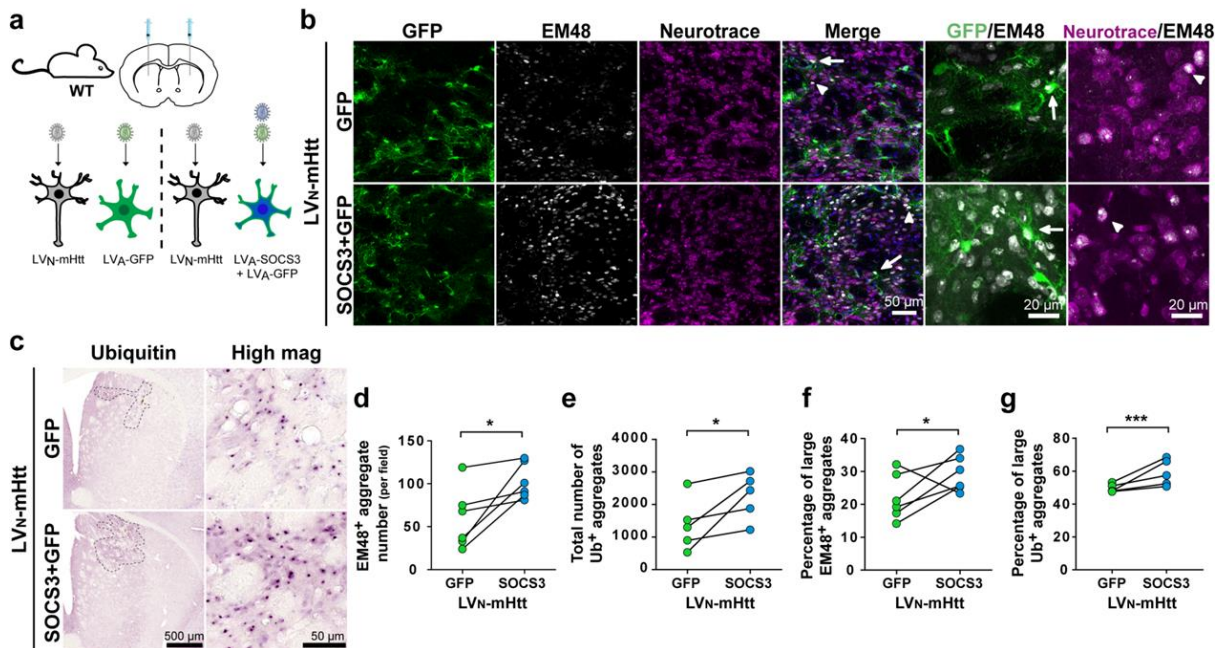


Figure 1. Blocking astrocyte reactivity increases the number and size of mHtt aggregates

a. Two month-old WT mice were injected in one striatum with LV_N-mHtt and LV_A-GFP and the contralateral striatum with LV_N-mHtt, LV_A-SOCS3 and LV_A-GFP, at the same total virus load and analyzed 6 weeks later. **b.** Confocal images of striatal sections stained for GFP (green), EM48 (white), neurotrace (magenta) and DAPI (blue). Large EM48⁺ aggregates of mHtt are mostly found in neurons stained for neurotrace, they fill their entire nucleus (arrowhead). Only few GFP⁺ astrocytes contain an EM48⁺ aggregate (arrow). **c.** Immunolabeling for ubiquitin (Ub) shows that the number of Ub⁺ aggregates in the striatum is also increased by SOCS3. The area with Ub⁺ aggregates is delimited with black dots. **d, e.** The number of EM48⁺ aggregates (**d**) and Ub⁺ inclusions (**e**) are significantly increased by SOCS3. **f, g.** There is a higher fraction of large nuclear EM48⁺ aggregates (> 40 μm², **f**) and nuclear Ub⁺ inclusions (> 2 μm², **g**) in the striatum injected with LV_A-SOCS3 than LV_A-GFP. **d, e.** Paired *t*-test. **f, g.** Chi2 test. N = 5-6/group.

In accordance with our previous study ([Ben Haim et al., 2015b](#)), we found that astrocyte reactivity was efficiently inhibited by SOCS3 (**Supplementary Fig. 2**) and that the number of neuronal aggregates of mHtt labelled with the EM48 antibody was increased (**Fig. 1b, c**). Only a small fraction of mHtt aggregates were found in GFP⁺ astrocytes (~2%, **Fig. 1b**), and this percentage was not changed by SOCS3 ($p = 0.6877$, Chi2 test, data not shown). mHtt aggregates may be ubiquitinated, and the number of Ubiquitin (Ub)⁺ aggregates was also increased by SOCS3 (**Fig. 1d, e**). In addition, we found a higher fraction of large EM48⁺ (**Fig. 1f**) and Ub⁺ (**Fig. 1g**) aggregates in the SOCS3 group than the GFP group, revealing both quantitative and qualitative changes in neuronal aggregates with inhibition of astrocyte reactivity.

To further demonstrate that reactive astrocytes decrease mHtt aggregation, we used a complementary model of HD, the knock-in Hdh140 mice ([Menalled et al., 2003](#)) that develop a slow form of HD, with small intraneuronal aggregates, progressive transcriptional defects but nearly undetectable astrocyte reactivity ([Hickey et al., 2008](#)). In this model, astrocyte reactivity was induced by viral gene transfer of a constitutively active form of JAK2 (LV_A-JAK2ca) in striatal astrocytes of 7-9 month-old Hdh140 mice (Hdh140-JAK2ca mice). LV_A-GFP was co-injected to visualize infected astrocytes (**Fig. 2a**). Control Hdh140 mice were injected with LV_A-GFP at the same total viral titer (Hdh140-GFP mice). All mice were analyzed 4 months later (**Fig. 2a**). GFAP/GFP immunostaining on brain sections from these mice showed that JAK2ca induced GFAP expression (**Fig. 2b, c**) and hypertrophy of GFP⁺ soma in striatal astrocytes (**Fig. 2b, d**), which are two features of astrocyte reactivity. JAK2ca also recapitulated the characteristic transcriptional changes of reactivity by increasing mRNA levels of *Vimentin* and *Serpina3n*, two others markers of reactivity (**Fig. 2e**). Importantly, JAK2ca-mediated astrocyte reactivity in Hdh140 mice reduced the number of mHtt aggregates (**Fig. 2f, g**). The fraction of large EM48⁺ aggregates was also significantly lower in the JAK2ca group than in the GFP group (**Fig. 2h**). Again, these small aggregates were mostly found in neurons (**Fig 2i**). Less than 1% of all mHtt aggregates were found in GFP⁺ astrocytes, and it was not significantly impacted by JAK2ca ($p = 0.9322$, Chi2 test, data not shown).

To determine whether soluble mHtt was also reduced by JAK2ca, we analyzed Triton X-100 (Tx) soluble protein extracts from the striatum of WT and Hdh140 mice injected with LV_A-GFP or LV_A-JAK2ca. Western blotting with the 1C2 antibody that recognizes preferentially the elongated poly-glutamine stretch of mHtt ([Trottier et al., 1995](#)) showed similar striatal mHtt levels in both groups (**Fig. 2j, k**). In the Tx-insoluble, SDS-soluble fraction, high molecular weight forms of mHtt were detected in Hdh140 samples with the 2B4 antibody, which recognizes the N-terminal part of mHtt ([Lunkes et al., 2002](#)). High molecular weight 2B4 immunoreactivity tended to be reduced by JAK2ca but with some variability between samples, in accordance with histological data of reduced mHtt aggregation with JAK2ca (data not shown). Finally, we controlled by qPCR that mRNA levels for

endogenous murine Htt and mHtt were not impacted by JAK2ca ($p = 0.105$ and $p = 0.580$ respectively, Student t -test, data not shown).

Overall, our data show that reactive astrocytes reduce the number and size of mHtt aggregates in neurons, without changing Htt transcription or soluble protein levels.

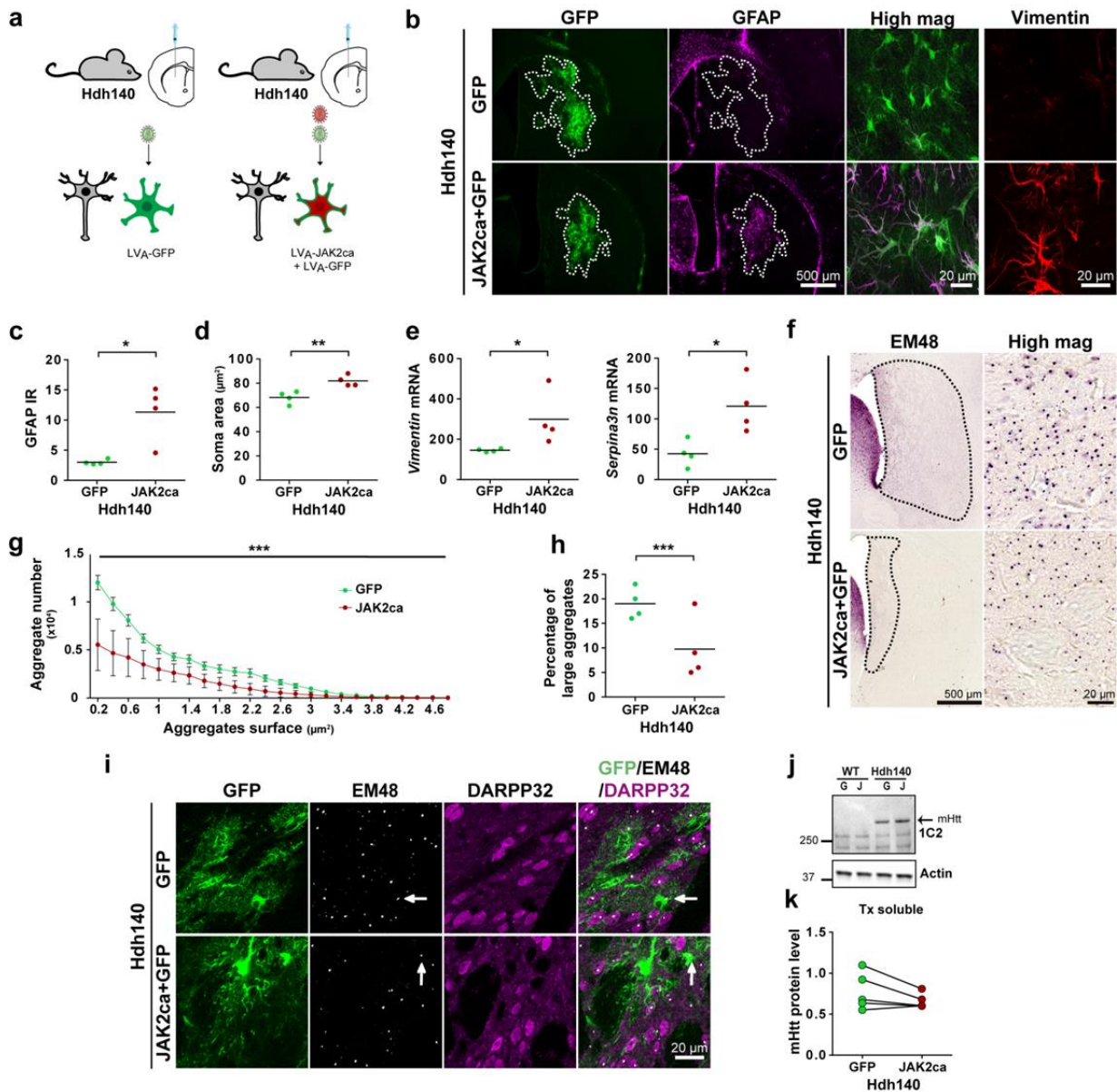


Figure 2. JAK2ca induces astrocyte reactivity in Hdh140 mice and reduces mHtt aggregation

a. 7-9 month-old Hdh140 mice were injected in the striatum with LV_A-GFP or LV_A-JAK2ca + LV_A-GFP, at the same total virus load, and analyzed 4 months later. **b.** Low magnification images showing the GFP⁺ transduced area (outlined, green) and GFAP staining (magenta) in the striatum of Hdh140-GFP and Hdh140-JAK2ca mice. High magnification images of astrocytes stained for GFP, GFAP and vimentin (red) show that JAK2ca increases GFAP and vimentin immunoreactivity and induces morphological changes in astrocytes, the two classical features of reactivity. **c, d.** Quantification of GFAP⁺ immunoreactivity (IR) (**c**) and soma area of GFP⁺ astrocytes (**d**) from images in (**b**). Both are significantly increased by JAK2ca. **e.** JAK2ca increases mRNA levels of *Vimentin* and *Serpina3n*, as assessed by RT-qPCR. **f.** Bright field images of EM48⁺ aggregates in the striatum of Hdh140-GFP and Hdh140-JAK2ca mice. The striatal region displaying EM48⁺ aggregates in the striatum is outlined on low magnification images. **g.** Analysis of the number of mHtt aggregates in relation to their surface. JAK2ca globally

decreases the number of mHtt aggregates, impacting all size categories. **h**. The percentage of large aggregates ($> 2 \mu\text{m}^2$) is lower in Hdh140-JAK2ca mice than in Hdh140-GFP mice. **i**. EM48⁺ aggregates (white) are mostly found in neurons labelled in magenta with DARPP32 (arrowhead) and very rarely in GFP⁺ astrocytes (green; arrow). **j, k**. Western blotting on the Tx-soluble fraction (**j**) and quantification (**k**) of mHtt detected by the 1C2 antibody only in Hdh140 mice injected with LV_A-GFP (G) or LV_A-JAK2ca (J), but not WT mice. Band intensities were normalized to actin. **l, m**. Western blotting on the SDS-soluble fraction (**l**) and quantification (**m**) of high molecular weight species (HMW) of mHtt detected by the 2B4 antibody in Hdh140 mice only. JAK2ca decreases the levels of insoluble HMW mHtt species. Band intensities were normalized to actin. **c, d**. Student *t*-test; N = 4/group. **e**. Mann-Whitney test. **g, h**. Chi2 test. N = 4/group. **k, m**. paired *t*-test. N = 5/group.

Reactive astrocytes improve some HD pathological outcomes

The overall effect of mHtt aggregates in HD is discussed ([Arrasate and Finkbeiner, 2012](#); [Soares et al., 2019](#)). We thus evaluated how inhibition of mHtt aggregation by reactive astrocytes impacted neuronal defects characteristic of HD. In the lentiviral model of HD, mHtt causes local neuronal death visible as a loss of the striatal neuronal marker DARPP32 (**Fig. 3a**). The size of the neuronal lesion was significantly increased by SOCS3 (**Fig 3b**). Likewise, SOCS3 reduced mRNA levels of *Ppp1r1b* (DARPP32) and *Drd2* (dopamine D2 receptor), two transcripts known to be decreased in HD patients and models (**Fig. 3c**). These results show that reactive astrocytes have a net positive effect on neuronal survival in this model. Hdh140 mice do not reproduce striatal neuron degeneration but display early transcriptional defects, as observed in HD patients. Induction of astrocyte reactivity by JAK2ca in Hdh140 mice significantly increased *Ppp1r1b* mRNA levels (**Fig. 3d**). These results show that reduction of mHtt aggregation by reactive astrocytes is associated with beneficial effects on striatal neurons.

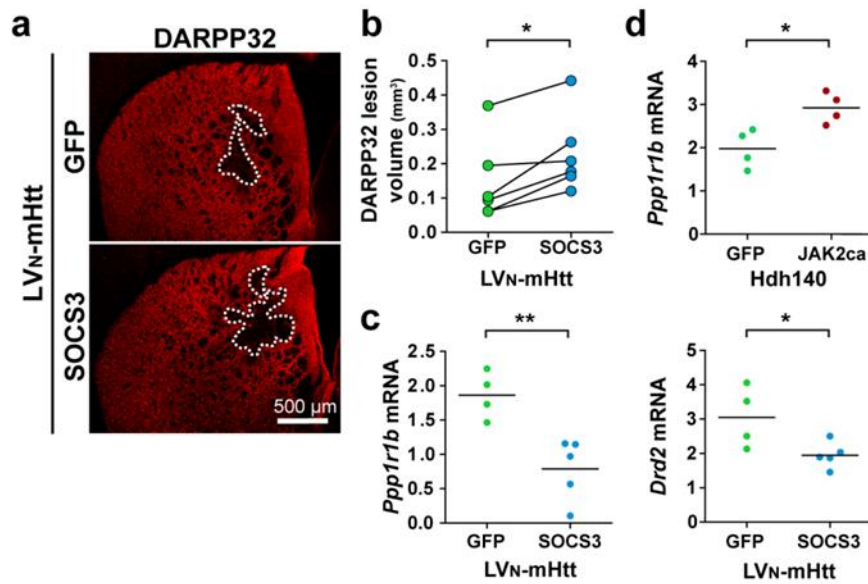


Figure 3. Astrocyte reactivity improves several neuronal alterations caused by HD

a. WT mice were injected as in Fig. 1a. Images of striatal sections stained for DARPP32 (red) evidencing striatal lesion caused by mHtt expression (dotted lines). **b.** Striatal DARPP32 lesions are larger in the SOCS3 group. **c.** SOCS3 decreases mRNA level of the neuronal transcripts *Ppp1r1b* (*Darpp32*) and *Drd2* (Dopamine D2 receptor), as assessed by RT-qPCR on total striatal mRNA, suggesting that reactive astrocytes have protective effects in this model. **d.** Hdh140 mice were injected as in Fig. 2a and total striatal mRNA levels for neuronal markers were analyzed by RT-qPCR. *Ppp1r1b* mRNA levels are higher in Hdh140-JAK2ca mice than in Hdh140-GFP mice. **b.** Wilcoxon paired test. N = 6/group. **c, d.** Mann-Whitney test. N = 4-5/group.

JAK2ca regulates the expression of proteolytic genes in astrocytes

What molecular changes could take place in reactive astrocytes to explain such trans-cellular reduction of mHtt aggregation? We took advantage of JAK2ca ability to induce astrocyte reactivity in WT mice (**Supplementary Fig. 3**) to identify the transcriptional changes induced by reactivity in astrocytes, independently of a specific HD context. We analyzed the transcriptomic profile of acutely sorted reactive astrocytes prepared from the striatum of WT-JAK2ca mice and compared it to control astrocytes from WT-GFP mice (**Fig. 4a**). Astrocytes were collected by fluorescence-activated cell sorting (FACS) based on their GFP expression. GFP⁻ cells, comprising microglia, neurons, oligodendrocyte precursor cells (OPC), oligodendrocytes and non-infected astrocytes, were collected together. Hierarchical clustering evidenced a clear segregation between GFP⁺ and GFP⁻ cell samples in control WT-GFP mice (**Fig. 4b**). There were 1415 differentially expressed transcripts between GFP⁺ astrocytes and other cells (fold change > 1.5 and $p < 0.05$), including characteristic cell-type specific markers (e.g. *Aldh1l1*, *Slc1a2*, *Gjb6*, for astrocytes; *P2ry12*, *Gpr88*, *Pdgfra*, *Mbp* for other cell types). After validation of the sorting procedure, we compared the expression profile of GFP⁺ astrocytes between WT-GFP and WT-JAK2ca mice.

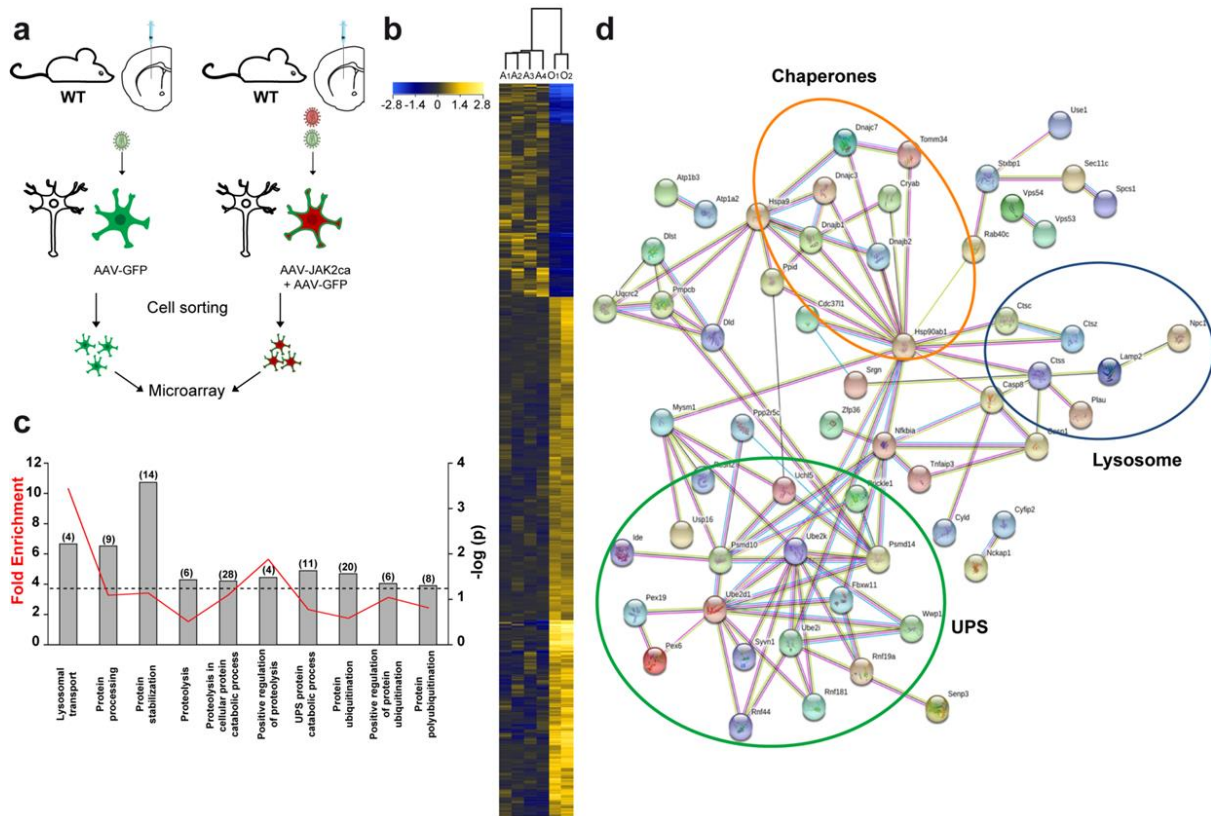


Figure 4. JAK2ca regulates the expression of genes linked to proteostasis in WT astrocytes

a. Two month-old WT mice were injected in the striatum with AAV-GFP or AAV-JAK2ca + AAV-GFP (N = 4/group), at the same total virus load. After 2 months, GFP⁺ striatal astrocytes were acutely sorted and their transcriptome analyzed by microarray. **b.** Validation of astrocyte isolation. Hierarchical clustering based on the 1415 differentially expressed genes in WT-GFP mice, between GFP⁺ astrocytes (samples A1-A4) and all other GFP⁻ cells (samples O1-O2), which comprise microglial cells, neurons, oligodendrocyte precursor cells, oligodendrocytes and non-infected astrocytes. Color scale represents mean-centered expression (log₂-transformed). **c.** Gene ontology analysis on the list of JAK2ca-regulated genes in GFP⁺ astrocytes reveals a significant enrichment in several biological processes linked to autophagy/lysosome, UPS or other proteostasis processes. The fold enrichment for each biological process is indicated by the red line and the *p* value is indicated by bars (log transformed). The dotted line represents *p* = 0.05. The number of genes involved in each biological process is indicated in parenthesis. **d.** STRING visualization of the genes belonging to proteostasis pathways. Genes related to autophagy-lysosome are circled in blue, to the UPS in green and to chaperones in orange.

We found 888 probes (802 unique genes) differentially expressed between JAK2ca-astrocytes and control GFP-astrocytes (**Supplementary Fig. 4**). A gene ontology (GO) analysis revealed a significant enrichment in 136 GO-biological processes (*p* < 0.05). Among them, many GO terms linked to immunity/inflammation were found, confirming JAK2ca effect on the reactive status of astrocytes (**Supplementary Fig. 4**). We also identified a specific enrichment in biological processes linked to lysosomes, ubiquitin-proteasome system (UPS), as well as other proteostasis processes (**Fig. 4c**, **Supplementary Fig. 4**). KEGG pathway analysis also revealed a 3-fold enrichment in the term “lysosome” in JAK2ca-reactive astrocytes (*p* = 6.3 10⁻⁴). Among the genes regulated by the JAK2-

STAT3 pathway, several lysosomal enzymes like Cathepsins (*CtsC*, *s* and *z*), *Lyz* or *Sgsh* were induced while several E2-ubiquitin ligases (*Ube2_{xx}*) were down-regulated in astrocytes by JAK2ca. These genes linked to proteostasis formed a dense network of co-regulated genes as evidenced by STRING analysis (**Fig. 4d**).

Overall, this transcriptomic analysis of JAK2ca reactive astrocytes show that reactivity involves significant changes in expression of proteostatic genes.

JAK2ca increases proteolytic capacity in reactive astrocytes in HD

We confirmed by RT-qPCR that JAK2ca induces the expression of *Cts* in an HD context as well. *Ctsc* mRNA levels were significantly higher in Hdh140-JAK2ca mice than Hdh140-GFP mice, and *Ctss* mRNA showed the same tendency (**Fig. 5a**). Interestingly, SOCS3 had the opposite effects and decreased mRNA levels of *Ctsc* and *Ctss* in the lentiviral model of HD (**Fig. 5b**). However such bulk analysis may mask or dilute changes occurring only in reactive astrocytes because *Cts* are highly expressed in microglial cells.

To measure total *Cts* activity in astrocytes specifically, we exposed acutely dissociated striatal cells from Hdh140-GFP and Hdh140-JAK2ca mice, to a pan-cathepsin fluorescent probe ([Withana et al., 2016](#)) and analyzed probe fluorescence in GFP⁺ astrocytes by FACS. There was a significantly larger fraction of GFP⁺ astrocytes with high *Cts* activity in Hdh140-JAK2ca mice (**Fig. 5c**), confirming that reactivity stimulates lysosomal activity in astrocytes.

We used another fluorescent probe to measure proteasome activity in acutely dissociated astrocytes ([Berkers et al., 2007](#)). As the excitation/emission spectrum of this probe overlaps with GFP, we used a viral vector encoding TdTomato instead of GFP to detect red astrocytes in both groups. Again, the fraction of TdTomato⁺ astrocytes with high proteasome activity was larger in Hdh140-JAK2ca mice than in Hdh140-Tomato mice (**Fig. 5d**), showing that reactivity stimulates proteasome activity in astrocytes. Furthermore, as several ubiquitin ligases were differentially expressed in JAK2ca-reactive astrocytes (**Fig. 4d**), we also assessed how striatal ubiquitination was impacted by astrocyte reactivity by western blotting with an Ub antibody. We did not find any obvious change in the Ub pattern or in total Ub levels between Hdh140-GFP and Hdh140-JAK2ca mice, in both Tx and SDS fractions (**Fig. 5e-h**).

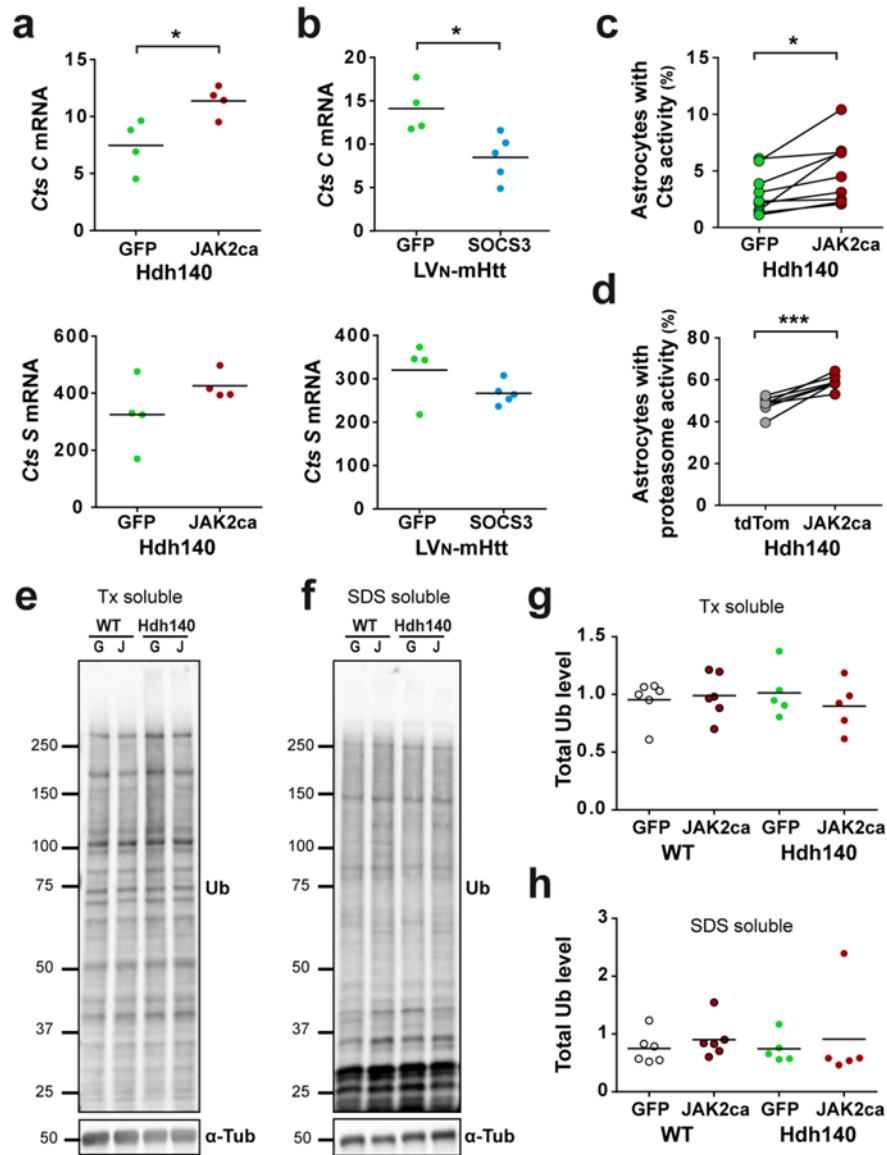


Figure 5. Reactive astrocytes have higher lysosomal and proteosomal activities

a. Hdh140 mice were injected as in **Fig. 2a**. *Ctsc* mRNA levels are significantly higher in the striatum of Hdh140-JAK2ca mice than Hdh140-GFP mice. *Ctss* mRNA levels also tend to be increased by JAK2ca. **b.** WT mice were injected as in **Fig. 1a**. Conversely, SOCS3 significantly decreases *Ctsc* mRNA levels and tends to decrease *Ctss* mRNA levels in LVN-mHtt mice. **c, d.** The striatum of Hdh140 mice was collected, cells dissociated and incubated with a quenched fluorescent pan-cathepsin activity probe (**c**) or a proteasome activity probe (**d**). Probe fluorescence was quantified in GFP⁺ (**c**) or TdTomato⁺ (**d**) astrocytes. Hdh140-JAK2ca mice display a higher percentage of iQBP⁺/GFP⁺ (**c**) and UbiQ⁺/TdTomato⁺ (**d**) astrocytes. **e-h.** WT and Hdh140 mice were injected with LV_A-GFP or LV_A-JAK2ca + LV_A-GFP. Total Ub levels in the Tx-soluble (**e, g**) and SDS-soluble (**f, h**) fractions were quantified from western blots. Total Ub levels are similar in the four groups. Band intensities were normalized to α -tubulin. **a, b.** Student *t*-test. N = 4-5/group. **c, d.** Paired *t*-test. **c:** N = 9/group. **d:** N = 7/group. **g, h.** ANOVA. N = 5-6/group.

As an alternative assessment of the intrinsic proteolytic activity of astrocytes, we used lentiviral vectors to force mHtt expression in astrocytes (LV_A-mHtt vector), because only a small minority of aggregates naturally forms in astrocytes in our models. WT mice were injected in the left striatum with LV_A-mHtt and LV_A-GFP, and in the right striatum with LV_A-mHtt, LV_A-SOCS3, and LV_A-GFP (**Fig. 6a**). Expression of mHtt in astrocytes causes reactivity ([Faideau et al., 2010](#)), and it was efficiently blocked by LV_A-SOCS3. Astrocytes in the SOCS3 group expressed lower levels of GFAP (**Fig. 6b, c**) and had a smaller soma than control astrocytes (**Fig. 6d**). In this model of forced mHtt expression, mHtt forms nuclear aggregates (which are smaller than their counterparts in the LV_N model) and small cytoplasmic inclusions in astrocytes (**Fig. 6e**). If reactivity increases proteolytic activity in astrocytes, we predict that mHtt aggregation within astrocytes themselves should also be reduced when they are reactive (or conversely, that mHtt aggregation in astrocytes should increase when reactivity is blocked by SOCS3). Indeed, we found that the percentage of astrocytes bearing a mHtt aggregate was significantly higher in SOCS3-astrocytes than in control GFP-astrocytes (**Fig. 6e, f**). In addition, the fraction of large mHtt aggregates was significantly increased by SOCS3 (**Fig. 6e, g**). These results suggest that reactive astrocytes acquire a higher intrinsic clearance capacity that reduces the number and size of mHtt aggregates. As neurons can release mHtt and transfer it to neighboring cells including glial cells ([Pecho-Vrieseling et al., 2014](#); [Pearce et al., 2015](#)), it is possible that astrocytes siphon mHtt away from neurons more efficiently when they are reactive, thereby reducing mHtt aggregation in neurons.

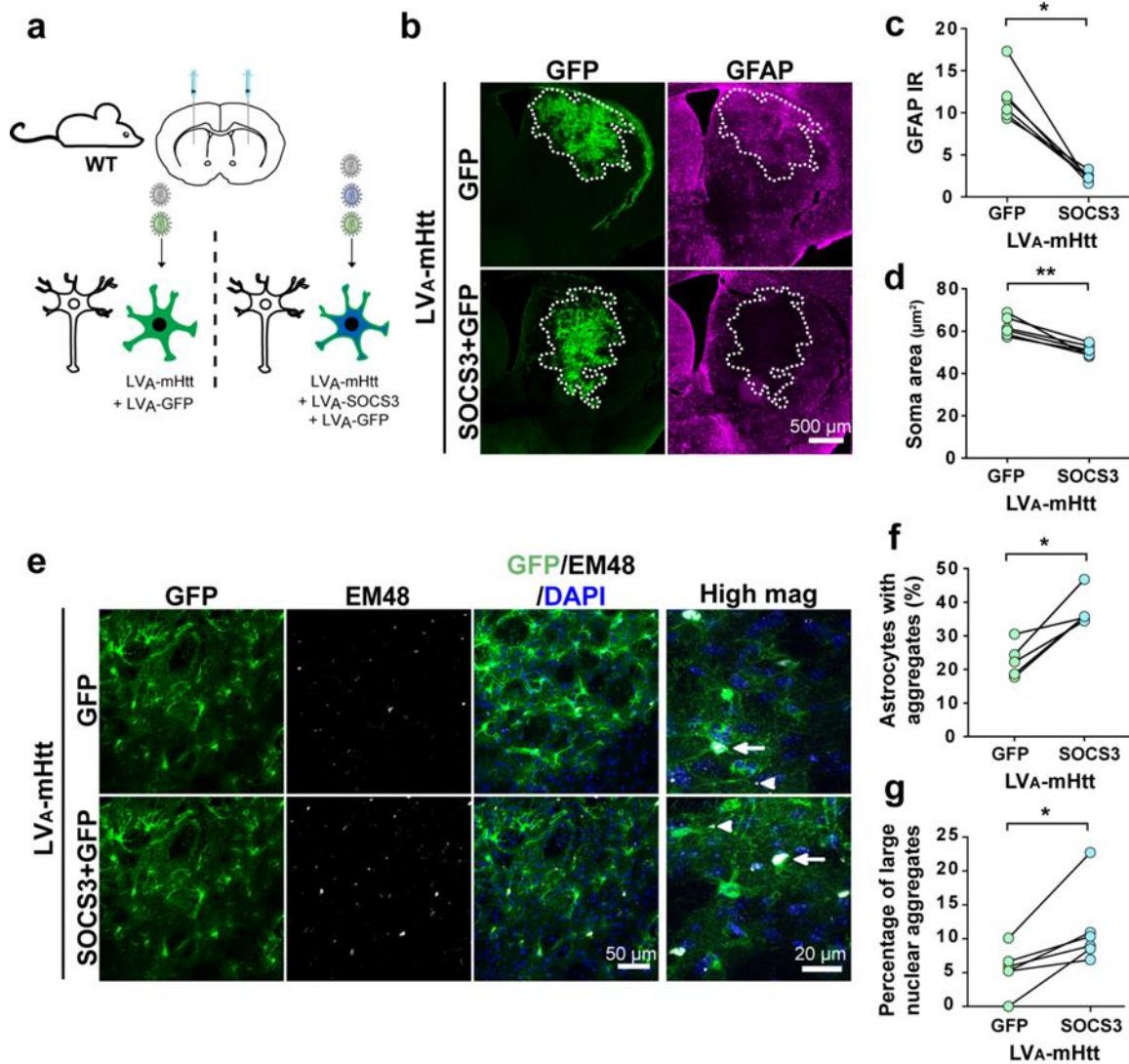


Figure 6. Reactive astrocytes have a higher intrinsic proteolytic capacity

a. Two month-old WT mice were injected in one striatum with LVA-mHtt and LVA-GFP and the contralateral striatum with LVA-mHtt, LVA-SOCS3 and LVA-GFP (same total viral titer) to force mHtt expression in astrocytes. They were analyzed 6 weeks later. **b.** Low magnification images showing GFP⁺ transduced area (outlined, green) and GFAP staining (magenta) in the striatum. **c, d.** Quantification of GFAP IR (**c**) and astrocyte soma (**d**) area. Both are significantly decreased by SOCS3, demonstrating efficient inhibition of reactivity. **e.** Confocal images of striatal sections stained for GFP (green), EM48 (white) and DAPI (blue). Large EM48⁺ aggregates form mainly in astrocyte nucleus (arrow), while small aggregates are also found in astrocyte processes (arrowhead). **f, g.** Quantification of images in (**e**). The fraction of GFP⁺ astrocytes displaying an EM48⁺ aggregate (**f**) and of large aggregates is significantly increased by SOCS3. **c, d.** Wilcoxon paired test. **f, g.** Chi2 test. N = 6/group.

Reactive astrocytes express higher levels of chaperone proteins

Interestingly, several GO-molecular functions linked to chaperone and protein folding were significantly regulated by JAK2ca in sorted astrocytes (GO-molecular functions: “Chaperone binding”, “Heat shock protein binding”, “Unfolded protein binding”; fold enrichment > 3; $p < 0.01$, **Fig. 7a**). Indeed, several chaperones were induced by JAK2ca in astrocytes (e.g. *Hspb1*, *Dnajb1*, *Hspa9*, **Fig. 4d**).

Chaperones are known to prevent protein aggregation, including that of mHtt ([Hartl et al., 2011](#); [Koyuncu et al., 2017](#)) and can be released extracellularly in exosomes ([De Maio and Vazquez, 2013](#); [Takeuchi et al., 2015](#)). Strikingly, the GO-cellular compartment term “Extracellular exosome” was the 2nd most significantly regulated by JAK2ca in astrocytes (fold enrichment = 1.9; $p = 3.77 \cdot 10^{-15}$; data not shown).

We focused on the co-chaperone DNAJB1/Hsp40, because it is one of genes most induced by JAK2ca (nearly 3-fold) and it is also down-regulated by SOCS3 in a different disease situation ([Ceyzériat et al., 2018](#)), suggesting that this co-chaperone is strongly regulated by the JAK2-STAT3 pathway in reactive astrocytes. *Dnajb1* mRNA levels were significantly reduced by SOCS3 in the lentiviral model of HD (**Fig. 7b**). Western blot analysis showed that JAK2ca also significantly increased DNAJB1/Hsp40 at the protein level in Hdh140 mice (**Fig. 7c**). Interestingly, in the striatum of Hdh140 mice, DNAJB1/Hsp40 displayed a diffuse cytosolic staining mainly in neurons but also formed small nuclear inclusions, suggesting a possible interaction with aggregated mHtt (**Fig. 7d**).

We next studied whether DNAJB1/Hsp40 was found in extracellular exosomes and whether DNAJB1/Hsp40 exosomal content was impacted by induction of reactivity with JAK2ca in Hdh140 mice. Exosomal vesicles were isolated by biochemical fractionation from the striatum of Hdh140-GFP and Hdh140-JAK2ca mice, and they contained DNAJB1/Hsp40 (**Supplemental Fig. 1c**). DNAJB1/Hsp40 normalized levels tended to be higher in exosomes of Hdh140-JAK2ca mice than in Hdh140-GFP control mice, suggesting that JAK2ca stimulates the release of exosomes loaded with a higher quantity of the co-chaperone DNAJB1/Hsp40 (**Fig. 7e**).

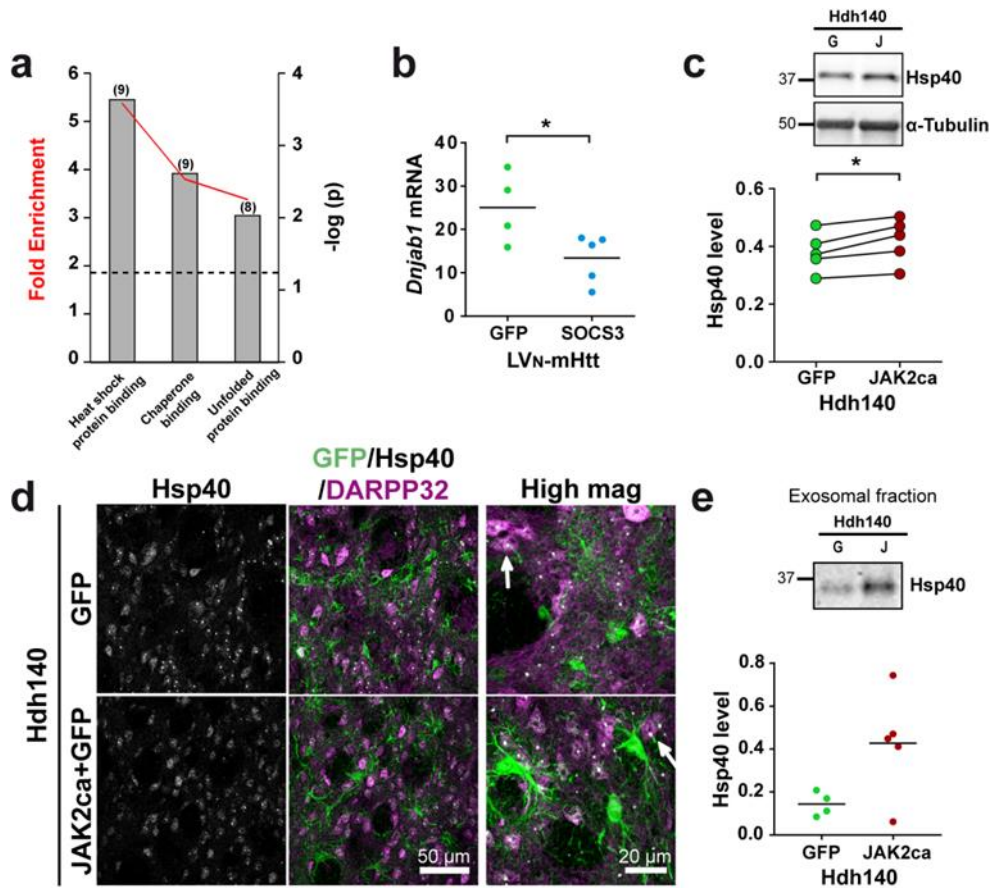


Figure 7. Reactive astrocytes overexpress chaperone proteins

a. GO analysis on the list of JAK2ca-regulated genes (microarray analysis, **Fig. 4a**) reveals a significant enrichment in several molecular functions linked to chaperones. Fold enrichment for each molecular function (red line), p value (bars, log transformed) and number of genes involved in each biological process (parenthesis) are indicated. The dotted line represents $p = 0.05$. **b.** *Dnajb1* mRNA levels are significantly decreased by SOCS3 in LV_N-mHtt mice. **c.** Western blotting for DNAJB1/Hsp40 in Hdh140-GFP and Hdh140-JAK2ca mice. JAK2ca increases DNAJB1/Hsp40 protein levels in Hdh140 mice. Band intensities were normalized to α -tubulin. **d.** Confocal images of striatal sections stained for GFP (green), DNAJB1/Hsp40 (white) and DARPP32 (magenta). DNAJB1/Hsp40 displays a diffuse cytosolic staining and forms small nuclear inclusions in neurons (arrow). **e.** DNAJB1/Hsp40 is present in extracellular exosomes isolated from Hdh140 striata, and tends to be in higher amount in exosomes of Hdh140-JAK2ca mice than Hdh140-GFP mice, although it does not reach significance ($p = 0.0558$). **b, e.** Student t -test. **c.** Paired t -test. $N = 5$ /group. **b:** $N = 3$ -5/group. **e:** $N = 4$ -5/group.

Our results suggest that a higher release of DNAJB1 by reactive astrocytes could reduce mHtt aggregation in neurons. To test this hypothesis, we generated viral vectors targeting astrocytes and encoding either a wildtype (DNAJB1) or a dominant negative form of human *Dnajb1* (DNAJB1-DN) that blocks DNAJB1/Hsp40 interaction with Hsp70 chaperone activity ([Michels et al., 1999](#)) without impacting its loading in exosomes ([Takeuchi et al., 2015](#)).

LV-DNAJB1 was injected in the striatum of WT mice with LV_N-mHtt and LV_A-SOCS3 or LV_A-GFP, to evaluate if this was able to counteract SOCS3 deleterious effects (**Fig. 8a**). SOCS3 was still able to

inhibit astrocyte reactivity in presence of DNAJB1 in LV_N-mHtt injected mice, as seen with decreased striatal GFAP immunoreactivity (**Supplemental Fig. 5b**). In addition, we found that with DNAJB1 expression in astrocytes, SOCS3 no longer had exacerbating effects on neuronal lesion (**Fig. 8b**) and transcriptional defects (**Supplemental Fig. 5c**), in the lentiviral model of HD. Interestingly, the striatal volume of EM48⁺ aggregates was similar in both groups (**Fig. 8c**), suggesting that DNAJB1 is able to counteract SOCS3 detrimental effects on mHtt aggregation as well.

Conversely, to test whether JAK2ca reactive astrocytes reduce mHtt aggregates through DNAJB1/Hsp40 release towards neurons, we overexpressed DNAJB1-DN in astrocytes in Hdh140-JAK2ca and Hdh140-GFP mice (**Fig. 8d**). JAK2ca was still able to induce astrocyte reactivity in Hdh140 mice in presence of DNAJB1-DN (**Supplemental Fig. 5e**). However, we found that the total number of EM48⁺ aggregates was no longer decreased by JAK2ca-induced astrocyte reactivity (**Fig. 8e**), and *Ppp1r1b* mRNA levels were now significantly reduced by JAK2ca (**Supplemental Fig. 5f**).

Overall, our data suggest that the co-chaperone DNAJB1/Hsp40 in reactive astrocytes participates in the reduction of mHtt aggregation and improvement in neuronal features.

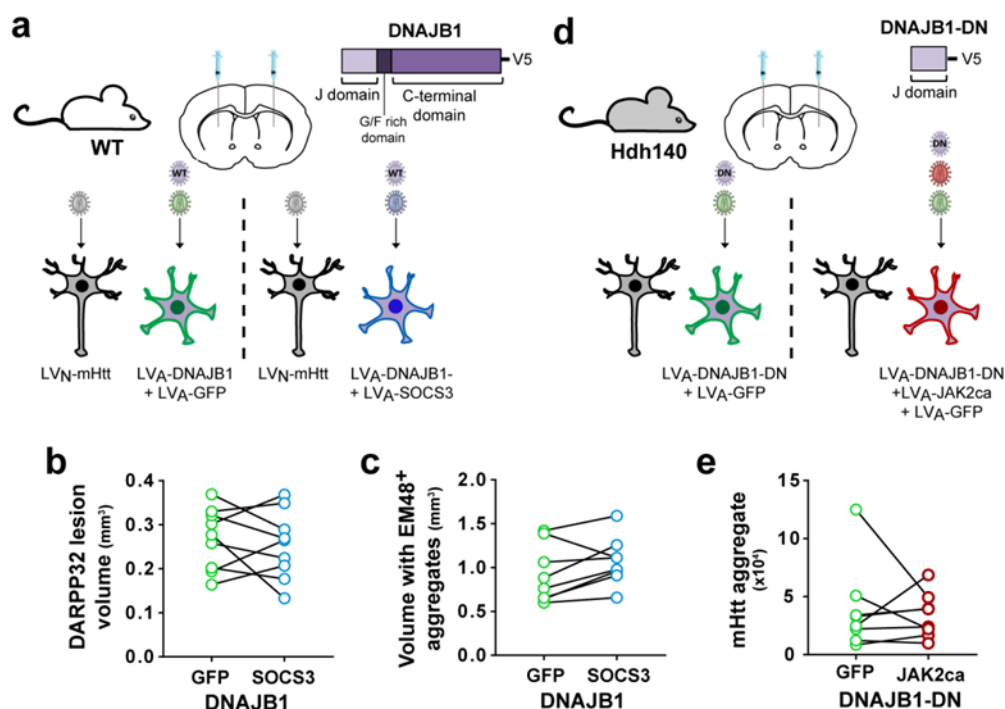


Figure 8. DNAJB1 from reactive astrocytes impacts mHtt aggregation

a. Two month-old WT mice were injected in one striatum with LV_N-mHtt + LV_A-GFP + LV_A-DNAJB1 and the contralateral striatum with LV_N-mHtt + LV_A-SOCS3 + LV_A-DNAJB1, at the same total virus load and analyzed 6 weeks later. **b.** Striatal DARPP32⁻ lesions are not different between the two groups. **c.** The volume occupied by EM48⁺ aggregates is also similar in both groups. **d.** 8-9 month-old Hdh140 mice were injected in the striatum with LV_A-GFP + LV_A-DNAJB1-DN or LV_A-JAK2ca + LV_A-GFP + LV_A-DNAJB1-DN, at the same total virus load, and analyzed 4 months later. **e.** The total number of EM48⁺ aggregates is not decreased by JAK2ca. **b, c.** Paired *t*-test **e.** Wilcoxon paired test. **b, c, e.** N = 9/group.

DISCUSSION

Reactive astrocytes impact mHtt aggregation in neurons, without affecting soluble mHtt

We report, in two complementary mouse models of HD that reactive astrocytes reduce the number and size of mHtt forming in neurons. In the first model, a short fragment of human Htt with 82Q repeats is overexpressed in striatal neurons by lentiviral gene transfer. It leads to the formation of large nuclear aggregates, death of striatal neurons and strong astrocyte reactivity ([de Almeida et al., 2002](#); [Ben Haim et al., 2015b](#)). We found that blocking reactivity with SOCS3 increases the number of mHtt aggregates, confirming our previous study ([Ben Haim et al., 2015b](#)). We further show qualitative effects of SOCS3-mediated inhibition of reactivity, as it also increases the size of mHtt aggregates. In the more genetically-relevant knock-in mouse model of HD that bears a humanized exon 1 with 140 CAG repeats in the mouse *Htt* gene, stimulation of astrocyte reactivity by JAK2ca has mirror effects, reducing both the size and number of striatal mHtt aggregates.

The reduction of aggregation by reactive astrocytes is not due to lower mHtt expression as mouse and human mHtt mRNA levels were not impacted by JAK2ca. Importantly, reduced aggregation did not cause soluble mHtt levels to rise. Rather, it seems that reactive astrocytes favor clearance of pre-formed Tx-insoluble oligomers, fibrils or aggregates of mHtt, without impacting the initial steps of mHtt processing and its soluble levels. As aggregates form mainly in neurons, transcellular signaling mechanisms must occur between reactive astrocytes and neurons subject to mHtt aggregation (see below).

Reactive astrocytes have higher proteolytic capacities

Our transcriptomic analysis of acutely sorted reactive astrocytes reveals extensive expression changes in lysosomal proteases, as well as genes involved in ubiquitination or proteosomal degradation. We confirmed that JAK2ca-induced reactive astrocytes have a higher cathepsin and proteosomal activity in Hdh140 mice. These fluorescent probes are potent tools to measure proteolytic activity specifically in virally labeled astrocytes. Indeed, both cathepsins and the proteasome are ubiquitous and changes in astrocytes could be masked by larger expression or activity in other cell types. The lack of cell resolution is a limit to other bulk techniques like western blot or RT-qPCR, which may dilute astrocyte-specific regulations. The development of cell-type specific analysis, for example based on cytometry, fluorescence on brain slices or astrocyte primary cultures or even iPSC-derived human astrocytes will help further understand reactive astrocyte proteolytic functions in HD. It is however important to note that astrocytes cultured without other

brain cells may be very different from *in situ*, and may be already reactive ([Zamanian et al., 2012](#)). Our ability to force mHtt expression in astrocytes through lentiviral targeting offered a direct demonstration that reactive astrocytes degrade mHtt aggregates more efficiently, which was blocked by SOCS3. Astrocytes have higher proteolytic capacity than neurons ([Tydlacka et al., 2008](#); [Zhao et al., 2017](#)), we show here for the first time that reactive astrocytes are also more efficient than their non-reactive counterparts.

How can mHtt be transferred from neurons to reactive astrocytes to be degraded? In a very elegant study, exon 1 of mHtt tagged with mCherry was found to be exchanged between neurons and neighboring glia in *Drosophila*, and form aggregates with WT Htt in these cells ([Pearce et al., 2015](#)). These phagocytic *Drosophila* glia are not exactly similar to astrocytes in mammals and they share properties with both microglial and astrocytes cells. But this pioneer study, with that of Pecho-Vriesling, demonstrated that mHtt can be exchanged between brain cells ([Pecho-Vriesling et al., 2014](#); [Babcock and Ganetzky, 2015](#)), as it was suspected before, when mHtt aggregates were found in healthy embryonic neurons grafted in the brain of HD patients ([Cicchetti et al., 2014](#)). In general, protein aggregates can be exchanged by several routes, such as extracellular vesicles (exosomes, ectosomes) or via exocytosis or tunneling nanotubes ([Brundin et al., 2010](#); [Tang, 2018](#)). mHtt can be packaged in exosomes of different cell types ([Diaz-Hidalgo et al., 2016](#); [Jeon et al., 2016](#)) and be taken up by neighboring cells, including neurons. But exchange of mHtt may also involve cell-to-cell contacts ([Costanzo et al., 2013](#)) or unconventional secretory pathways ([Trajkovic et al., 2017](#)). However, as these studies were done *in vitro* or in non-neuronal cell types, the exact mechanisms of mHtt exchange from neurons to their assistant in clearance, the astrocytes, remain to be determined *in situ*.

Surprisingly, transcriptomic analysis reported a decrease in mRNA levels of several E2 ubiquitin ligases and regulatory subunits of the proteasome in WT-JAK2ca astrocytes. Yet, proteasomal activity was significantly increased in striatal reactive astrocytes of Hdh140 mice. This discrepancy between transcript levels and activity may be explained by the fact that the UPS is regulated by post-transcriptional changes ([Dikic, 2017](#)). In addition, the UPS involves hundreds of proteins, it is thus possible that more subtle expression changes in other UPS genes may *in fine* drive an increased activity in HD astrocytes.

Reactive astrocytes produce anti-aggregation molecules

An alternative and non-exclusive explanation for our observations could be an improved neuronal mHtt clearance under the control of anti-aggregation proteins released by reactive astrocytes (**Fig. 9**). Our transcriptomic study shows that several chaperones are induced in reactive astrocytes. In particular, DNAJB1/Hsp40 was induced at the protein level in Hdh140-JAK2ca mice and was enriched

in extracellular exosomes. Indeed, chaperones are released by exosomes and mediate trans-cellular proteostasis ([Takeuchi et al., 2015](#); [San Gil et al., 2017](#); [Takeuchi, 2018](#)). In particular, exosomes from astrocytes are known to reduce mHtt aggregation in HD mice ([Hong et al., 2017](#)).

Through its J domain, DNAJB1/Hsp40 interacts with the key chaperone Hsp70 and stimulates its ATP dependent chaperone activity ([Kampinga and Craig, 2010](#)). The J domain is also implicated in Hsp40 loading in exosomes ([Michels et al., 1999](#); [Takeuchi et al., 2015](#)). The J domain alone is no longer able to activate Hsp70 and acts as a dominant negative ([Michels et al., 1999](#)). Expression of this mutant in astrocytes abrogated JAK2ca-reduction of mHtt aggregation and improvement of *Ppp1r1b* transcript levels in Hdh140 mice, suggesting that DNAJB1 is involved in JAK2ca beneficial effects. Conversely, expressing DNAJB1 in SOCS3-deactivated astrocytes blocked their deleterious effects on neuronal death and transcriptional defects in the LV model. Overall, our data strongly suggest that DNAJB1/Hsp40 produced by reactive astrocytes contributes to the clearance of mHtt.

The expression of Hsp, as their name implies, is induced by exposure to heat or other cellular stress ([Lindquist, 1986](#)). This heat shock response is described to be impaired in HD models, but this was studied either on mixed brain cells or cell lines ([Hay et al., 2004](#); [Neueder et al., 2017](#)), possibly masking the specific response of astrocytes. Indeed, we focused on DNAJB1/Hsp40 induction in reactive astrocytes, but transcriptomics analysis suggests that larger changes in chaperone expression may occur in reactive astrocytes, suggesting that these cells can release anti-aggregation cargos loaded with several chaperones towards neighboring neurons. It will be interesting to further explore at the protein level the complete “chaperome” ([Brehme et al., 2014](#)) of reactive astrocytes.

Hsp proteins not only prevent mHtt aggregation or interaction with other proteins but also promote solubility of proteins trapped in aggregates like transcription factors, and favor mHtt degradation through the UPS or autophagy ([Ciechanover and Kwon, 2017](#)). Interestingly, Hsp-mediated extraction of proteins from aggregates (housekeeping proteins or mHtt itself) is expected to reduce the size of aggregates, consistent with our observations. Hsp70 and Hsp40 inhibit the formation of spherical and annular oligomers of mHtt while favoring the formation of fibrillary aggregates that are less toxic ([Muchowski et al., 2000](#); [Koyuncu et al., 2017](#)). Therefore, Hsp have multiple actions that can *in fine* protect neurons against the toxicity of mHtt, as shown in different experimental systems of Hsp overexpression ([Warrick et al., 1999](#); [Popiel et al., 2012](#); [Bason et al., 2019](#)). Our results are the first to show that neurons may also rely on reactive astrocytes for chaperone-mediated clearance of mHtt.

Astrocyte reactivity is beneficial in HD

The question of mHtt aggregate toxicity is still open ([Arrasate and Finkbeiner, 2012](#); [Hosp et al., 2017](#)). Aggregates may have a biphasic action ([Ramdzan et al., 2017](#)), where initially, they are protective by trapping soluble toxic mHtt and preventing its deleterious interactions with cellular partners. But later, these mHtt aggregates become detrimental by sequestering other important proteins like transcription factors or housekeeping proteins or microRNA, leading to neuronal dysfunction and necrotic death ([Gong et al., 2008](#); [Hosp et al., 2017](#); [Pircs et al., 2018](#)). Most of the studies addressing the toxicity of mHtt aggregates have been explored in reduced *in vitro* systems where time-lapse monitoring of neurons or immortal cells and their aggregates can be performed. It is far from a complex brain environment where neurons will be surrounded by multiple cell types, including reactive astrocytes and have to cope with mHtt for years in Humans.

Importantly, the number of mHtt aggregates need not to be measured alone, but in association with soluble mHtt protein levels as well as mHtt mRNA levels, to identify whether reduction in mHtt aggregate levels i) is the result of lower mHtt production, or ii) the other way around, causes the release of mHtt, or iii) as in our case, is independent of mHtt protein and mRNA levels. In addition, the status of neurons needs to be evaluated. Here, we report that reduced mHtt aggregation is associated with improved neuronal features *in vivo*. Conversely, a higher number of mHtt aggregates worsens striatal lesion and transcriptional deficits. It will be important to further explore how reactive astrocytes impact other functional outcomes, like electrophysiological activity of striatal neurons or motor behavior that are altered in Hdh140 mice ([Menalled et al., 2003](#); [Cummings et al., 2010](#)).

Such beneficial effects of reactive astrocytes are reminiscent of the protective effects of STAT3-mediated astrocyte reactivity in spinal cord injury ([Anderson et al., 2016](#)), but are at odds with their detrimental effects reported in two Alzheimer's disease mouse models ([Ceyzériat et al., 2018](#); [Reichenbach et al., 2019](#)). This underlines the heterogeneity of reactive astrocytes and their various actions in the diseased brain.

Overall, we show for the first time that astrocytes by becoming reactive, acquire anti-aggregation properties and help neurons handle toxic mHtt. Our study uncovers two, non-exclusive inter-cellular mechanisms to reduce mHtt aggregation in neurons during HD: one that reduces mHtt aggregation within reactive astrocytes themselves, requiring mHtt exchange; the other involving release of chaperones from reactive astrocytes to promote neuron proteostasis. Our result open new therapeutic strategies to promote this natural partnership between reactive astrocytes and vulnerable neurons in HD.

REFERENCES

- Anderson MA, Burda JE, Ren Y, Ao Y, O'Shea TM, Kawaguchi R, *et al.* Astrocyte scar formation aids central nervous system axon regeneration. *Nature* 2016; 532(7598): 195-200.
- Arrasate M, Finkbeiner S. Protein aggregates in Huntington's disease. *Exp Neurol* 2012; 238(1): 1-11.
- Arrasate M, Mitra S, Schweitzer ES, Segal MR, Finkbeiner S. Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death. *Nature* 2004; 431(7010): 805-10.
- Babcock DT, Ganetzky B. Transcellular spreading of huntingtin aggregates in the Drosophila brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015; 112(39): E5427-33.
- Bason M, Meister-Broekema M, Alberts N, Dijkers P, Bergink S, Sibon OCM, *et al.* Astrocytic expression of the chaperone DNAJB6 results in non-cell autonomous protection in Huntington's disease. *Neurobiol Dis* 2019; 124: 108-17.
- Bates GP, Dorsey R, Gusella JF, Hayden MR, Kay C, Leavitt BR, *et al.* Huntington disease. *Nature reviews Disease primers* 2015; 1: 15005.
- Ben Haim L, Carrillo-de Sauvage MA, Ceyzeriat K, Escartin C. Elusive roles for reactive astrocytes in neurodegenerative diseases. *Frontiers in cellular neuroscience* 2015a; 9: 278.
- Ben Haim L, Ceyzeriat K, Carrillo-de Sauvage MA, Aubry F, Auregan G, Guillemier M, *et al.* The JAK/STAT3 Pathway Is a Common Inducer of Astrocyte Reactivity in Alzheimer's and Huntington's Diseases. *J Neurosci* 2015b; 35(6): 2817-29.
- Berkers CR, van Leeuwen FW, Groothuis TA, Peperzak V, van Tilburg EW, Borst J, *et al.* Profiling proteasome activity in tissue with fluorescent probes. *Mol Pharm* 2007; 4(5): 739-48.
- Brehme M, Voisine C, Rolland T, Wachi S, Soper JH, Zhu Y, *et al.* A chaperome subnetwork safeguards proteostasis in aging and neurodegenerative disease. *Cell reports* 2014; 9(3): 1135-50.
- Brundin P, Melki R, Kopito R. Prion-like transmission of protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nature reviews Molecular cell biology* 2010; 11(4): 301-7.
- Ceyzeriat K, Abjean L, Carrillo-de Sauvage MA, Ben Haim L, Escartin C. The complex STATes of astrocyte reactivity: How are they controlled by the JAK-STAT3 pathway? *Neuroscience* 2016; 330: 205-18.
- Ceyzeriat K, Ben Haim L, Denizot A, Pommier D, Matos M, Guillemaud O, *et al.* Modulation of astrocyte reactivity improves functional deficits in mouse models of Alzheimer's disease. *Acta neuropathologica communications* 2018; 6(1): 104.
- Cicchetti F, Lacroix S, Cisbani G, Vallieres N, Saint-Pierre M, St-Amour I, *et al.* Mutant huntingtin is present in neuronal grafts in Huntington disease patients. *Ann Neurol* 2014; 76(1): 31-42.
- Ciechanover A, Kwon YT. Protein Quality Control by Molecular Chaperones in Neurodegeneration. *Frontiers in neuroscience* 2017; 11: 185.
- Colin A, Faideau M, Dufour N, Auregan G, Hassig R, Andrieu T, *et al.* Engineered lentiviral vector targeting astrocytes in vivo. *Glia* 2009; 57(6): 667-79.
- Cortes CJ, La Spada AR. The many faces of autophagy dysfunction in Huntington's disease: from mechanism to therapy. *Drug discovery today* 2014; 19(7): 963-71.
- Costanzo M, Abounit S, Marzo L, Danckaert A, Chamoun Z, Roux P, *et al.* Transfer of polyglutamine aggregates in neuronal cells occurs in tunneling nanotubes. *J Cell Sci* 2013; 126(Pt 16): 3678-85.
- Cummings DM, Cepeda C, Levine MS. Alterations in striatal synaptic transmission are consistent across genetic mouse models of Huntington's disease. *ASN neuro* 2010; 2(3): e00036.
- de Almeida LP, Ross CA, Zala D, Aebischer P, Deglon N. Lentiviral-mediated delivery of mutant huntingtin in the striatum of rats induces a selective neuropathology modulated by polyglutamine repeat size, huntingtin expression levels, and protein length. *J Neurosci* 2002; 22(9): 3473-83.
- De Maio A, Vazquez D. Extracellular heat shock proteins: a new location, a new function. *Shock* 2013; 40(4): 239-46.

Diaz-Hidalgo L, Altuntas S, Rossin F, D'Eletto M, Marsella C, Farrace MG, *et al.* Transglutaminase type 2-dependent selective recruitment of proteins into exosomes under stressful cellular conditions. *Biochim Biophys Acta* 2016; 1863(8): 2084-92.

DiFiglia M, Sapp E, Chase KO, Davies SW, Bates GP, Vonsattel JP, *et al.* Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science* 1997; 277(5334): 1990-3.

Dikic I. Proteasomal and Autophagic Degradation Systems. *Annual review of biochemistry* 2017; 86: 193-224.

Faiveau M, Kim J, Cormier K, Gilmore R, Welch M, Auregan G, *et al.* In vivo expression of polyglutamine-expanded huntingtin by mouse striatal astrocytes impairs glutamate transport: a correlation with Huntington's disease subjects. *Hum Mol Genet* 2010; 19(15): 3053-67.

Gong B, Lim MC, Wanderer J, Wyttenbach A, Morton AJ. Time-lapse analysis of aggregate formation in an inducible PC12 cell model of Huntington's disease reveals time-dependent aggregate formation that transiently delays cell death. *Brain research bulletin* 2008; 75(1): 146-57.

Gutkunst CA, Li SH, Yi H, Mulroy JS, Kuemmerle S, Jones R, *et al.* Nuclear and neuropil aggregates in Huntington's disease: relationship to neuropathology. *J Neurosci* 1999; 19(7): 2522-34.

Harding RJ, Tong YF. Proteostasis in Huntington's disease: disease mechanisms and therapeutic opportunities. *Acta pharmacologica Sinica* 2018; 39(5): 754-69.

Hartl FU, Bracher A, Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature* 2011; 475(7356): 324-32.

Hay DG, Sathasivam K, Tobaben S, Stahl B, Marber M, Mestrl R, *et al.* Progressive decrease in chaperone protein levels in a mouse model of Huntington's disease and induction of stress proteins as a therapeutic approach. *Hum Mol Genet* 2004; 13(13): 1389-405.

Hickey MA, Kosmalska A, Enayati J, Cohen R, Zeitlin S, Levine MS, *et al.* Extensive early motor and non-motor behavioral deficits are followed by striatal neuronal loss in knock-in Huntington's disease mice. *Neuroscience* 2008; 157(1): 280-95.

Hong Y, Zhao T, Li XJ, Li S. Mutant Huntingtin Impairs BDNF Release from Astrocytes by Disrupting Conversion of Rab3a-GTP into Rab3a-GDP. *J Neurosci* 2016; 36(34): 8790-801.

Hong Y, Zhao T, Li XJ, Li S. Mutant Huntingtin Inhibits alphaB-Crystallin Expression and Impairs Exosome Secretion from Astrocytes. *J Neurosci* 2017; 37(39): 9550-63.

Hosp F, Gutierrez-Angel S, Schaefer MH, Cox J, Meissner F, Hipp MS, *et al.* Spatiotemporal Proteomic Profiling of Huntington's Disease Inclusions Reveals Widespread Loss of Protein Function. *Cell reports* 2017; 21(8): 2291-303.

Hsiao HY, Chen YC, Huang CH, Chen CC, Hsu YH, Chen HM, *et al.* Aberrant astrocytes impair vascular reactivity in Huntington disease. *Ann Neurol* 2015; 78(2): 178-92.

Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature protocols* 2009; 4(1): 44-57.

Jansen AH, Reits EA, Hol EM. The ubiquitin proteasome system in glia and its role in neurodegenerative diseases. *Frontiers in molecular neuroscience* 2014; 7: 73.

Jansen AH, van Hal M, Op den Kelder IC, Meier RT, de Ruiter AA, Schut MH, *et al.* Frequency of nuclear mutant huntingtin inclusion formation in neurons and glia is cell-type-specific. *Glia* 2017; 65(1): 50-61.

Jeon I, Cicchetti F, Cisbani G, Lee S, Li E, Bae J, *et al.* Human-to-mouse prion-like propagation of mutant huntingtin protein. *Acta Neuropathol* 2016; 132(4): 577-92.

Kabani M, Melki R. Sup35p in Its Soluble and Prion States Is Packaged inside Extracellular Vesicles. *mBio* 2015; 6(4).

Kampinga HH, Craig EA. The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. *Nature reviews Molecular cell biology* 2010; 11(8): 579-92.

Khakh BS, Beaumont V, Cachepe R, Munoz-Sanjuan I, Goldman SA, Grantyn R. Unravelling and Exploiting Astrocyte Dysfunction in Huntington's Disease. *Trends Neurosci* 2017; 40(7): 422-37.

Koyuncu S, Fatima A, Gutierrez-Garcia R, Vilchez D. Proteostasis of Huntingtin in Health and Disease. *International journal of molecular sciences* 2017; 18(7).

Lee Y, Messing A, Su M, Brenner M. GFAP promoter elements required for region-specific and astrocyte-specific expression. *Glia* 2008; 56(5): 481-93.

Lievens JC, Woodman B, Mahal A, Spasic-Boskovic O, Samuel D, Kerkerian-Le Goff L, *et al.* Impaired glutamate uptake in the R6 Huntington's disease transgenic mice. *Neurobiol Dis* 2001; 8(5): 807-21.

Lindquist S. The heat-shock response. *Annual review of biochemistry* 1986; 55: 1151-91.

Lunkes A, Lindenberg KS, Ben-Haiem L, Weber C, Devys D, Landwehrmeyer GB, *et al.* Proteases acting on mutant huntingtin generate cleaved products that differentially build up cytoplasmic and nuclear inclusions. *Molecular cell* 2002; 10(2): 259-69.

McColgan P, Tabrizi SJ. Huntington's disease: a clinical review. *European journal of neurology* 2018; 25(1): 24-34.

Menalled LB, Sison JD, Dragatsis I, Zeitlin S, Chesselet MF. 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* 2003; 465(1): 11-26.

Michels AA, Kanon B, Bensaude O, Kampinga HH. Heat shock protein (Hsp) 40 mutants inhibit Hsp70 in mammalian cells. *J Biol Chem* 1999; 274(51): 36757-63.

Muchowski PJ, Schaffar G, Sittler A, Wanker EE, Hayer-Hartl MK, Hartl FU. Hsp70 and hsp40 chaperones can inhibit self-assembly of polyglutamine proteins into amyloid-like fibrils. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(14): 7841-6.

Naldini L, Blomer U, Gage FH, Trono D, Verma IM. Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93(21): 11382-8.

Neueder A, Gipson TA, Batteredon S, Lazell HJ, Farshim PP, Paganetti P, *et al.* HSF1-dependent and -independent regulation of the mammalian in vivo heat shock response and its impairment in Huntington's disease mouse models. *Scientific reports* 2017; 7(1): 12556.

Ortega Z, Lucas JJ. Ubiquitin-proteasome system involvement in Huntington's disease. *Frontiers in molecular neuroscience* 2014; 7: 77.

Pearce MM, Spartz EJ, Hong W, Luo L, Kopito RR. Prion-like transmission of neuronal huntingtin aggregates to phagocytic glia in the Drosophila brain. *Nature communications* 2015; 6: 6768.

Pecho-Vrieseling E, Rieker C, Fuchs S, Bleckmann D, Esposito MS, Botta P, *et al.* Transneuronal propagation of mutant huntingtin contributes to non-cell autonomous pathology in neurons. *Nat Neurosci* 2014; 17(8): 1064-72.

Pircs K, Petri R, Madsen S, Brattas PL, Vuono R, Ottosson DR, *et al.* Huntingtin Aggregation Impairs Autophagy, Leading to Argonaute-2 Accumulation and Global MicroRNA Dysregulation. *Cell reports* 2018; 24(6): 1397-406.

Popiel HA, Takeuchi T, Fujita H, Yamamoto K, Ito C, Yamane H, *et al.* Hsp40 gene therapy exerts therapeutic effects on polyglutamine disease mice via a non-cell autonomous mechanism. *PLoS One* 2012; 7(11): e51069.

Ramdzan YM, Trubetskov MM, Ormsby AR, Newcombe EA, Sui X, Tobin MJ, *et al.* Huntingtin Inclusions Trigger Cellular Quiescence, Deactivate Apoptosis, and Lead to Delayed Necrosis. *Cell reports* 2017; 19(5): 919-27.

Rebec GV, Barton SJ, Ennis MD. Dysregulation of ascorbate release in the striatum of behaving mice expressing the Huntington's disease gene. *J Neurosci* 2002; 22(2): RC202.

Reichenbach N, Delekate A, Plescher M, Schmitt F, Krauss S, Blank N, *et al.* Inhibition of Stat3-mediated astrogliosis ameliorates pathology in an Alzheimer's disease model. *EMBO molecular medicine* 2019.

Rubinsztein DC. The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. *Nature* 2006; 443(7113): 780-6.

San Gil R, Ooi L, Yerbury JJ, Ecroyd H. The heat shock response in neurons and astroglia and its role in neurodegenerative diseases. *Molecular neurodegeneration* 2017; 12(1): 65.

Saudou F, Humbert S. The Biology of Huntingtin. *Neuron* 2016; 89(5): 910-26.

Schaffar G, Breuer P, Boteva R, Behrends C, Tzvetkov N, Strippel N, *et al.* Cellular toxicity of polyglutamine expansion proteins: mechanism of transcription factor deactivation. *Molecular cell* 2004; 15(1): 95-105.

Selkoe DJ, Salazar FJ, Abraham C, Kosik KS. Huntington's disease: changes in striatal proteins reflect astrocytic gliosis. *Brain Res* 1982; 245(1): 117-25.

Shin JY, Fang ZH, Yu ZX, Wang CE, Li SH, Li XJ. Expression of mutant huntingtin in glial cells contributes to neuronal excitotoxicity. *J Cell Biol* 2005; 171(6): 1001-12.

Soares TR, Reis SD, Pinho BR, Duchen MR, Oliveira JMA. Targeting the proteostasis network in Huntington's disease. *Ageing research reviews* 2019; 49: 92-103.

Takeuchi T. Non-cell Autonomous Maintenance of Proteostasis by Molecular Chaperones and Its Molecular Mechanism. *Biol Pharm Bull* 2018; 41(6): 843-9.

Takeuchi T, Suzuki M, Fujikake N, Popiel HA, Kikuchi H, Futaki S, *et al.* Intercellular chaperone transmission via exosomes contributes to maintenance of protein homeostasis at the organismal level. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015; 112(19): E2497-506.

Tang BL. Unconventional Secretion and Intercellular Transfer of Mutant Huntingtin. *Cells* 2018; 7(6).

TheHuntingtonstudygroup. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. The Huntington's Disease Collaborative Research Group. *Cell* 1993; 72(6): 971-83.

Tong X, Ao Y, Faas GC, Nwaobi SE, Xu J, Hausteine MD, *et al.* Astrocyte Kir4.1 ion channel deficits contribute to neuronal dysfunction in Huntington's disease model mice. *Nat Neurosci* 2014; 17(5): 694-703.

Trajkovic K, Jeong H, Krainc D. Mutant Huntingtin Is Secreted via a Late Endosomal/Lysosomal Unconventional Secretory Pathway. *J Neurosci* 2017; 37(37): 9000-12.

Trottier Y, Lutz Y, Stevanin G, Imbert G, Devys D, Cancel G, *et al.* Polyglutamine expansion as a pathological epitope in Huntington's disease and four dominant cerebellar ataxias. *Nature* 1995; 378(6555): 403-6.

Tydlacka S, Wang CE, Wang X, Li S, Li XJ. Differential activities of the ubiquitin-proteasome system in neurons versus glia may account for the preferential accumulation of misfolded proteins in neurons. *J Neurosci* 2008; 28(49): 13285-95.

Vella LJ, Scicluna BJ, Cheng L, Bawden EG, Masters CL, Ang CS, *et al.* A rigorous method to enrich for exosomes from brain tissue. *Journal of extracellular vesicles* 2017; 6(1): 1348885.

Verkhratsky A, Nedergaard M. Physiology of Astroglia. *Physiological reviews* 2018; 98(1): 239-389.

Vonsattel JP, Myers RH, Stevens TJ, Ferrante RJ, Bird ED, Richardson EP, Jr. Neuropathological classification of Huntington's disease. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 1985; 44(6): 559-77.

Wang L, Lin F, Wang J, Wu J, Han R, Zhu L, *et al.* Expression of mutant N-terminal huntingtin fragment (htt552-100Q) in astrocytes suppresses the secretion of BDNF. *Brain Res* 2012; 1449: 69-82.

Warrick JM, Chan HY, Gray-Board GL, Chai Y, Paulson HL, Bonini NM. Suppression of polyglutamine-mediated neurodegeneration in *Drosophila* by the molecular chaperone HSP70. *Nature genetics* 1999; 23(4): 425-8.

Withana NP, Garland M, Verdoes M, Ofori LO, Segal E, Bogoy M. Labeling of active proteases in fresh-frozen tissues by topical application of quenched activity-based probes. *Nature protocols* 2016; 11(1): 184-91.

Wojtowicz AM, Dvorzhak A, Semtner M, Grantyn R. Reduced tonic inhibition in striatal output neurons from Huntington mice due to loss of astrocytic GABA release through GAT-3. *Frontiers in neural circuits* 2013; 7: 188.

Zamanian JL, Xu L, Foo LC, Nouri N, Zhou L, Giffard RG, *et al.* Genomic analysis of reactive astroglia. *J Neurosci* 2012; 32(18): 6391-410.

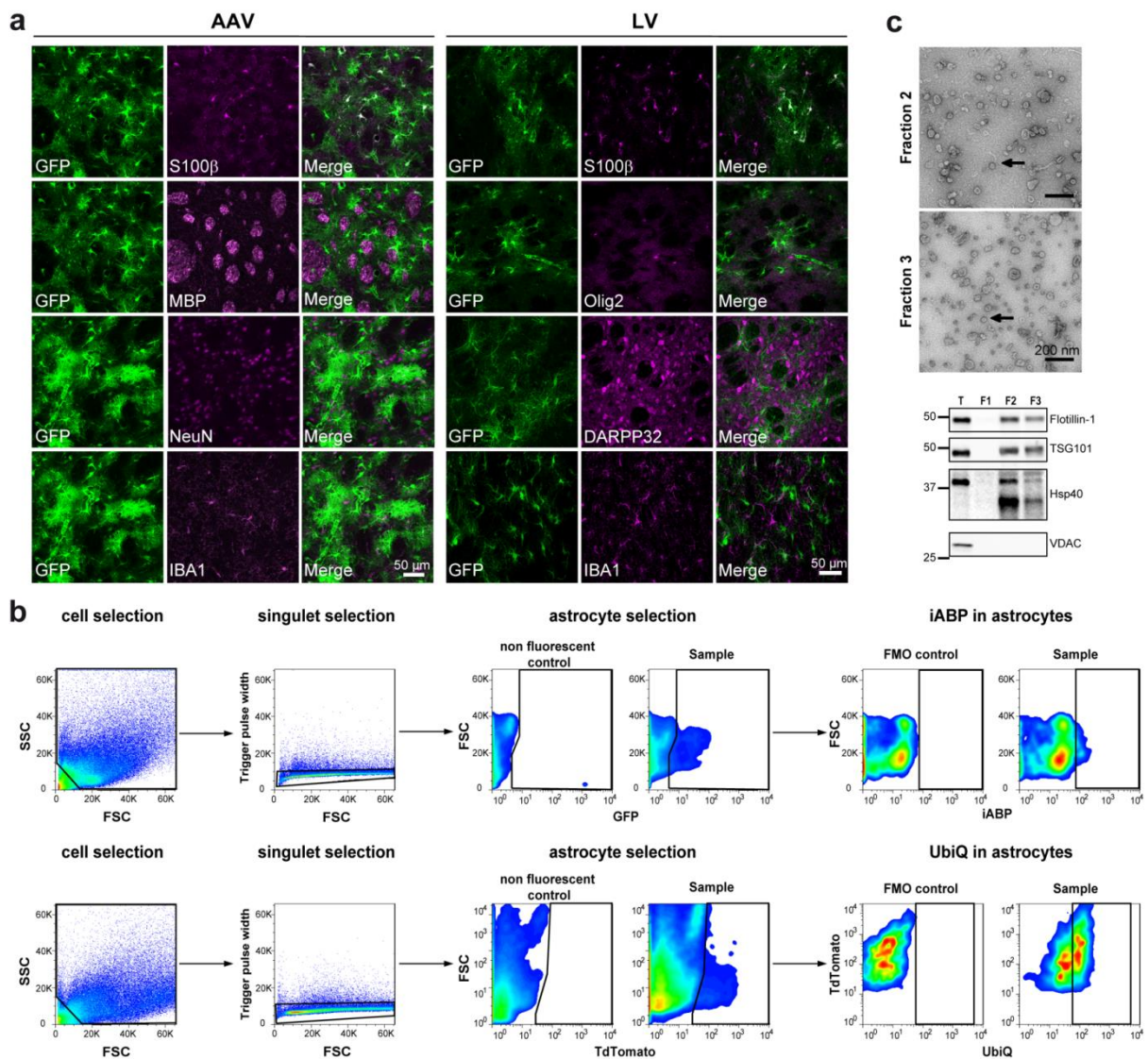
Zhao T, Hong Y, Yin P, Li S, Li XJ. Differential HspBP1 expression accounts for the greater vulnerability of neurons than astrocytes to misfolded proteins. Proc Natl Acad Sci U S A 2017; 114(37): E7803-E11.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by CEA, CNRS and grants from the French National Research Agency (grants # 2010-JCJC-1402-1, 2011-BSV4-021-03 and ANR-16-TERC-0016-01 to C.E. and 2011-INBS-0011 NeurATRIS to P.H.). C.E. and L.A. received support from the Association Huntington France. L.A. holds a PhD fellowship from the “Region Ile-de-France” via the “DIM Cerveau et Pensée”. The present work benefited from the electron microscopy facility of Imagerie-Gif (I2BC, CEA, CNRS, Univ. Paris-Saclay), member of IBISA (<http://www.ibisa.net>), supported by France-BioImaging (ANR-10-INBS-04-01) and the Labex Science Plant Saclay (ANR-10-LABX-0040-SPS).

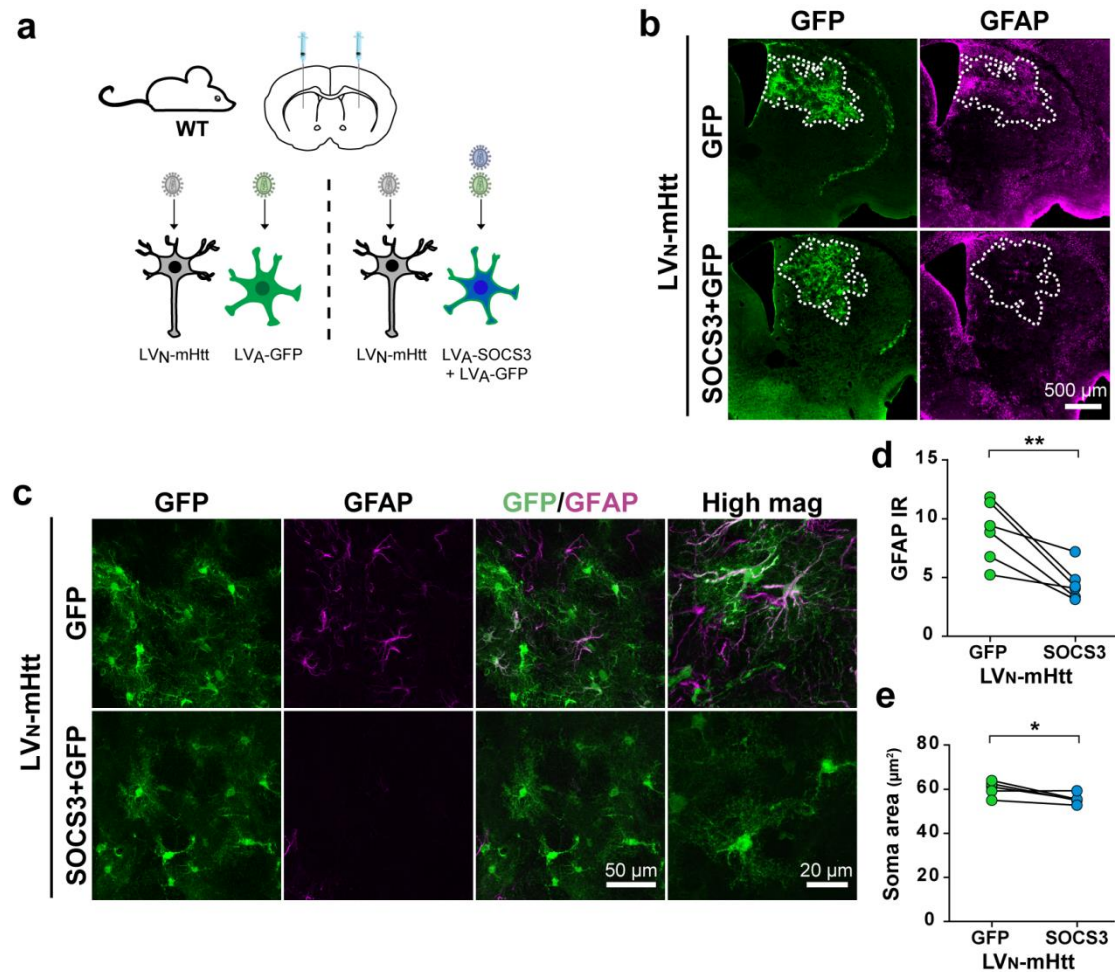
We are grateful to F. Aubry for help with initial AAV vector cloning and FACS experiments and J. Baijer and N. Dechamps for help with FACS-isolation of astrocytes. We thank Prof. Déglon for helpful discussions at the beginning of the project. We acknowledge the help of V. Lavilla and C. Dulary on transcriptomic studies at the CNRGH. We thank Dr. K. Cambon, Dr. G. Liot for sharing their antibodies to S100 β , VDAC and mHtt (1C2 and 2B4).

We thank L. de Longprez for helping with the Hdh140 colony and E. Saavedra and R. Jacquemin for help with pilot experiments.



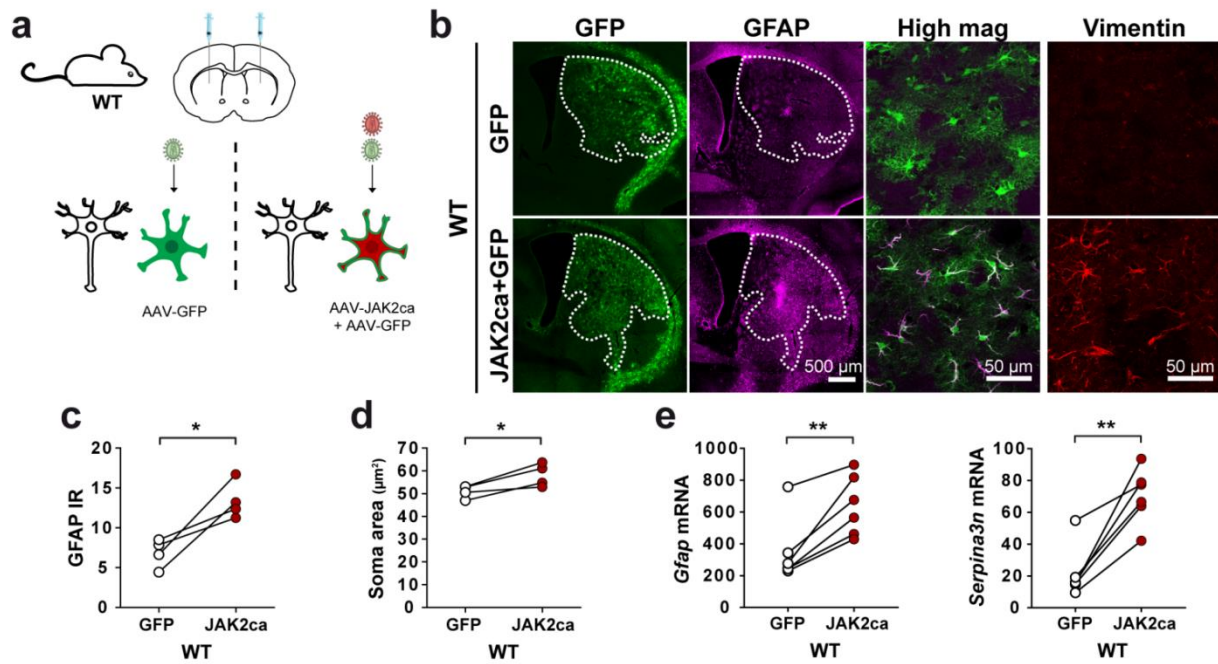
Supplementary figure 1. Validations of experimental procedures

a. Validation of astrocyte transduction by viral vectors. Injection of AAV2/9 or LV encoding GFP and targeting astrocytes in the mouse striatum. GFP⁺ cells (green) co-express the astrocytic markers S100 β or GFAP, but not IBA1, NeuN, DARPP32, MBP or Olig2 (in magenta), which are specific markers for microglia, neurons, oligodendrocyte or cells of the oligodendrocyte lineage respectively, demonstrating selective astrocyte tropism of both vectors. **b. Gating strategy for proteasome activity measurement on dissociated cells.** Cells were gated on a side scatter/forward scatter plot, singlets were selected and then GFP⁺ or TdTomato⁺ astrocytes were gated based on a control non fluorescent sample. Finally, the percentage of GFP⁺/iABP⁺ or TdTomato⁺/UbiQ⁺ astrocytes was quantified in each mouse after setting the gates on a sample not incubated with a probe (i.e. FMO controls). **c. Purity of the exosomal fractions.** Fractions 2 and 3 (F2, F3) obtained from the striatum of control mice contained many round vesicles with the typical size and shape of exosomes (arrow). Western blotting confirms that Flotillin-1 and TSG101, two exosomal proteins are enriched in fractions 2 and 3, while VDAC, a mitochondrial protein, is only found in total homogenate (T). DNAJB1/Hsp40 is also found in exosomal fractions.



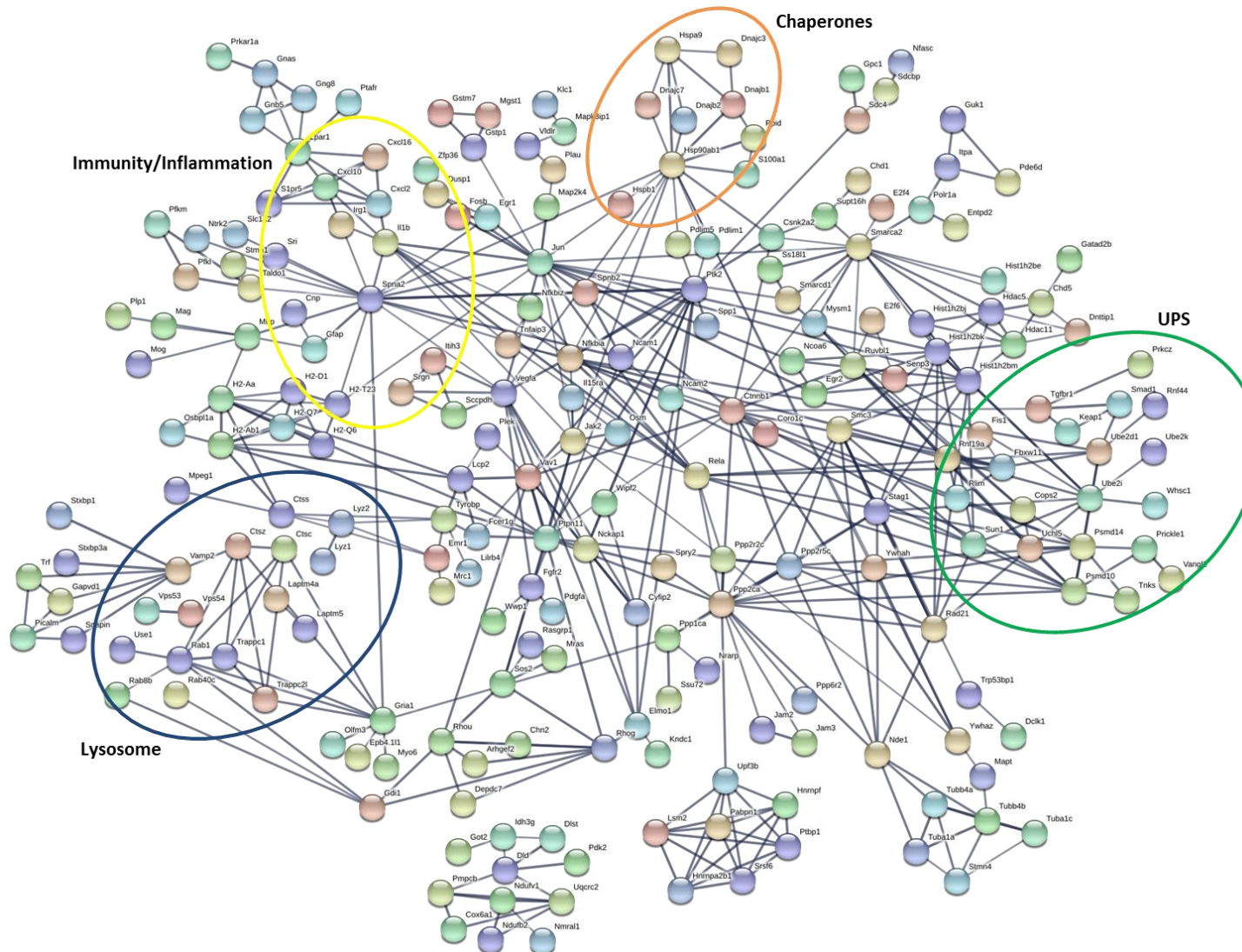
Supplementary figure 2. SOCS3 inhibits astrocyte reactivity in the lentiviral model of HD.

a. Two month-old WT mice were injected in one striatum with LV_N-mHtt and LV_A-GFP and the contralateral striatum with LV_N-mHtt, LV_A-SOCS3 and LV_A-GFP (same total viral titer), and analyzed 6 weeks later. **b.** Low magnification images show the transduced area (outlined, GFP⁺, green) and corresponding GFAP staining (magenta) in injected striata. **c.** High magnification confocal images of astrocytes stained for GFP and GFAP. GFAP levels and astrocyte hypertrophy are lower in the striatum injected with LV_N-mHtt + LV_A-SOCS3 + LV_A-GFP than the control side injected with LV_N-mHtt + LV_A-GFP. **d, e.** Quantification of GFAP (IR) (**d**) and astrocyte soma area (**e**) confirms that both are significantly decreased by SOCS3. **d, e.** Paired *t*-test. N = 6/group.



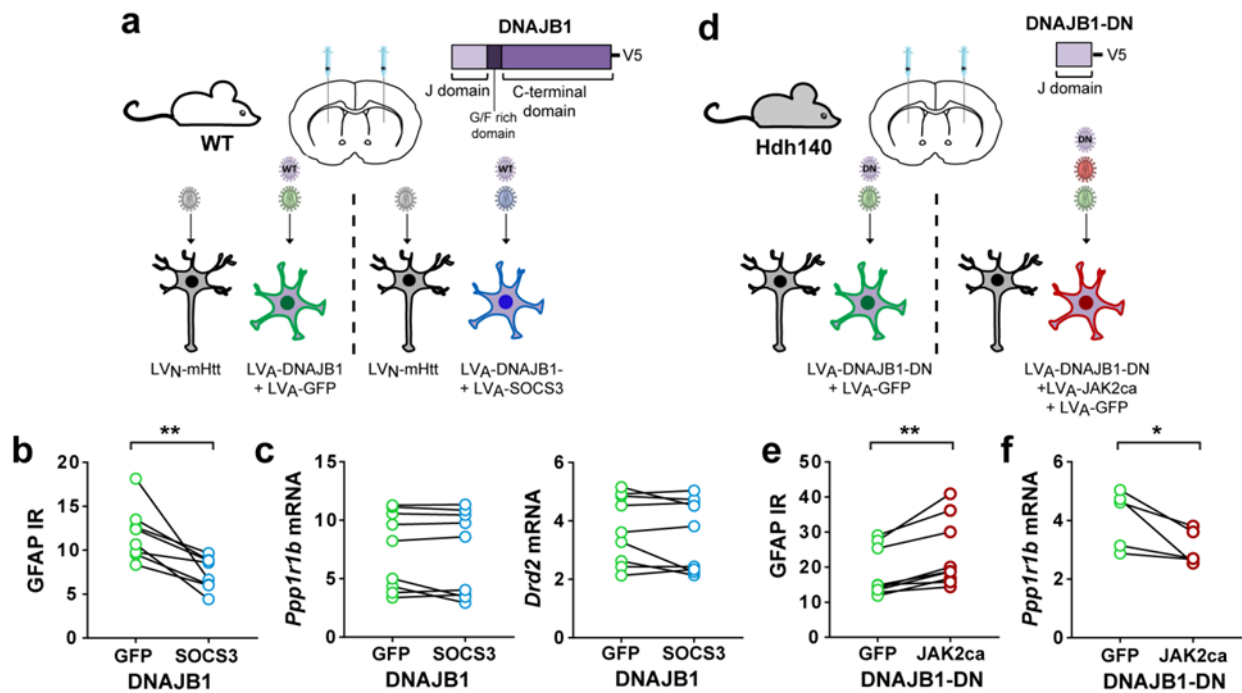
Supplementary figure 3. JAK2ca induces astrocyte reactivity in the striatum.

a. Two month-old WT mice were injected in the striatum with AAV-GFP or AAV-JAK2ca + AAV-GFP at the same total virus load, and were studied 1-2 months later. Representative confocal images showing brain sections stained for GFP (green), GFAP (magenta) and vimentin (red) in WT-GFP and WT-JAK2ca mice. JAK2ca induces GFAP and vimentin expression and morphological changes in astrocytes. **c, d.** Quantification of immunostainings confirms that JAK2ca increases GFAP IR (**c**) and astrocyte soma size (**d**). **e.** JAK2ca increases expression of the reactive genes *Gfap* and *Serpina3n*. **c-e.** Paired *t*-test. **c, d:** N = 4/group. **e:** N = 6/group.



Supplementary figure 4. Gene networks regulated by JAK2ca in striatal astrocytes.

STRING analysis of the 802 unique genes regulated by JAK2ca in striatal astrocytes. Visualization of the 569 regulated genes having high confidence interactions with more than 3 genes. JAK2ca changes the expression of genes related to signaling, immunity and inflammation (yellow circle), lysosome (blue circle), UPS (green circle), and chaperones (orange circle). They form dense gene networks. Protein-protein interaction p value $< 10^{-16}$.



Supplementary figure 5. DNAJB1 in reactive astrocytes has beneficial effects on HD transcriptional defects.

a. Two month-old WT mice were injected in one striatum with LV_N-mHtt + LV_A-GFP + LV_A-DNAJB1 and the contralateral striatum with LV_N-mHtt + LV_A-SOCS3 + LV_A-DNAJB1, at the same total virus load and analyzed 6 weeks later. **b.** Quantification of GFAP IR in transduced area confirms that SOCS3 is still able to block astrocyte reactivity in LV_N-mHtt mice. **c.** SOCS3 does not significantly reduce mRNA levels of *Ppp1r1b* and *Drd2*, when astrocytes co-express DNAJB1. **d.** 8-9 month-old Hdh140 mice were injected in the striatum with LV_A-GFP + LV_A-DNAJB1-DN or LV_A-JAK2ca + LV_A-GFP + LV_A-DNAJB1-DN, at the same total virus load, and analyzed 4 months later. **e.** Quantification of GFAP IR in transduced area confirms that JAK2ca is still able to induce astrocyte reactivity in Hdh140 mice. **f.** *Ppp1r1b* transcripts are significantly reduced by JAK2ca in Hdh140 mice when astrocytes DNAJB1 activity is blocked by the dominant negative form DNJB1-DN. **b, c.** Paired *t*-test. **e, f.** Wilcoxon paired test. **b, c:** N = 4/group. **e:** N = 8/group. **f:** N = 5/group.

Supplementary table 1: Sequences of qPCR primers.

Gene	Forward primer	Reverse primer
<i>Actin</i>	AGAGGGAAATCGTGCGTGAC	CGATAGTGATGACCTGACCGT
<i>CtsC</i>	GCAATGAAGCCCTGATGAA	CAGCCCAGTGTGGTGATAGA
<i>CtsS</i>	GGC ATG AAC GAT ATG GGA G	TCA GGC AAT GTC CGA TTA GA
<i>Drd2</i>	TATCATTGCCAACCCCTGCCTTCGTG	TCGGCTGCTACGCTTGGTGTTGAC
<i>Erp29</i>	CCTTCCCTTGGACACAGTCACT	GTCGAACTTCACCAAGACGAACTT
<i>Gfap</i>	ACGACTATCGCCGCAACT	GCCGCTCTAGGGACTCGTTC
<i>Jak2</i>	GTCTTGGGATGGCGGTGTTAG	ATTGCTGAATGAATCTGCGAAATCT
<i>Ppia</i>	ATGGCAAATGCTGGACAAA	GCCTTCTTTCACCTTCCAAA
<i>Ppp1r1b</i>	TCGGAGGAAGAGGATGAGTT	GGGGCTGGGATGCTGAGGTT
<i>Rpl13a</i>	CTGAAGCCTACCAGAAAGTTTGC	GGTACTTCCACCCGACCTCAT
<i>Serpina3n</i>	CAACCTTACAGGCCAACCCAT	GGGCACCAAGTAGTCCTAGATGCT
<i>Vimentin</i>	TCGAGGTGGAGCGGGACAAC	TGCAGGGTGCTTTCGGCTTC

Résultats et discussion complémentaires de l'article 1

La microglie est également un partenaire important dans le contrôle de l'homéostasie du SNC et devient réactive au cours des MND. L'inhibition de la réactivité astrocytaire par SOCS3 diminue également la réactivité microgliale présente dans le modèle LV_N-mHtt (Ben Haim et al., 2015a). Dans une étude préliminaire, nous avons analysé l'effet de l'activation des astrocytes par JAK2ca sur certains marqueurs et certaines fonctions de la microglie dans le modèle Hdh140.

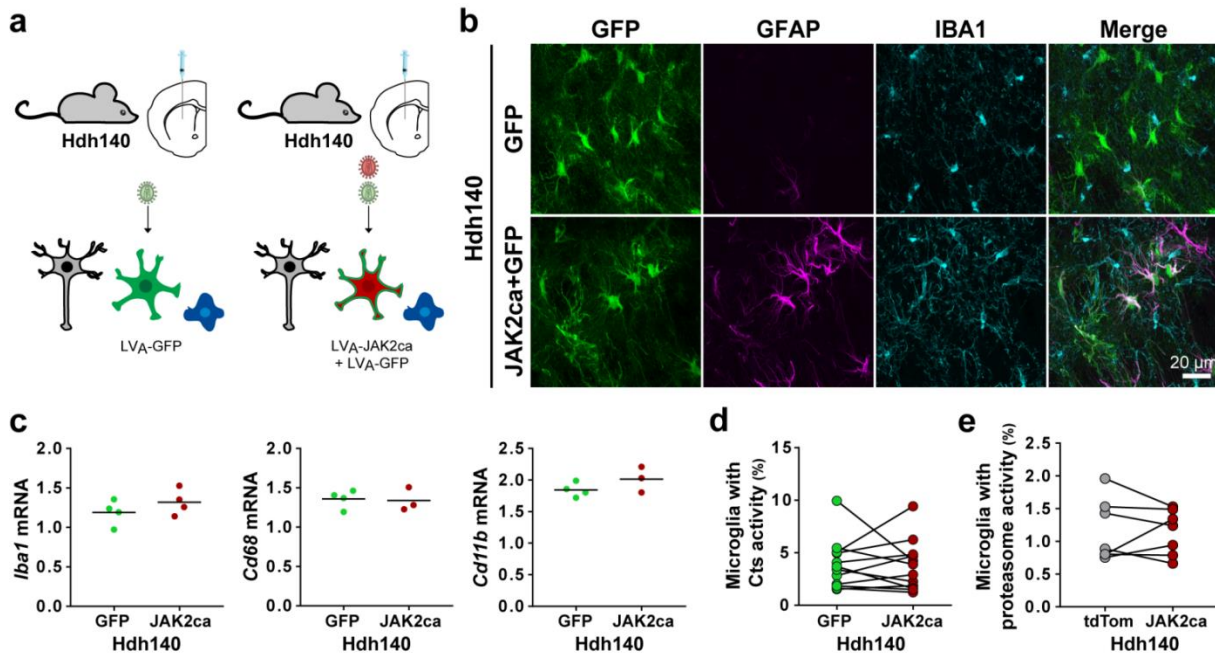


Figure 32- Impact de la réactivité astrocytaire sur les cellules microgliales dans le modèle Hdh140. a. Des souris Hdh140 âgées de 7-9 mois ont été injectées dans le striatum avec LV_A-JAK2ca + LV_A-GFP ou avec LV_A-GFP (contrôle) et analysées en post-mortem 4 mois plus tard. b. Immunomarquage des astrocytes infectés (GFP, vert), de la GFAP (magenta) et IBA1 (cyan) sur des coupes de striatum. c. Quantification de l'expression de marqueurs microgliaux par qRT-PCR. d-e. Les cellules du striatum de souris Hdh140 ont été dissociées et incubées avec une sonde mesurant l'activité des cathepsines (Cts, d) ou des sous-unités catalytiques du protéasome (e). La fluorescence de chaque sonde a été mesurée dans les astrocytes GFP⁺ (d) ou TdTomato⁺ (e).

Dans les souris Hdh140, l'activation des astrocytes réactifs par JAK2ca ne semble pas induire de changements morphologiques majeurs et ne modifie pas l'expression de certains marqueurs (*Iba1*, *Cd68* et *Cd11b*) de la microglie (Figure 32b et c). Dans la MH, chez les patients et les modèles murins, très peu d'agrégats de mHtt sont présents dans la microglie, ce qui pourrait s'expliquer notamment par une protéolyse très efficace dans ces cellules (Jansen et al., 2017). Nous avons mesuré les capacités protéolytiques de la microglie dans les souris Hdh140 injectées avec un AAV-JAK2ca mais l'activité des cathepsines et du protéasome dans la microglie n'est pas modifiée par la réactivité astrocytaire (Figure 32d et e). De plus, le pourcentage de cellules microgliales ayant une activité de la sonde cathepsine (3.5%) est assez faible. Ce résultat est surprenant puisqu'une activité élevée des cathepsines est souvent décrite dans la microglie en condition pathologique. Une augmentation de la cathepsine S, qui est reconnue par la sonde utilisée, est par exemple observée dans la microglie de souris modèle de la sclérose en plaque amyotrophique (SLA) (Wendt et al.,

2008). Cependant, notre sonde cathepsine est majoritairement utilisée dans le contexte des tumeurs au cours duquel de très forts changements d'activité interviennent. Cette sonde n'est alors peut-être sensible qu'à des activités très élevées des cathepsines.

Le pourcentage de microglie ayant une activité catalytique du protéasome est également très faible. Ce résultat peut s'expliquer par le marqueur fluorescent utilisé (CD45-PE-Cy5) qui n'était pas optimal pour la configuration du cytomètre en flux que nous avons utilisée et qui ne nous a pas permis d'identifier correctement la population microgliale. Dans le contexte de la MA, la même sonde dépendante de l'activité catalytique du protéasome a été utilisée sur des cultures primaires d'astrocytes et de microglie (Orre et al., 2013). Cette étude montre que l'exposition à des fibrilles d'amyloïde β augmente fortement l'activité du protéasome dans les microglies marquées par CD11b et plus faiblement celle dans les astrocytes. De plus, l'expression des sous-unités catalytiques de l'immunoprotéasome est augmentée dans les microglies et les astrocytes réactifs autour des plaques amyloïdes dans des souris modèles de la MA (Orre et al., 2013). Il serait donc intéressant de refaire l'expérience de mesure de l'activité du protéasome dans le contexte de la MH en utilisant un marqueur de la microglie plus adapté.

Dans notre étude, nous n'avons pas mis en évidence de modulation de l'activité protéolytique de la microglie lorsque la réactivité astrocytaire est induite par JAK2ca dans les souris Hdh140. La microglie a une activité de phagocytose importante dans le SNC qui est impactée par son état de réactivité. Dans le contexte de la MA, la phagocytose d'A β par la microglie a été mesurée par cytométrie en flux et par immunomarquage dans des souris APP/PS1dE9 mais n'est pas impactée par l'inhibition de la réactivité astrocytaire par SOCS3 (**Article 2**, Annexe 1).

La microglie est un partenaire important des astrocytes au cours de la neuroinflammation. Dans notre étude préliminaire, nous avons étudié seulement certains marqueurs ou fonctions spécifiques de la microglie. De plus, certaines expériences doivent être reproduites (activité du protéasome). Il serait intéressant d'étudier plus en détail l'impact de la réactivité astrocytaire sur les fonctions microgliales au cours de la MH en étudiant par exemple l'expression de cytokines et chemokines inflammatoires, qui leur permettent notamment de communiquer avec les astrocytes.

DISCUSSION

I. Modulation de la réactivité dans les MND

1. JAK2-STAT3 est nécessaire et suffisante pour l'induction de la réactivité astrocytaire

Dans les MND, les astrocytes deviennent réactifs mais leur implication dans l'évolution de la pathologie est encore mal comprise. Afin d'étudier le rôle de cette réactivité astrocytaire, il est nécessaire de pouvoir la moduler *in vivo*. Les stratégies initialement développées pour interférer avec la réactivité astrocytaire étaient basées sur l'invalidation des filaments intermédiaires GFAP et vimentine (Menet et al., 2001), mais ceci altère profondément le fonctionnement des astrocytes (Shibuki et al., 1996). Des souris transgéniques permettant l'ablation des astrocytes réactifs proliférants ont également été générées (Bush et al., 1999), mais la prolifération des astrocytes réactifs est marginale au cours des MND (Lepore et al., 2008). Il est donc essentiel de trouver un outil plus sélectif et pertinent pour moduler la réactivité astrocytaire dans le contexte des MND.

Plusieurs voies de signalisation cellulaire sont activées dans les astrocytes réactifs mais leur implication dans le contrôle de la réactivité astrocytaire *in vivo* n'a pas été directement démontrée (Ben Haim et al., 2015b). Parmi ces voies de signalisation, notre équipe s'est intéressée à la voie JAK2-STAT3 et a montré que le facteur de transcription STAT3 est activé dans plusieurs espèces et modèles de la MA, de la MH et même dans d'autres MND (Tauopathies, maladie de Parkinson ; données non publiées), alors que la voie NFκB ne semble pas activée ou seulement secondairement (Ben Haim et al., 2015a; Cunningham et al., 2018)(**Article 2**, Annexe 1). Notre équipe a donc développé des vecteurs viraux ciblant la voie JAK2-STAT3 spécifiquement dans les astrocytes, qui surexpriment l'inhibiteur de la voie, SOCS3, ou une forme constitutivement active de la kinase activatrice de la voie, JAK2ca.

Nous avons contrôlé la spécificité de l'action de SOCS3 sur la voie JAK2-STAT3. La voie des MAPK/ERK (extracellular signal-regulated kinase) ainsi que STAT1, un autre membre de la famille des STATs impliqué dans l'inflammation, ne sont pas activés dans le modèle APP/PS1dE9 de la MA et ne sont pas inhibés par la surexpression de SOCS3 (**Article 2**, Annexe 1)

L'expression de SOCS3 par ces vecteurs viraux diminue les marqueurs morphologiques caractéristiques de la réactivité astrocytaire (hypertrophie du soma et des prolongements et surexpression de la GFAP et la vimentine) dans l'hippocampe de modèles de la MA et dans le striatum de modèles de la MH (Ben Haim et al., 2015a)(**Articles 1 et 2**). SOCS3 réduit également le niveau transcriptionnel de la *Gfap*, de la *Vimentine*, et de *Serpina3n*, un autre marqueur de réactivité astrocytaire, dans ces modèles. Le vecteur viral codant *Socs3* apparaît donc comme un outil universel et efficace pour bloquer la réactivité astrocytaire *in situ*. De plus, SOCS3 est également capable de réverser la réactivité astrocytaire installée dans des souris âgées modèles de la MA (**Article 2**, Annexe 1). Dans la MH, l'effet de SOCS3 a également été étudié dans les souris Hdh140 à 12 et 18 mois mais la réactivité dans ce modèle est trop faible à l'état basal pour pouvoir mettre en évidence un effet inhibiteur significatif de SOCS3 (données non montrées). Une étude pilote a été réalisée, par une

ancienne doctorante de l'équipe, sur le modèle transgénique N171-82Q de la MH âgé de 6 à 8 semaines. Comme dans les souris Hdh140, la réactivité astrocytaire est trop faible dans les souris N171-82Q pour voir l'inhibition par SOCS3 (données de thèse de Lucile Ben Haim).

L'ensemble de ces résultats nous montre que la voie JAK2-STAT3 est nécessaire pour induire et maintenir la réactivité astrocytaire dans plusieurs modèles de MND. A l'inverse, la surexpression de JAK2ca est suffisante pour induire la réactivité astrocytaire dans l'hippocampe et le striatum de souris sauvages, en dehors de tout contexte pathologique (**Articles 1 et 2**). JAK2ca est également capable d'activer ou de suractiver les astrocytes réactifs dans des modèles de la MA (APP/PS1dE9 et 3xTg) et de la MH (Hdh140 et N171-82Q) (**Articles 1 et 2**).

La voie JAK2-STAT3 est donc nécessaire et suffisante pour l'induction de la réactivité astrocytaire et apparait comme une voie centrale dans le contrôle de cette réactivité *in vivo*.

2. Caractérisation moléculaire de la réactivité

La réactivité astrocytaire est généralement caractérisée par des changements morphologiques bien décrits comme l'hypertrophie du soma et des prolongements astrocytaires et la surexpression des filaments intermédiaires tels que la GFAP et la Vimentine. Nous avons montré que SOCS3 diminue la réactivité astrocytaire en prévenant ces changements morphologiques caractéristiques. Dans l'article 2, l'analyse transcriptomique d'astrocytes, dans le contexte de la MA, nous a permis de caractériser l'effet de SOCS3 à l'échelle du génome. En plus de diminuer l'expression de marqueurs exprimés par la majorité des astrocytes réactifs (*Gfap*, *Vimentine*), SOCS3 impacte également l'expression de marqueurs plus spécifiques de sous-populations d'astrocytes réactifs récemment décrits, en réduisant à la fois les marqueurs A1 (*Serping1*, *H2-D1*, *Srgn*) et les marqueurs A2 (*Tm4sf1*, *Cd14*) (Zamanian et al., 2012; Liddelow et al., 2017). SOCS3 semble donc opérer une inhibition globale de la réactivité astrocytaire et non spécifique à une sous-classe d'astrocytes réactifs (**Article 2**, Annexe 1).

Cette analyse transcriptomique nous a également permis de mettre en évidence une diminution plus générale de l'inflammation dans les astrocytes par SOCS3. En effet, SOCS3 inhibe l'expression de cytokines, de chimiokines et de facteurs de la voie du complément induits dans les astrocytes réactifs.

SOCS3 inhibe donc globalement l'inflammation dans les astrocytes réactifs et prévient à la fois les marqueurs morphologiques et moléculaires de la réactivité. Il est maintenant nécessaire de caractériser fonctionnellement cette réactivité astrocytaire en la modulant *in vivo*, grâce aux vecteurs viraux développés ciblant la voie JAK2-STAT3, dans des conditions pathologiques comme la MA (**Article 2**, Annexe 1) et la MH (**Article 1**) ou plus généralement hors contexte pathologique en induisant la réactivité astrocytaire dans des souris sauvages.

3. L'utilisation de vecteurs viraux

L'utilisation des vecteurs viraux nous permet d'étudier spécifiquement la réactivité astrocytaire dans différents modèles de MND disponibles au laboratoire. La réactivité astrocytaire s'accompagne souvent de la réactivité microgliale. Les vecteurs viraux nous permettent de cibler les astrocytes et ainsi d'étudier sélectivement les mécanismes liés à la réactivité astrocytaire. Les vecteurs viraux nous permettent également de contrôler localement et temporellement la réactivité astrocytaire. STAT3, via la voie JAK2-STAT3, est impliqué dans de nombreux processus cellulaires tels que l'inflammation et la prolifération cellulaire (**Article 3**, Annexe 2). STAT3 a également plusieurs fonctions non canoniques, c'est-à-dire indépendantes de l'activation de la transcription de gènes cibles ou de sa phosphorylation par JAK. L'inhibition globale de STAT3, par un inhibiteur pharmacologique ou par délétion (KO, Knock-out) totale, pourrait donc avoir des effets périphériques majeurs. Il est possible d'injecter localement dans le cerveau l'inhibiteur pharmacologique afin d'éviter ces effets périphériques. Cependant, ces stratégies ne ciblent pas les astrocytes et inhibent l'expression de STAT3 dans tous les types cellulaires. Il existe, néanmoins, des souris KO conditionnelles limitant la délétion de STAT3 dans les astrocytes (par exemple Cx43-CreERT2 x STAT3 lox/lox (Reichenbach et al., 2019) ou GFAP-Cre x STAT3 lox/lox (Faulkner et al., 2004)), mais ces délétions affectent probablement aussi les fonctions non canoniques de STAT3. Contrairement aux stratégies de délétion ou d'inhibition pharmacologique, notre stratégie nous permet de cibler spécifiquement la voie canonique JAK2-STAT3 dans les astrocytes de souris adultes et donc d'éviter des effets périphériques et développementaux. La voie JAK2-STAT3 interagit avec d'autres voies de signalisation cellulaire comme les voies NFκB et MAPK (Ben Haim et al., 2015b). Même si nous avons vérifié l'absence d'implication de ces voies dans nos modèles (pERK, STAT1), nous ne pouvons pas complètement écarter l'effet de la surexpression de JAK2ca ou de SOCS3 sur d'autres voies de signalisation cellulaire.

Dans nos études, nous avons utilisé différents types de vecteurs viraux (LV et AAV) dans différentes régions cérébrales et dans différents modèles de MND, et nous reproduisons à chaque fois l'activation par JAK2ca ou l'inhibition par SOCS3 de la réactivité astrocytaire. Notre équipe a d'abord développé des vecteurs LV qui permettent une expression forte et stable du transgène dans les cellules infectées. De plus, le modèle viral de la MH que nous utilisons dans nos études est basé sur l'injection dans les neurones de vecteurs LV codant un fragment de la mHtt (de Almeida et al., 2002). Les vecteurs LV nous permettent donc de moduler la réactivité dans ce modèle. Notre équipe a ensuite développé des vecteurs AAV pour avoir une meilleure efficacité d'infection, particulièrement dans l'hippocampe dans lequel les astrocytes sont peu transduits par les LV. Les AAV, plus petits que les LV, diffusent mieux dans le parenchyme cérébral. C'est pourquoi nous avons utilisé les vecteurs AAV dans le striatum lors des expériences de tri cellulaire afin de collecter plus d'astrocytes infectés et avoir assez de matériel pour effectuer les analyses transcriptomiques ou biochimiques en aval.

Les vecteurs viraux sont donc des outils versatiles permettant de cibler un type cellulaire particulier. Grâce à ces outils, nous étudions l'impact de la réactivité astrocytaire dans les MND mais les vecteurs viraux peuvent eux-mêmes provoquer une réponse inflammatoire. Les dernières générations des vecteurs LV et AAV sont moins inflammatoires que d'autres vecteurs comme les vecteurs adénoviraux (Serguera and Bemelmans, 2014). De plus, notre équipe a effectué des expériences de dose-réponse afin de déterminer la dose pour laquelle l'injection de vecteurs viraux n'induit pas de réactions inflammatoires.

II. Les astrocytes réactifs diminuent l'agrégation de la mHtt

Afin d'étudier l'impact de la réactivité astrocytaire dans la MH, nous utilisons deux modèles murins complémentaires. Le modèle LV exprimant un fragment de la mHtt dans les neurones (LV_N-mHtt) est un modèle aigu et rapide de la MH caractérisé par une perte neuronale et des agrégats de mHtt neuronaux. Ce modèle présente une forte réactivité astrocytaire que nous inhibons efficacement grâce au vecteur viral codant *Socs3* (Ben Haim et al., 2015a)(**Article 1**). Nous utilisons également un modèle plus progressif de la maladie, le modèle Hdh140, dont la génétique et la progression de la pathologie sont plus proches de la MH chez les patients (Menalled et al., 2003). Ces souris présentent des anomalies transcriptionnelles et de petits agrégats neuronaux dans le striatum. Nous augmentons la faible réactivité astrocytaire présente dans ce modèle grâce au vecteur codant *Jak2ca*. La modulation de la réactivité astrocytaire dans ces deux modèles nous permet d'étudier l'impact des astrocytes réactifs sur l'agrégation de la mHtt, une caractéristique majeure de la MH (voir paragraphe III.1.b de l'introduction).

1. Diminution de l'agrégation

Notre équipe a mis en évidence une augmentation de l'agrégation de la mHtt lorsque les astrocytes réactifs sont inhibés dans le modèle LV_N-mHtt (Ben Haim et al., 2015a). Nous avons confirmé ce résultat sur une cohorte différente de souris en utilisant plusieurs marquages d'agrégats de mHtt (EM48 et Ubiquitine). De plus, nous avons montré que l'inhibition des astrocytes réactifs par SOCS3 augmentait également la taille de ces agrégats de mHtt. A l'inverse, les astrocytes réactifs dans les souris Hdh140 diminuent le nombre et la taille des agrégats de mHtt. Nous avons également observé que JAK2ca tend à diminuer le nombre d'agrégats dans un autre modèle de la MH, les souris N171-82Q, mais le faible nombre d'animaux et la variabilité inter-individuelle ne nous permet pas de détecter des différences significatives (données non montrées). Nous avons donc mis en évidence un effet miroir de la modulation de la réactivité astrocytaire sur l'agrégation de la mHtt dans différents modèles de la MH.

Les agrégats de mHtt sont majoritairement observés dans les neurones. L'effet de la réactivité astrocytaire sur l'agrégation de la mHtt implique donc un dialogue entre les neurones et les astrocytes. Cette diminution de l'agrégation de la mHtt par les astrocytes réactifs peut s'expliquer par différents mécanismes :

1/ une diminution de l'expression de la mHtt lorsque les astrocytes sont réactifs. Nous avons vérifié les niveaux d'ARNm de la Htt murine endogène et de la mHtt qui ne sont pas impactés par la modulation de la réactivité astrocytaire (données non montrées).

2/ une diminution de la concentration ou de l'agrégation de la protéine mHtt qui se traduiraient par une diminution ou une augmentation de la forme soluble de la mHtt respectivement. Nous avons mesuré la forme Triton X-100 (Tx)-soluble et SDS-soluble de la mHtt par des techniques de fractionnement biochimique couplé à des western blots. JAK2ca ne semble pas modifier le taux de mHtt Tx-soluble, mais tend à diminuer les formes plus agrégées dans la fraction SDS-soluble (données non montrées). Cependant, il est difficile d'établir exactement quelles formes de la mHtt sont présentes dans les différentes fractions Tx et SDS solubles. La fraction Tx-soluble contient majoritairement les formes monomériques de la mHtt alors que la fraction SDS-soluble contient plutôt les espèces oligomériques et agrégées (O'Rourke et al., 2013). Nos résultats indiquent donc que les formes les plus solubles de la mHtt ne sont pas impactées par la réactivité astrocytaire. En microscopie optique, nous n'observons que les plus gros agrégats de mHtt. Il faudrait utiliser des techniques plus avancées afin de visualiser les formes intermédiaires de la mHtt dans nos modèles, comme la microscopie électronique en transmission ou la microscopie à force atomique (Poirier et al., 2002; Sathasivam et al., 2010; Sahoo et al., 2016). Il existe également des anticorps reconnaissant spécifiquement certaines conformations comme les oligomères pré-fibrillaires (A11), les protofibrilles annulaires (APF) ou les formes fibrillaires (OC) mais cela indépendamment de la protéine (Sontag et al., 2012). Ramdzan et collaborateurs ont aussi développé *in vitro* des biosenseurs sensibles à la conformation de la mHtt par cytométrie en flux, mais il semble assez difficile pour le moment d'utiliser cette méthode *in vivo* sur des cellules dissociées à partir de cerveaux de souris puisque cette méthode nécessite l'introduction d'un motif tétracystéine dans la mHtt (Ramdzan et al., 2010). Une autre équipe a développé une technique de chromatographie par exclusion de taille suivie d'un immunomarquage en TR-FRET (Time-resolved Fluorescence Resonance Energy Transfer) afin de séparer la mHtt monomérique soluble, les oligomères solubles composés de fragments de mHtt et les agrégats insoluble de mHtt à partir d'homogénats de cerveaux. Cette équipe a montré que les oligomères solubles étaient inversement corrélés aux agrégats de mHtt dans les souris Hdh150 (Marcellin et al., 2012). De plus, dans notre étude, la mesure des formes Tx et SDS-solubles de la mHtt a été effectuée sur un homogénat total de striatum de souris Hdh140, ce qui ne nous permet pas d'avoir le niveau de mHtt dans chaque type cellulaire, et particulièrement le niveau dans les astrocytes.

L'ensemble de ces résultats semblent donc montrer une modulation préférentielle de la forme agrégée de la mHtt par les astrocytes réactifs.

3/ une augmentation de la dégradation des agrégats de mHtt (**Figure 33**). Une étude transcriptomique effectuée par l'équipe a montré un enrichissement des gènes liés aux systèmes de protéolyse (UPS et autophagie-lysosome) dans les astrocytes réactifs, ce qui suggère une augmentation des capacités de dégradation des astrocytes réactifs (voir paragraphe II.2, ci-dessous). La mHtt agrégée pourrait alors être transportée des neurones jusqu'aux astrocytes réactifs où elle serait efficacement dégradée.

4/ une modulation de l'agrégation de la mHtt par des protéines anti-agrégantes (**Figure 33**). L'analyse transcriptomique révèle également un enrichissement des protéines chaperonnes dans les astrocytes réactifs. Comme précédemment décrit dans le paragraphe III de l'introduction, les chaperonnes peuvent prévenir l'agrégation des protéines et peuvent être libérées dans le milieu extracellulaire via des exosomes par exemple. Les astrocytes réactifs pourraient alors sécréter des protéines chaperonnes qui modèleraient l'agrégation de la mHtt une fois dans les neurones (voir paragraphe II.3, ci-dessous). Ces chaperonnes pourraient modifier la conformation de la mHtt agrégée afin d'atteindre une conformation « moins toxique » ou pourraient entraîner la dégradation de la mHtt par les systèmes de protéolyse de la cellule (UPS, autophagie-lysosome et CMA).

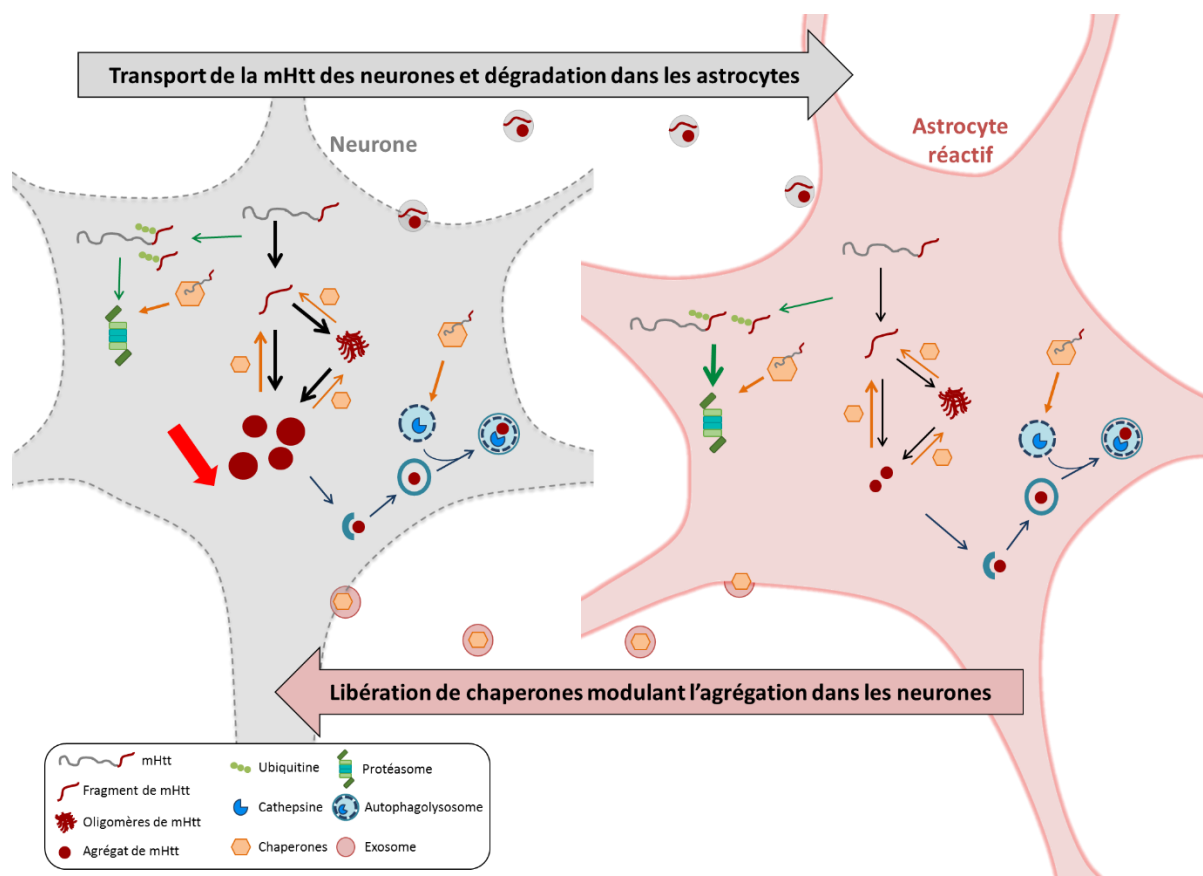


Figure 33- Hypothèses de travail : un dialogue entre les astrocytes réactifs et les neurones pour réduire l'agrégation de la mHtt. Les astrocytes réactifs diminuent les agrégats de mHtt majoritairement présents dans les neurones. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer l'impact des astrocytes réactifs sur l'agrégation de la mHtt dans les neurones. Il est possible que la mHtt soit transportée des neurones jusqu'aux astrocytes réactifs où elle serait dégradée plus efficacement par les systèmes de protéolyse : UPS (vert) et autophagie-lysosome (bleu). Les astrocytes réactifs pourraient également libérer des protéines anti-agrégantes comme les chaperonnes (orange) qui, une fois dans les neurones, pourraient réduire l'agrégation de la mHtt.

2. Les systèmes de protéolyse dans les astrocytes réactifs

L'analyse transcriptomique par microarray sur les astrocytes réactifs hors contexte pathologique a révélé un enrichissement des gènes appartenant aux deux voies majeures de protéolyse cellulaire. Nous avons donc étudié ces systèmes de dégradation dans le contexte de la MH.

L'analyse microarray montre majoritairement une surexpression des gènes impliqués dans le système autophagie-lysosome, et particulièrement des gènes liés au lysosome, dans les astrocytes réactifs. Le terme lysosome est notamment enrichi dans les analyses par Gene Ontology (GO) et STRING. Parmi ces gènes, nous retrouvons notamment les protéases lysosomales, cathepsines C et S, qui sont aussi liées à la neuroinflammation (voir paragraphe III.3.a de l'introduction). L'expression de ces cathepsines est augmentée lorsque la réactivité astrocytaire est induite par JAK2ca dans les souris Hdh140. Au contraire, l'inhibition des astrocytes réactifs par SOCS3 diminue l'expression de ces cathepsines dans le modèle LV_N-mHtt. La surexpression des gènes de cathepsines s'accompagne d'une augmentation de leur activité dans les astrocytes réactifs de souris Hdh140 injectées avec un AAV-JAK2ca. La sonde cathepsine utilisée reconnaît notamment la cathepsine L qui est connue pour dégrader les protéines contenant une queue polyQ comme la mHtt (Bhutani et al., 2012; Verdoes et al., 2013). Les astrocytes réactifs ont donc une capacité accrue de dégradation par le lysosome au cours de la MH. Il serait maintenant intéressant d'étudier le flux autophagique et particulièrement la formation des autophagosomes dans les astrocytes réactifs. En effet, une altération de la reconnaissance du substrat à dégrader par autophagie et la présence d'autophagosomes vides ont été décrites dans la MH (voir paragraphe III.3.b de l'introduction) (Martinez-Vicente et al., 2010). La microscopie électronique nous permettrait, par exemple, de visualiser les autophagosomes et leur contenu. Nous pourrions également mesurer par western blot à partir d'astrocytes triés ou par marquage histologique, l'accumulation de marqueurs d'autophagosomes, comme LC3-II, corrélée à leur formation et au flux autophagique (Kabeya et al., 2000; Ravikumar et al., 2010).

Nous nous sommes également intéressés à l'autre grande voie de protéolyse cellulaire, l'UPS. Nous avons montré une augmentation de l'activité des sous-unités catalytiques du protéasome dans les astrocytes réactifs induits par JAK2ca dans les souris Hdh140. De plus, cette activité est aussi augmentée dans les astrocytes réactifs de souris contrôles (données non montrées). Cependant, nous n'observons pas de différences entre les souris contrôles et les souris Hdh140. Une étude de l'activité du protéasome utilisant la même sonde fluorescente dans des souris R6/2 confirme que l'activité du protéasome n'est pas altérée dans la MH (Schipper-Krom et al., 2014). Cette étude a également montré que le protéasome était toujours actif au niveau des agrégats de mHtt. Dans la littérature, l'altération du protéasome au cours de la MH est controversé (voir paragraphe III.2.b de l'introduction). Une des hypothèses est que l'ensemble des systèmes de protéostasie sont altérés dans la MH et entraîne une augmentation du nombre de substrats ubiquitinylés à dégrader, ce qui créerait un « embouteillage » au niveau du protéasome. L'activité catalytique du protéasome ne serait néanmoins pas altérée. Cependant, l'augmentation de l'activité du protéasome dans les astrocytes réactifs permettrait de fluidifier la dégradation des protéines ubiquitinyllées et ainsi de restaurer l'homéostasie des protéines cellulaires.

Le protéasome est strictement lié au bon adressage des protéines par ubiquitination. Nous avons mesuré par western blot le niveau d'ubiquitination dans des homogénats totaux de striatum et nous n'avons pas observé de changements entre les souris contrôles et les souris Hdh140, ni d'effet de l'induction de la réactivité astrocytaire par JAK2ca. Dans l'analyse microarray sur des astrocytes, les gènes différentiellement exprimés sont principalement liés à l'ubiquitination (enzymes de ligation E2 et de conjugaison E3) et aux sous-unités régulatrices du protéasome. Ces gènes sont majoritairement diminués dans les astrocytes réactifs, ce qui ne corrèle pas avec le niveau d'ubiquitination inchangé et l'augmentation de l'activité des sous-unités catalytiques mesurés dans les souris contrôles et Hdh140 de notre étude. La diminution d'expression est peut-être spécifique à certaines enzymes et sous-unités régulatrices et non généralisée aux systèmes d'ubiquitination et de protéasome dans leur ensemble. Les astrocytes réactifs pourraient également favoriser seulement certaines enzymes et sous-unités du protéasome spécifiques et suffisantes pour le bon fonctionnement de la cellule afin d'économiser les dépenses énergétiques. En effet, le système UPS consomme de l'ATP pour fonctionner. Il serait cependant intéressant de vérifier l'activité des enzymes d'ubiquitination en utilisant des sondes spécifiques cette fois du système d'ubiquitine (sonde UbDha ; UbiQ Bio) (Mulder et al., 2016; Hewings et al., 2017). Nous pourrions également mesurer l'ubiquitination spécifiquement de la mHtt par des expériences d'immunoprécipitation et de western blot à partir d'homogénats totaux ou d'astrocytes triés de souris MH.

Nous avons donc montré que l'activité des deux systèmes de protéolyse cellulaire est augmentée dans les astrocytes réactifs dans le contexte de la MH (**Figure 34**). Ces résultats sont en accord avec l'étude de Jansen et collaborateurs qui montrent un plus faible nombre d'agrégats de mHtt dans les astrocytes réactifs par rapport aux astrocytes non réactifs, suggérant alors une meilleure dégradation de la mHtt dans les astrocytes réactifs (Jansen et al., 2017). Dans nos modèles, les agrégats sont présents en très grande majorité dans les neurones, il est donc difficile d'évaluer l'impact de la réactivité astrocytaire sur l'agrégation de la mHtt dans les astrocytes. Nous avons donc surexprimé la mHtt par vecteurs LV directement dans les astrocytes (LV_A-mHtt), ce qui nous a permis d'étudier l'activité anti-agrégante intrinsèque des astrocytes. Les agrégats de mHtt qui se forment dans les astrocytes sont plus petits que ceux dans les neurones, comme décrit dans la littérature dans le cerveau de souris et de patients de la MH (Shin et al., 2005; Meunier et al., 2016; Jansen et al., 2017). Cette différence entre les neurones et les astrocytes peut s'expliquer par une différence au niveau de la synthèse et/ou de la dégradation de la mHtt entre les deux types cellulaires. L'expression de la Htt est relativement proche dans les neurones et les astrocytes chez la souris et l'Homme (voir paragraphe I.4.a.i de l'introduction, banque RNAseq du laboratoire de Ben Barres). Cependant, la Htt fait l'objet d'importantes modifications post-traductionnelles pouvant modifier son expression et sa localisation. Le nombre et la taille plus faibles des agrégats dans les astrocytes peuvent s'expliquer par une meilleure capacité de dégradation, notamment par le protéasome, dans les astrocytes (Tydlacka et al., 2008). Dans notre expérience de cytométrie en flux, l'intensité de fluorescence de la sonde des sous-unités catalytiques du protéasome, corrélée à leur activité, est plus élevée dans les astrocytes que dans la population non marquée appelée population négative (données non montrées). Cette population négative est majoritairement composée de neurones et

de précurseurs d'oligodendrocytes (OPC) (les astrocytes GFP+, la microglie CD45+ ont été triés à part et les oligodendrocytes ont été déplétés lors de l'étape de « myelin removal »). L'activité catalytique du protéasome est plus importante dans les astrocytes que dans cette population négative, ce qui est en accord avec une capacité de dégradation plus efficace dans les astrocytes (Tydlacka et al., 2008). De plus, l'inhibition de la réactivité astrocytaire par SOCS3 augmente le nombre d'astrocytes avec un agrégat de mHtt et la taille de ces agrégats astrocytaires, ce qui confirme une activité de protéolyse augmentée dans les astrocytes réactifs.

3. Les protéines chaperonnes

L'analyse transcriptomique par microarray révèle également une augmentation des gènes codant les protéines chaperonnes, comme la co-chaperonne DNAJB1, dans les astrocytes réactifs. Une autre étude transcriptomique, réalisée par notre équipe et publiée dans l'article 2 sur des astrocytes dans le contexte de la MA, montre qu'au contraire SOCS3 diminue l'expression de *Dnajb1* (**Article 2**, Annexe 1). Nous nous sommes donc intéressés particulièrement à cette co-chaperonne modulée par la réactivité astrocytaire et nous l'avons étudiée dans le contexte de la MH. Plusieurs études ont montré que l'expression et la réponse « anti-stress » des chaperonnes sont diminuées au cours de la MH. Dans notre étude, le niveau protéique de DNAJB1/Hsp40 tend à être réduit dans les souris Hdh140 par rapport aux souris contrôles (données non montrées). Lorsque la réactivité astrocytaire est induite par JAK2ca, le niveau d'ARNm et le niveau protéique mesuré par immunofluorescence de DNAJB1/Hsp40 tendent à être augmentés dans le striatum de souris Hdh140 (données non montrées). Le faible nombre d'animaux et la variabilité inter-individuelle entre les animaux limite la puissance statistique et donc la capacité à détecter des différences significatives entre les groupes. Cette tendance est confirmée au niveau protéique par western blot où l'augmentation de DNAJB1/Hsp40 est significative avec JAK2ca. La combinaison des différentes techniques utilisées montrant toujours la même tendance conforte nos résultats. De plus, à l'inverse, l'inhibition des astrocytes réactifs par SOCS3 diminue significativement le niveau transcriptionnel de *Dnajb1*. Des expériences sont en cours pour vérifier l'expression de DNAJB1/Hsp40 dans le cerveau de patients MH par des immunomarquages sur coupes. Des co-marquages nous permettront de mesurer son niveau protéique dans les différents types cellulaires.

Les astrocytes réactifs pourraient alors libérer des protéines chaperonnes dans le milieu extracellulaire afin qu'elles modulent l'agrégation de la mHtt dans les neurones. En effet, plusieurs études ont montré que les chaperonnes et notamment la co-chaperonne DNAJB1/Hsp40 pouvaient être libérées via des exosomes et inhiber l'agrégation dans la cellule réceptrice (Takeuchi et al., 2015; Takeuchi, 2018). De façon intéressante, l'analyse DAVID-GO (par composant cellulaire) des gènes différentiellement exprimés dans les astrocytes réactifs révèle un fort enrichissement du terme « exosome ». Ce terme est également enrichi dans le protéome des souris R6/2 (Skotte et al., 2018). Nous avons donc analysé l'expression de DNAJB1/Hsp40 dans la fraction exosomale isolée à partir du striatum de souris Hdh140. Hsp40 est enrichie dans les exosomes de ces souris lorsque les astrocytes sont réactifs (**Figure 34**). Dans notre expérience de western blot, la bande correspondant à Hsp40 est à un poids plus bas que 40 kDa dans la fraction exosomale, cela pourrait être dû à un clivage de la

protéine spécifique dans les exosomes. Les exosomes isolés peuvent être sécrétés à partir de tous les types cellulaires du tissu. Pour étudier plus spécifiquement les exosomes libérés par les astrocytes, il faudrait effectuer des études *in vitro* sur les exosomes présents dans le milieu de cultures d'astrocytes. Cependant, les astrocytes en culture présentent un phénotype réactif déjà à l'état basal. De plus, l'absence des autres types cellulaires et des échanges inter-cellulaires peuvent perturber le fonctionnement des astrocytes. L'étude de l'impact de la réactivité astrocytaire *in vitro* paraît donc peu adaptée pour le moment, avec les techniques actuellement disponibles.

Une étude chez les souris R6/2 a montré que la surexpression de DNAJB1 dans les neurones du striatum via l'injection d'un vecteur AAV diminue l'agrégation de mHtt et améliore le phénotype moteur des souris (Popiel et al., 2012). Dans notre étude, nous avons surexprimé DNAJB1 dans les astrocytes du striatum des souris LV_N-mHtt. L'expression de DNAJB1 prévient l'augmentation par SOCS3 des agrégats de mHtt, de la lésion neuronale et des défauts transcriptionnels. Au contraire, l'expression d'un mutant dominant de DNAJB1 (DNAJB1-DN) empêche la diminution des agrégats de mHtt dans les souris Hdh140 par JAK2ca. Ces résultats confirment donc l'implication de DNAJB1 dans la diminution de l'agrégation de la mHtt par les astrocytes réactifs au cours de la MH (**Figure 34**). Il faudrait désormais étudier la localisation des agrégats de mHtt par des co-immunomarquages afin de savoir si la protéine DNAJB1 astrocytaire agit sur les agrégats neuronaux, astrocytaires ou sur les deux à la fois. Le mutant DN, qui ne contient plus que le domaine J de la protéine, perd son activité de co-chaperonne, et empêche la protéine endogène d'interagir avec Hsp70 et de stimuler son activité ATPase (Michels et al., 1999). A plus long terme, il serait donc intéressant d'évaluer l'implication de Hsp70 dans l'effet de DNAJB1 sur l'agrégation de la mHtt. Pour cela, nous pourrions exprimer un mutant de Hsp70 délété de son activité ATPase (Hsp70(K71E)) dans les astrocytes ou dans les neurones. En effet, DNAJB1 pourrait interagir avec Hsp70 directement dans les astrocytes et les deux pourraient être transportées jusqu'aux neurones, ou DNAJB1 pourrait interagir avec Hsp70 une fois dans les neurones. De plus, une étude *in vitro* a montré que le domaine J était essentiel pour la sécrétion de DNAJB1 par des exosomes et que le mutant DNAJB1-DN était toujours capable d'être sécrété (Takeuchi et al., 2015). Cela prouve que, dans notre étude, l'effet de DNAJB1-DN sur les agrégats de mHtt n'est pas seulement dû à la non libération du mutant par les astrocytes. L'expression de DNAJB1-DN dans les astrocytes des souris Hdh140 injectée avec LV-JAK2ca bloque l'amélioration des défauts transcriptionnels observée avec JAK2ca, et diminue même le niveau transcriptionnel de marqueurs neuronaux. Le mutant DNAJB1-DN n'agit pas seulement sur l'agrégation de la mHtt mais peut aussi bloquer le repliement d'autres protéines impliquées dans des fonctions cellulaires importantes.

Une étude dans un modèle drosophile de la MH, dans lequel la mHtt est exprimée dans les neurones, a récemment montré que l'expression d'une autre co-chaperonne Hsp40, DNAJB6, dans les astrocytes diminue la neurodégénérescence et augmente la longévité mais n'impacte pas l'agrégation de la mHtt dans les neurones (Bason et al., 2019). Bason et collaborateurs ont, cependant, observé une augmentation du nombre d'agrégats de mHtt dans les astrocytes. Ils suggèrent alors que les astrocytes protégeraient les neurones en récupérant les agrégats de mHtt. Les astrocytes agiraient comme un réservoir de mHtt agrégée, ce qui éviterait la propagation

transcellulaire de la mHtt entre les neurones (Bason et al., 2019). DNAJB1 et DNAJB6 semble donc agir différemment. En effet, DNAJB6, contrairement à DNAJB1, pourrait directement agir avec la séquence polyQ de la mHtt et cela indépendamment de Hsp70 (Månsson et al., 2014; Kakkar et al., 2016).

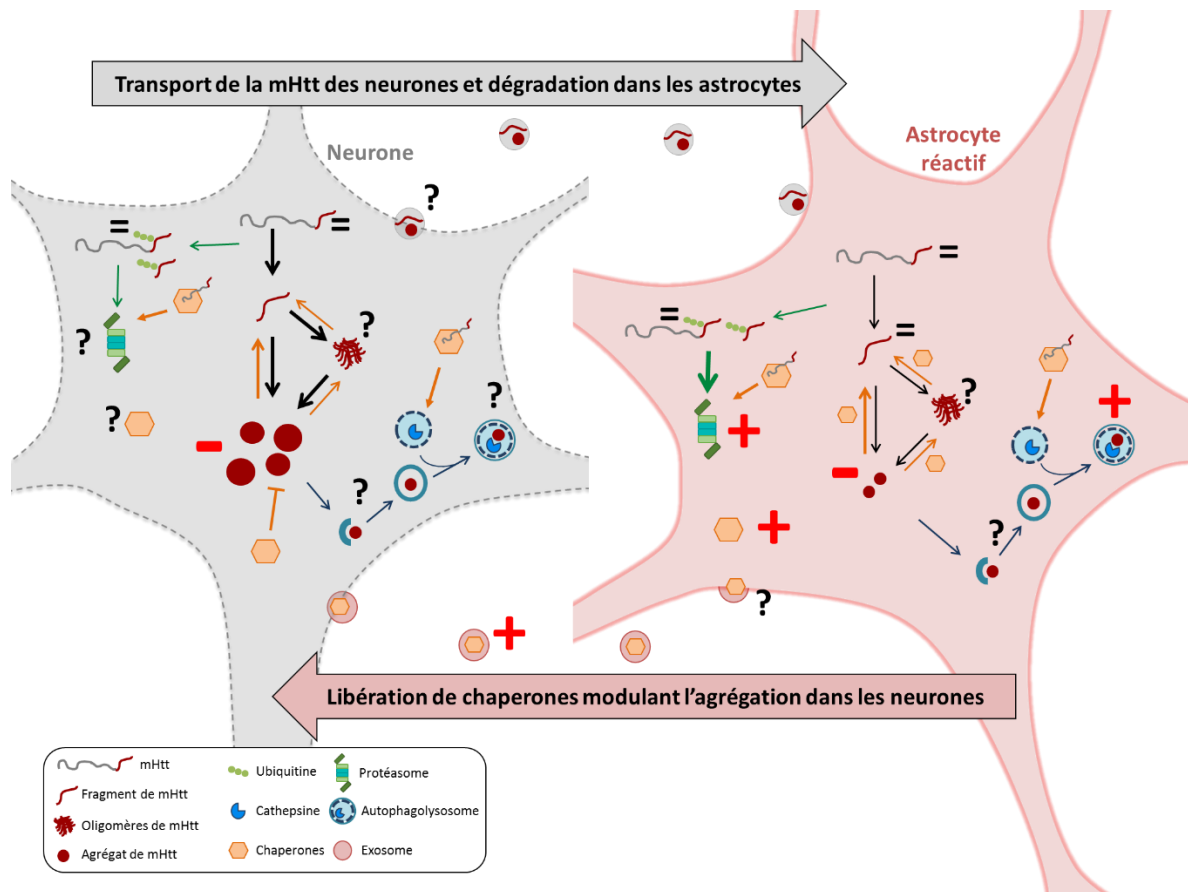


Figure 34- Mécanismes impliqués dans la diminution de l'agrégation de la mHtt par les astrocytes réactifs : synthèse des résultats obtenus. Les astrocytes réactifs diminuent l'agrégation de la mHtt mais n'impactent pas le niveau de mHtt soluble au cours de la MH. Cet effet sur l'agrégation de la mHtt est associé à l'amélioration de certaines altérations neuronales. La mHtt pourrait être transportée des neurones jusqu'aux astrocytes par différents mécanismes (exosomes, ectosomes, libération extracellulaire...) que nous n'avons pas explorés car très difficiles à mettre en évidence *in vivo*. La forme sous laquelle la mHtt est transférée des neurones aux astrocytes est également inconnue : il pourrait s'agir de la protéine soluble entière ou clivée, d'oligomères ou même d'agrégats. Une fois dans les astrocytes réactifs, la mHtt est alors dégradée par les systèmes de dégradation cellulaire. L'activité du protéasome et des cathepsines lysosomales est, en effet, augmentée dans les astrocytes réactifs au cours de la MH. La réactivité astrocytaire ne semble pas impacter le niveau d'ubiquitination des protéines striatales, mais l'activité du système ubiquitine n'a pas été mesurée. De même, le flux autophagique n'a pas encore été mesuré. Ces deux paramètres dynamiques devraient être mesurés dans les neurones et les astrocytes séparément, ce qui rend l'approche expérimentale plus compliquée. Les astrocytes réactifs surexpriment la co-chaperonne DNAJB1, impliquée dans la prévention de l'agrégation de la mHtt. Les astrocytes pourraient alors libérer, dans le milieu extracellulaire via des exosomes, DNAJB1 qui modulerait l'agrégation de la mHtt dans les neurones. DNAJB1 est enrichie dans les exosomes lorsque les astrocytes sont réactifs au cours de la MH. Par l'injection lentivirale de DNAJB1 ou d'un mutant DN spécifiquement dans les astrocytes, nous avons également confirmé l'implication de DNAJB1 dans la diminution de l'agrégation de la mHtt par les astrocytes réactifs.

4. Améliorations des altérations neuronales

Nous avons donc montré que les astrocytes réactifs diminuent l'agrégation de la mHtt dans les neurones. Cet effet semble être médié par un dialogue trans-cellulaire entre les astrocytes réactifs et les neurones. Il était important d'évaluer l'impact de cette diminution de l'agrégation sur les altérations neuronales dans la MH. Le rôle des agrégats de la mHtt reste controversé (voir paragraphe III.1.b.iii). Cependant un consensus sur le rôle à la fois bénéfique et délétère de ces agrégats commence à émerger (Ramdzan et al., 2017). Ces agrégats pourraient être dans un premier temps bénéfiques en piégeant la mHtt soluble toxique responsable de l'apoptose des cellules. Mais ces agrégats de mHtt piégeraient en même temps d'autres protéines essentielles pour le bon fonctionnement cellulaire, ce qui entrainerait progressivement une altération de l'homéostasie cellulaire et la mort neuronale.

Dans notre étude, l'inhibition de la réactivité astrocytaire par SOCS3 augmente la lésion neuronale dans le modèle LV_N-mHtt alors que l'activation des astrocytes réactifs par JAK2ca améliore les déficits transcriptionnels des marqueurs des neurones striataux observés chez les souris Hdh140. Les astrocytes réactifs diminuent donc l'agrégation de la mHtt et améliorent certaines altérations neuronales. Dans notre étude, la diminution de l'agrégation est corrélée à un effet bénéfique sur les neurones et la présence d'agrégats apparait donc plutôt comme un indicateur de toxicité dans nos modèles murins de la MH. Comme discuté précédemment (paragraphe II.1 de la discussion), la diminution des agrégats peut s'expliquer par plusieurs mécanismes, notamment par une diminution de l'agrégation des différentes formes de la mHtt et ainsi une augmentation de la forme soluble potentiellement toxique. Nous n'avons pas mis en évidence de modulation du niveau de mHtt soluble par la réactivité astrocytaire. Cependant, les intermédiaires oligomériques, qui peuvent aussi être toxiques et à l'origine des altérations neuronales et qui ne sont pas visibles par microscopie, pourraient être eux aussi diminués par JAK2ca. En effet, la diminution du nombre d'agrégats n'est pas forcément corrélée à une augmentation des formes toxiques de la mHtt plus soluble. La réactivité astrocytaire pourrait, en effet, rétablir la protéostasie cellulaire et ainsi augmenter l'élimination de l'ensemble des formes de mHtt, ce qui pourrait expliquer l'effet bénéfique sur les neurones observé dans nos modèles.

Dans les souris Hdh140 à 12 mois, l'amélioration des défauts transcriptionnels par JAK2ca n'est pas liée à une augmentation du niveau protéique du marqueur des neurones striataux DARPP32 ou à une diminution de l'atrophie des neurones DARPP32⁺. Les altérations transcriptionnelles observées dans les souris Hdh140 pourraient, cependant, être corrélées à des déficits fonctionnels des neurones. Il serait donc intéressant d'effectuer des mesures plus fonctionnelles sur les neurones des souris Hdh140 comme par exemple les propriétés électrophysiologiques intrinsèques des neurones SPNs ou le métabolisme par spectroscopie à résonance magnétique altérés chez les souris Hdh140 dès 12 mois (Cummings et al., 2010; Pépin et al., 2016). Avec notre stratégie d'injection de vecteurs viraux, il est possible que la modulation de la réactivité astrocytaire soit trop locale pour observer des effets fonctionnels au niveau du striatum entier. Pour impacter plus largement le striatum, nous pourrions utiliser des vecteurs AAV que nous injecterions au niveau de plusieurs sites dans le striatum.

Une étude a montré que l'injection d'une enzyme de dégradation du CH par un vecteur AAV dans le striatum de souris R6/2 améliorait plusieurs caractéristiques pathologiques dont le comportement moteur chez ces souris (Boussicault et al., 2016). Il faudrait également étudier des souris Hdh140 à un âge où les altérations neuronales sont plus marquées afin de mettre en évidence le potentiel effet protecteur de la réactivité astrocytaire induite par JAK2ca.

De plus, il est important de noter que le modèle LV_A-mHtt qui présente de petits agrégats principalement dans les astrocytes ne montre pas de lésion neuronale contrairement au modèle LV_N-mHtt (données non montrées). D'après l'étude d'Arrasate et collaborateurs, les petits agrégats sont plus toxiques que les agrégats plus diffus (Arrasate et al., 2004), ce qui est contradictoire avec ce que nous observons dans nos modèles LV_N-mHtt et LV_A-mHtt. Cependant, il est possible que dans les souris LVA-mHtt, les astrocytes qui sont réactifs aient dégradé efficacement les agrégats et qu'ils soient plus résistants face aux plus petits agrégats restants plus difficile à dégrader (Meunier et al., 2016). Meunier et collaborateurs proposent qu'à l'inverse, les neurones, n'étant pas capable de dégrader efficacement la mHtt agrégée, formeraient de plus gros agrégats diffus comme mécanisme de protection (Meunier et al., 2016).

III. Hétérogénéité de la réactivité astrocytaire en fonction du contexte pathologique

Dans l'article 2, la réactivité astrocytaire a été étudiée dans le contexte de la MA. L'inhibition des astrocytes réactifs par SOCS3 diminue le nombre de plaques amyloïdes et restaure les déficits d'apprentissage dans le modèle APP/PS1dE9, et améliore les déficits synaptiques dans le modèle 3xTg. De plus, l'induction de la réactivité astrocytaire par JAK2ca dans des souris sauvages est suffisante pour entraîner l'apparition de dysfonctions synaptiques. Dans la MA, les astrocytes réactifs semblent donc plutôt délétères. Une étude récente confirme que l'inhibition de la réactivité astrocytaire contrôlée par STAT3 améliore plusieurs caractéristiques pathologiques dans le modèle APP/PS1dE9, dont la charge amyloïde (Reichenbach et al., 2019).

Dans l'article 1, nous montrons, qu'à l'inverse les astrocytes réactifs semblent bénéfiques dans la MH en diminuant le nombre d'agrégats de mHtt dans les neurones et en améliorant certaines altérations neuronales. En modulant la réactivité astrocytaire par la même stratégie de ciblage de la voie JAK2-STAT3, nous observons donc des effets opposés de la réactivité astrocytaire en fonction du contexte pathologique, et particulièrement un effet inverse sur une même caractéristique pathologique, l'agrégation de la protéine toxique impliquée dans la maladie.

Cette différence peut tout d'abord s'expliquer par l'environnement des astrocytes ciblés dans chaque pathologie. En effet, plusieurs études ont montré que les astrocytes répondaient différemment selon la région du cerveau (Ben Haim and Rowitch, 2017). Une étude a notamment mis en évidence des différences morphologiques, moléculaires et fonctionnelles entre les astrocytes du striatum et les astrocytes de l'hippocampe (Chai et al., 2017). En ciblant une même voie de signalisation contrôlant

la réactivité astrocytaire, nous modulons différents types d'astrocytes. L'hétérogénéité des astrocytes réactifs observée dans nos études pourraient donc être due à une hétérogénéité pré-existante des astrocytes hors contexte pathologique.

L'effet opposé des astrocytes réactifs dans la MA et dans la MH peut également s'expliquer par le stimulus pathologique. Bien qu'il y ait des similitudes entre les MND, les protéines toxiques impliquées dans ces maladies sont différentes et peuvent induire des mécanismes pathologiques variés. De plus, dans la MA, l'amyloïde β ($A\beta$) forme des plaques extracellulaires alors que dans la MH, la mHtt forme des agrégats intracellulaires. Les mécanismes impliqués dans la clairance de ces protéines agrégées ne sont donc pas identiques. La dégradation de la mHtt intracellulaire fait plutôt intervenir les systèmes de protéolyse cellulaire, autophagie-lysosome et UPS qui, d'après nos données, sont augmentés dans les astrocytes réactifs au cours de la MH. L'analyse transcriptomique des astrocytes réactifs, isolés à partir d'hippocampe de souris APP/PS1dE9, montre également une augmentation de l'expression de gènes liés au lysosome dans les astrocytes réactifs dans le contexte de la MA qui est majoritairement réduite par SOCS3. Les plaques $A\beta$ étant extracellulaires, l' $A\beta$ doit entrer dans la cellule, par exemple par phagocytose, afin d'être dégradée par les systèmes de protéolyse intracellulaire. L'étude des astrocytes désactivés pas SOCS3 dans les souris APP/PS1dE9 ne met pas en évidence de phagocytose de l' $A\beta$ par les astrocytes (**Article 2**, Annexe 1). D'autres mécanismes peuvent être impliqués dans la clairance des protéines comme par exemple le système glymphatique (analogue cérébral du système lymphatique) qui peut éliminer les protéines toxiques de l'espace extracellulaire et être modulé par les astrocytes réactifs notamment via le pied astrocytaire (Boland et al., 2018). Les astrocytes réactifs peuvent donc répondre différemment selon le stimulus pathologique.

L'impact des astrocytes réactifs est également controversé dans les autres MND. Au cours de la maladie de Parkinson, les astrocytes surexpriment également une protéine de la famille des Hsp40, la co-chaperonne DNAJB6, au niveau des corps de Lewy, qui pourrait être impliquée dans la réduction de la libération de l'alpha-synucléine toxique par les neurones (Durrenberger et al., 2009). Dans la maladie de Parkinson, les astrocytes pourraient donc jouer un rôle bénéfique en surexprimant une protéine chaperonne comme ce que nous observons au cours de la MH. Dans la SLA, une étude *in vitro* montre que les astrocytes activeraient mTOR en libérant plus de TGF- β 1 lorsqu'ils ont un phénotype réactif, ce qui inhiberait l'autophagie et entrainerait l'apparition d'agrégats dans les neurones (Tripathi et al., 2017). Au contraire, une analyse transcriptomique sur des astrocytes réactifs de souris modèles de la SLA révèle une surexpression des gènes liés à l'activité lysosomale et à la phagocytose (Baker et al., 2015). L'agrégation de protéines n'a pas été mesurée dans cette étude.

La réactivité astrocytaire est une réponse hétérogène et les astrocytes réactifs peuvent avoir des rôles différents selon la pathologie étudiée. L'hétérogénéité des astrocytes réactifs peut s'expliquer par une hétérogénéité pré-existante dans les astrocytes en condition physiologique et par le contexte et le stimulus pathologiques. Une doctorante de notre équipe cherche actuellement à comprendre cette hétérogénéité.

CONCLUSION GÉNÉRALE

La MH est une MND génétique caractérisée, d'un point de vue anatomopathologique, par la mort préférentielle des neurones striataux et la présence d'agrégats de mHtt majoritairement dans les neurones. De plus, au cours de la MH, les astrocytes changent d'état et deviennent réactifs. Cette réactivité est observée précocement dans le cerveau de patients MH. La réactivité astrocytaire est caractérisée par des changements morphologiques, la surexpression des protéines des filaments intermédiaires comme la GFAP et la vimentine, et d'importants changements transcriptionnels. Cependant, l'impact fonctionnel des astrocytes réactifs, en particulier dans la MH, est encore mal compris. Les astrocytes sont des partenaires cellulaires indispensables au bon fonctionnement neuronal. Plusieurs études dans des modèles murins ont montré que les fonctions de support des astrocytes étaient majoritairement altérées au cours de la MH. Cependant, contrairement à ce qui est observé chez les patients, la réactivité astrocytaire n'est pas ou peu présente dans les modèles murins de la MH. Il est donc difficile d'étudier la réactivité astrocytaire dans ces modèles et, par conséquent, de comprendre son rôle dans l'évolution de la MH.

En conditions pathologiques aiguës et chroniques, la voie de signalisation JAK2-STAT3 est activée dans les astrocytes réactifs. Notre équipe a récemment développé des outils viraux inhibant ou activant la voie JAK2-STAT3 *in vivo* et a montré que cette voie était nécessaire et suffisante à l'induction et au maintien de la réactivité astrocytaire. En effet, l'expression de SOCS3, l'inhibiteur de la voie, diminue les caractéristiques morphologiques et transcriptomiques de la réactivité astrocytaire dans plusieurs modèles de MND. De plus, SOCS3 opère une inhibition globale de la réactivité astrocytaire, non spécifique à une sous-classe d'astrocytes réactifs. A l'inverse, l'activation de la voie par JAK2ca suffit à induire la réactivité astrocytaire dans plusieurs régions cérébrales de souris sauvages, hors contexte pathologique. Le développement de ces outils ciblant la voie JAK2-STAT3 permet donc de moduler la réactivité *in vivo* et ainsi d'étudier sa contribution dans plusieurs pathologies, comme la MH.

Pour comprendre le rôle des astrocytes réactifs dans la MH, nous avons utilisé ces vecteurs viraux dans deux modèles complémentaires : un modèle lentiviral aigu et un modèle plus progressif, les souris Hdh140. Nous avons montré que les astrocytes réactifs diminuent le nombre et la taille des agrégats de mHtt, majoritairement présents dans les neurones, sans modifier l'expression de la mHtt soluble. La diminution de ces agrégats de mHtt est associée à l'amélioration de certaines altérations neuronales observées dans nos modèles murins de la MH : diminution de la lésion neuronale dans le modèle lentiviral et réduction des déficits transcriptionnels dans les deux modèles.

Une analyse transcriptomique révèle un enrichissement de gènes liés aux systèmes de protéolyse cellulaire dans les astrocytes réactifs. Nous observons également une activité accrue des cathepsines lysosomales et du protéasome dans les astrocytes réactifs de souris Hdh140. De plus, la capacité anti-agrégante intrinsèque des astrocytes est augmentée lorsqu'ils sont réactifs. Ces résultats suggèrent que les astrocytes réactifs auraient une meilleure capacité protéolytique et pourraient ainsi dégrader la mHtt provenant des neurones. Les astrocytes réactifs surexpriment également des protéines chaperonnes, et notamment la co-chaperonne DNAJB1/Hsp40. Dans la MH, cette co-chaperonne est surexprimée lorsque les astrocytes sont activés dans les souris Hdh140 et est enrichie dans la fraction exosomale isolée à partir du striatum de ces souris. Les astrocytes réactifs

pourraient alors libérer dans le milieu extracellulaire, via des exosomes, des protéines chaperonnes qui modèleraient l'agrégation de la mHtt une fois dans les neurones. La surexpression de DNAJB1 ou de son mutant dominant négatif dans les astrocytes de nos modèles de la MH confirme son implication dans la diminution de l'agrégation par les astrocytes réactifs.

L'effet des astrocytes réactifs sur l'agrégation de la mHtt serait donc médié par un dialogue bidirectionnel entre les astrocytes et les neurones. Nos résultats montrent que cet effet trans-cellulaire pourrait impliquer une meilleure efficacité de dégradation de la mHtt dans les astrocytes réactifs et une modulation de l'agrégation de la mHtt dans les neurones par des chaperonnes astrocytaires.

Au cours de la MH, les astrocytes, en devenant réactifs, semblent donc acquérir des propriétés bénéfiques et favorisent l'élimination des agrégats de mHtt dans les neurones. Une autre étude de notre équipe a montré qu'au contraire, les astrocytes réactifs sont plutôt délétères dans la MA. En effet, l'inhibition de la réactivité astrocytaire améliore plusieurs caractéristiques pathologiques dans des souris modèles de la MA. La réactivité astrocytaire est donc une réaction complexe et hétérogène, dépendante du contexte pathologique. Notre stratégie de modulation de la réactivité astrocytaire pourrait alors permettre d'identifier des fonctions astrocytaires impliquées spécifiquement dans les différentes pathologies, comme la protéolyse au cours de la MH, qui pourraient alors être ciblées à des fins thérapeutiques.

Il est désormais important d'identifier plus précisément les mécanismes trans-cellulaires impliqués dans la diminution de l'agrégation de la mHtt. Pour cela, il est essentiel de mettre en place des techniques offrant une résolution cellulaire, comme nous l'avons fait avec la mesure des activités de protéolyse ou l'expression cellule spécifique de la mHtt. Il serait notamment intéressant d'étudier l'autophagie et l'ubiquitination, les 2 systèmes en amont des activités de protéolyse mesurées dans cette étude (lysosome et protéasome). Afin de mieux comprendre les échanges entre les astrocytes et les neurones (flux de la mHtt, composition des exosomes libérés par chaque type cellulaire), il semble nécessaire d'effectuer des études *in vitro*, en reproduisant au mieux l'état réactif des astrocytes dans la MH. Le développement de kits de dissociation spécifiquement pour le cerveau adulte et d'anticorps permet une isolation plus rapide des astrocytes et l'amélioration de la pureté et du statut des astrocytes qui semblent moins réactifs (Guttenplan and Liddelow, 2019). L'utilisation d'astrocytes dérivés d'iPSC (induced pluripotent stem cells) de patients pourrait également être une option intéressante pour mieux modéliser la réactivité astrocytaire dans la MH, mais comme pour les cultures primaires, la pureté et la réactivité basale doivent être améliorées (Guttenplan and Liddelow, 2019).

Enfin, il sera important de confirmer l'effet bénéfique de la réactivité astrocytaire sur d'autres index fonctionnels de la MH, par exemple par des approches d'électrophysiologie ou l'analyse du comportement moteur des souris.

Au final, les astrocytes réactifs apparaissent comme des partenaires bénéfiques pour les neurones au cours de la MH. Il est important de comprendre plus précisément cette réponse des astrocytes pour pouvoir en tirer profit à des fins thérapeutiques.

ANNEXES

ANNEXE 1: ARTICLE 2

Modulation of astrocyte reactivity improves functional deficits in mouse models of Alzheimer's disease

Objectifs de l'article 2

En conditions pathologiques, comme dans les MND, les astrocytes changent d'état et deviennent réactifs. Plusieurs voies de signalisation sont activées dans ces astrocytes réactifs mais leur rôle dans l'induction de la réactivité astrocytaire n'a pas été prouvé (Ben Haim et al., 2015b). Une première publication de l'équipe a montré que la voie JAK2-STAT3 était activée dans les astrocytes réactifs de plusieurs modèles animaux de la MA et de la MH (Ben Haim et al., 2015a). Des vecteurs lentiviraux surexprimant l'inhibiteur de cette voie SOCS3 ont alors été utilisés dans ces modèles. SOCS3 diminue les marqueurs morphologiques caractéristiques de la réactivité astrocytaire tels que la surexpression de la GFAP et de la vimentine (Ben Haim et al., 2015a). Ces résultats ont permis de montrer que la voie JAK2-STAT3 était nécessaire à l'induction de la réactivité dans la MA et la MH (Ben Haim et al., 2015a).

Dans cet article, nous avons été plus loin dans la caractérisation des effets de SOCS3 en analysant les changements transcriptomiques se produisant dans les astrocytes réactifs d'un modèle de la MA et leur éventuelle normalisation par SOCS3. De plus, notre équipe a développé des vecteurs viraux surexprimant, la forme constitutivement active de JAK2 (JAK2ca) permettant d'activer la voie JAK2-STAT3 dans les astrocytes. La surexpression de JAK2ca est suffisante pour induire la réactivité astrocytaire dans des souris sauvage hors contexte pathologique, dans l'hippocampe et dans le striatum.

A l'origine, les vecteurs viraux ciblant la voie JAK2-STAT3 ont été développés dans des lentivirus (LV). Dans cet article, des vecteurs viraux dérivés de virus adéno-associés (AAV) ont été utilisés et sont également efficaces pour moduler la réactivité astrocytaire *in vivo*. Les AAV ont une meilleure diffusion, particulièrement dans l'hippocampe, comparés aux LV.

Le développement de ces outils ciblant la voie JAK2-STAT3 permet de moduler la réactivité *in vivo* et donc d'étudier son rôle dans différents contextes, qu'ils soient pathologiques ou non. L'article 2 s'est focalisé sur la MA et montre que l'inhibition de la réactivité astrocytaire améliore plusieurs aspects de la pathologie dans deux modèles murins de la MA.

Contribution à l'article 2


Dans cet article 1, j'ai participé à la caractérisation moléculaire (immunohistochimie, western-blot et qPCR) de ces vecteurs lentiviraux et AAV dans le cerveau de souris, et particulièrement dans le striatum. J'ai également participé à la réalisation de certaines figures et à la relecture du papier.

RESEARCH

Open Access



Modulation of astrocyte reactivity improves functional deficits in mouse models of Alzheimer's disease

Kelly Ceyzériat^{1,2}, Lucile Ben Haim^{1,2,8†}, Audrey Denizot^{3,4†}, Dylan Pommier^{3,4†}, Marco Matos^{3,4†}, Océane Guillemaud^{1,2†}, Marie-Ange Palomares⁵, Laurene Abjean^{1,2}, Fanny Petit^{1,2}, Pauline Gipchtein^{1,2}, Marie-Claude Gaillard^{1,2}, Martine Guillermier^{1,2}, Sueva Bernier^{1,2}, Mylène Gaudin^{1,2}, Gwenaëlle Aurégan^{1,2}, Charlène Joséphine^{1,2}, Nathalie Déchamps^{6,7}, Julien Veran^{3,4}, Valentin Langlais^{3,4}, Karine Cambon^{1,2}, Alexis P Bemelmans^{1,2}, Jan Baijer^{6,7}, Gilles Bonvento^{1,2}, Marc Dhenain^{1,2}, Jean-François Deleuze⁵, Stéphane H R Oliet^{3,4}, Emmanuel Brouillet^{1,2}, Philippe Hantraye^{1,2}, Maria-Angeles Carrillo-de Sauvage^{1,2}, Robert Olaso⁵, Aude Panatier^{3,4} and Carole Escartin^{1,2*} 

Abstract

Astrocyte reactivity and neuroinflammation are hallmarks of CNS pathological conditions such as Alzheimer's disease. However, the specific role of reactive astrocytes is still debated. This controversy may stem from the fact that most strategies used to modulate astrocyte reactivity and explore its contribution to disease outcomes have only limited specificity. Moreover, reactive astrocytes are now emerging as heterogeneous cells and all types of astrocyte reactivity may not be controlled efficiently by such strategies.

Here, we used cell type-specific approaches *in vivo* and identified the JAK2-STAT3 pathway, as necessary and sufficient for the induction and maintenance of astrocyte reactivity. Modulation of this cascade by viral gene transfer in mouse astrocytes efficiently controlled several morphological and molecular features of reactivity. Inhibition of this pathway in mouse models of Alzheimer's disease improved three key pathological hallmarks by reducing amyloid deposition, improving spatial learning and restoring synaptic deficits.

In conclusion, the JAK2-STAT3 cascade operates as a master regulator of astrocyte reactivity *in vivo*. Its inhibition offers new therapeutic opportunities for Alzheimer's disease.

Keywords: Reactive astrocytes, Alzheimer's disease, JAK2-STAT3 pathway, Signaling cascades, Viral vectors, Neuroinflammation, Mouse models

Introduction

Astrocytes become reactive in virtually all diseases of the central nervous system (CNS). Astrocyte reactivity is classically defined by two hallmarks: cellular hypertrophy and overexpression of intermediate filament proteins

such as Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) and vimentin [27]. But astrocyte reactivity involves significant transcriptional changes that go well beyond these two morphological alterations, and the functional consequences of reactivity are unclear [7, 9, 47, 67]. In Alzheimer's disease (AD), the most frequent neurodegenerative disease (ND) characterized by amyloid and Tau deposition in the brain, as well as memory loss and synaptic alterations, the role of reactive astrocytes is still debated [13, 63].

Studies in cellular or mouse models of AD report changes in specific astrocyte functions, including metabolic support [2, 72], neurotransmitter recycling [51],

* Correspondence: carole.escartin@cea.fr

[†]Lucile Ben Haim, Audrey Denizot, Dylan Pommier, Marco Matos and Océane Guillemaud contributed equally to this work.

¹Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives, Département de la Recherche Fondamentale, Institut de Biologie François Jacob, MIRCen, 92260 Fontenay-aux-Roses, France

²Centre National de la Recherche Scientifique, Université Paris-Sud, UMR 9199, Neurodegenerative Diseases Laboratory, 92260 Fontenay-aux-Roses, France

Full list of author information is available at the end of the article



antioxidant defense [2, 83] and synaptic transmission [31, 45]. However, the overall contribution of reactive astrocytes to AD remains unclear, because the changes reported in these studies can have beneficial, detrimental or mixed effects on neurons. Attempts to block astrocyte reactivity globally, through knock-out of astrocyte intermediate filament proteins [32, 38] or inhibition of intracellular signaling cascades [22, 77] show inconsistent effects on AD pathological outcomes. Such discrepancies could stem from the low efficiency and selectivity of these approaches that only impact astrocyte morphological changes or have partial effects on astrocyte reactivity. In addition, they may not target all reactive astrocyte populations. Indeed, reactive astrocytes display molecular and functional heterogeneity [3]. For example, two sub-types of reactive astrocytes termed A1 and A2 were recently described [48, 85]. Likewise, in AD, astrocytes in contact with amyloid plaques display stronger transcriptional changes than those distant to plaques [62]. To understand how reactive astrocytes contribute to AD, it is crucial to develop a new strategy that efficiently modulates all types of reactive astrocytes.

Several intracellular signaling cascades are traditionally associated with astrocyte reactivity in acute or chronic diseases, but it is not clear whether they directly control it *in vivo* see, [7, 33] for review. Recently, we showed that the transcription factor Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3) is activated in reactive astrocytes of several murine and primate ND models [8]. It is also activated in acute CNS diseases and is involved in the formation of the glial scar [4, 26, 61]. STAT3 is the downstream effector of the Janus Kinase 2 (JAK2)-STAT3 pathway. In this cascade, the binding of several cytokines and growth factors to their receptors activate JAK2, leading to phosphorylation and nuclear accumulation of STAT3 [54]. STAT3 then activates the expression of multiple target genes, including GFAP in astrocytes [12, 54].

In this study, we aimed to 1) demonstrate the instrumental role of the JAK2-STAT3 pathway in controlling astrocyte reactivity in AD and 2) target this pathway to modulate astrocyte reactivity and evaluate its contribution to disease outcomes in AD mouse models. We establish that the JAK2-STAT3 pathway is a master regulator of astrocyte reactivity *in vivo*. It is necessary and sufficient for the induction and long-term maintenance of reactive astrocytes. Importantly, its inhibition blunts astrocyte reactivity, reduces amyloid deposition, improves spatial learning and restores synaptic function in AD mouse models, revealing that reactive astrocytes have mostly deleterious roles in AD.

Methods

Mice

Male APP/PS1dE9 transgenic mice (APP; <http://jaxmice.jax.org/strain/005864.html>) were injected at 3–

4 month-old and studied 6 months later. Another cohort was injected at 15 month-old and studied 1 month later. APP mice harbor a chimeric mouse/human *App* gene with the Swedish mutations K595N and M596L (APP^{swe}) and the human *Psen1* variant lacking exon 9 on a C57BL/6 J background [30]. Non-transgenic littermates were used as controls. Female triple transgenic (3xTg) mice express human APP^{swe} and human Tau^{P301L} under a Thy-1 promoter as well as a point mutation on the mouse *Psen1* gene (PS1^{M146V}), on a mixed C57BL/6 J x 129Sv background [59]. C57Bl/6 J x 129Sv mice were used as controls. They were injected at 3 month-old and studied at 8–9 month-old. Breeding pairs were obtained from the Mutant Mouse Regional Resource Centers. Finally, WT male C57Bl6/J mice were injected at 2 month-old and studied 1–4 months later. All experimental protocols were reviewed and approved by the local ethics committee (CETEA N°44) and submitted to the French Ministry of Education and Research (Approvals # APAFIS#4565–2016031711426915 v3, APAFIS#4503–2016031409023019). They were performed in a facility authorized by local authorities (authorization #B92–032–02), in strict accordance with recommendations of the European Union (2010–63/EEC). All efforts were made to minimize animal suffering and animal care was supervised by veterinarians and animal technicians skilled in rodent healthcare and housing. Animals were housed under standard environmental conditions (12-h light-dark cycle, temperature: 22 ± 1 °C and humidity: 50%) with *ad libitum* access to food and water. Mice of the appropriate genotype were randomly allocated to experimental groups.

Viral vectors

We used adeno-associated virus (AAV2, serotype 9) that bear the gfaABC₁D promoter, a synthetic promoter derived from the GFAP promoter [43], to drive specific transgene expression in astrocytes (Additional file 1: Figure S1). AAV were produced by our viral vector facility according to validated procedures [21]. Viral genome concentration in the vector batch was determined by qPCR on DNase resistant particles.

To modulate the JAK2-STAT3 pathway in mouse astrocytes, we generated AAV encoding murine SOCS3 or murine JAK2^{T875N}, a constitutive active form of JAK2 (JAK2ca, [23]). Control viral vectors encoded GFP. AAV-SOCS3 or AAV-JAK2ca were co-injected with an AAV-GFP to visualize infected cells (same total viral titer). Depending on the experiment, bilateral injections of the same viruses were performed and controls were generated in different animals. Alternatively, the contralateral brain region was injected with the control virus and data analyzed with paired *t* test.

As a positive control for STAT1 immunoreactivity, we used mice injected with a lentiviral vector (LV) encoding the cytokine ciliary neurotrophic factor (CNTF), as previously described [18].

Stereotactic injections

Mice were anesthetized with an *i.p.* injection of ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg). For APP mice, xylazine was replaced by medetomidine (0.25 mg/kg) and anesthesia was reversed by an *s.c.* injection of atipamezole (0.25 mg/kg) at the end of the surgical procedure. Lidocaine (7 mg/kg) was injected subcutaneously at the incision site, 10 min prior to surgery. Mice received paracetamol in drinking water (1.6 mg/ml) for 48 h after surgery. Viral vectors were injected in the CA1 region of the hippocampus (coordinates from Bregma: anteroposterior (AP): -2, lateral (L): +/- 2; ventral (V): -1.2 mm from the dura; or more caudally as it improves viral diffusion AP: -3, L: +/- 3; V: -1.5 mm).

AAV were diluted in 0.1 M phosphate buffer saline (PBS) with 0.001% pluronic acid, at a final total concentration of 2.5×10^9 viral genome (VG)/ μ l. LV were diluted in PBS with 1% bovine serum albumin (BSA), at a total final concentration of 100 ng p24/ μ l. Between 2 and 2.5 μ l of viral suspensions were injected at a rate of 0.2 μ l/min.

As a positive control for phospho-ERK immunoreactivity, 2 month-old C57BL/6 mice received unilateral intrastratial injections of lipopolysaccharide (LPS) [1 μ l at 5 mg/ml in PBS (*Escherichia coli*, serotype 055:B5; Sigma)] and analyzed seven days later.

Immunohistology

Some mice were killed by an overdose of sodium pentobarbital (180 mg/kg) and perfused with 4% paraformaldehyde (PFA) (Fig. 1h, 7). Alternatively, mice were killed by cervical dislocation and one brain hemisphere was rapidly dissected and drop-fixed in 4% PFA, while the other was used for biochemical analysis (Figs. 1b, 4, 6). In all cases, brains were post-fixed for 24 h in 4% PFA, cryoprotected in 30% sucrose solution and cut on a freezing microtome into 30 μ m-thick coronal sections. Series of slices were stored at -20 °C in an anti-freeze solution until used for immunostainings. All mice within a cohort were processed and analyzed in parallel with the exact same procedures.

Immunofluorescence. Slices were rinsed in PBS for 3 \times 10 min and were blocked in 4.5% normal goat serum (NGS), 0.2% Triton X-100 in PBS (PBST) for 1 h at room temperature (RT). Slices were incubated overnight at 4 °C with the following primary antibodies diluted in 3% NGS/PBST: anti-GFAP-Cy3 (1:1,000; Sigma, #C9205), anti-GFAP (1:1,000, Rabbit, Dako, Troy, MI, #Z0334), anti-IBA1 (1:500, Rabbit, Wako, Richmond,

VA, #019-19741), anti-MBP (1:500, Rabbit, Sigma, #M3821), anti-Olig2 (1:500, Rabbit, Millipore, #Ab9610), anti-S100 β (1:500, Mouse, Sigma #S2532) or anti-Vimentin (1:1,000, Chicken, Abcam, Cambridge, UK, #ab24525).

Slices were rinsed 3 \times 10 min in PBS and incubated with secondary Alexa Fluor-conjugated antibodies (Invitrogen, Carlsbad, CA) in 3% NGS/PBST for 1 h at RT. After 3 washes in PBS, slices were incubated overnight at 4 °C with an anti-GFP biotinylated antibody (1:500, Vector Laboratories, Burlingame, CA, #BA-0702) in 3% NGS/PBST. After 3 rinses with PBS, sections were incubated for 1 h at RT with Streptavidine-FITC (1:1,000, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, #SA100-02) in 3% NGS/PBST. Slices were rinsed three times with PBS before being mounted on SuperFrost[®] Plus (ThermoFisher Scientific) slides and coverslipped with Fluorsave[™] (Calbiochem, Darmstadt, Germany) or Fluormount[™] (Sigma) medium.

For STAT3 and STAT1 stainings, slices were pre-treated with 100% methanol for 10 min at -20 °C and incubated with primary antibodies (STAT3 α , 1:200, Rabbit, #8768P; STAT1, 1:400, Rabbit, #14994, Cell signaling, Danvers, MA) in SignalStain[®] antibody diluent (Cell signaling, #8112 L) for 72 h at 4 °C. For NeuN (1:500, Mouse, Chemicon, Billerica, MA, #MAB377) and BAM10 (1:1,000, Mouse, Sigma, #A3981) stainings, the mouse on mouse kit (MOM, Vector Laboratories) was used to reduce non-specific background, according to the manufacturer's instructions. For Olig2 staining, a pre-treatment at 90 °C in Tris-EDTA Buffer pH=9 (Diagnostic Biosystems, Pleasanton, CA) was performed. For *post-mortem* methoxy-XO4 (MXO4, Tocris, Bristol, UK) labeling, slices were incubated with 33 μ g/ml MXO4 in 0.1 M PBS, for 30 min at RT under mild agitation. After 3 rinses with PBS, a standard protocol for immunofluorescence was performed as described above. Double or triple immunofluorescent stainings were performed successively, with each antibody incubated alone.

Image analysis

GFAP immunoreactivity in the GFP⁺ area was quantified on 10 \times -tiled images of the hippocampus acquired with an epifluorescence microscope (Leica, Nussloch, Germany). Virally transduced GFP⁺ area was manually segmented and the corresponding GFAP mean signal was measured with Image J. Background signal was measured on unstained areas and subtracted to the GFAP total signal. The number and individual surface of BAM10 or MXO4-labelled plaques in the whole hippocampus were quantified on 10 \times -tiled fluorescent images with Image J. An automatic detection of objects with intensity and size thresholds was performed

on serial sections, after manual segmentation of the hippocampus on each section.

Images were acquired on a Leica TCS SP8 confocal microscope. Stacked confocal images (10 to 18 z-steps of 1 μm , kept constant within a cohort, maximum intensity stack) were acquired on 3 slices per animal and 3 fields on each slice with a 40 \times objective. The number of vimentin⁺/GFP⁺ cells was manually counted in the GFP⁺ infected area, with Image J. STAT3⁺ cell bodies were manually segmented and the mean grey value for STAT3 IR was measured in each cell.

A Sholl analysis was performed on GFAP⁺ hippocampal astrocytes to quantify morphological parameters, with an Image J plugin [20] and defined radius parameters (starting: 5 μm ; ending: 100 μm ; step: 5 μm). GFAP immunofluorescent staining was detected with Image J threshold function on maximum projection confocal z-stack images (40 \times , average 12 steps, 1 mm step, zoom 1). This analysis requires detectable GFAP levels and therefore could not be conducted on APP-SOCS3 astrocytes that display very low GFAP expression.

For quantification of MXO4-labelled A β in microglia, stacks of 0.4 μm confocal images covering the entire height of the plaque were acquired on 15 MXO4⁺ plaques per animal (3–4 plaques/slice). The number of IBA1⁺ microglial cells in direct contact with MXO4⁺ plaques was counted manually in the acquired volume and the localization of MXO4⁺ material (membrane or soma) was determined.

Protein extraction

Mice were killed by an overdose of pentobarbital and their brains were rapidly collected. The GFP⁺ area was dissected out with a 1 mm diameter punch, snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until protein extraction. Samples were homogenized by sonication in lysis buffer [50 mM Tris-HCl pH = 7.4, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100 with 1:100 phosphatase inhibitors (Sigma, cocktail 2) and 1X protease inhibitors (Roche, Basel, Switzerland); 25 μl /punch] centrifuged at 20,000 g for 20 min at 4°C . The supernatant contains Triton X-100-soluble proteins and was used for western blotting and MSD[®] ELISA tests.

Western blot

Protein concentration was measured by the BCA test (Pierce, Waltham, MA). Samples were diluted in loading buffer with DTT (NuPAGE[®] LDS sample buffer and sample reducing agent, Invitrogen). Ten μg of proteins was loaded on a NuPAGE[™] 4–12% Bis-Tris Midi Gel (Life Technologies). Migration was performed at 200 V for 45 min in NuPAGE[™] Running Buffer (Invitrogen) and proteins were transferred on a nitrocellulose membrane with

an iBlot Gel transfer device (Invitrogen). After 3×10 min rinses in Tris buffer saline and 0.1% Tween 20 (TBST), membranes were blocked in 5% milk in TBST for 1 h at RT and incubated for 3 h at RT, or overnight at 4°C with the following primary antibodies: 6E10 (human APP, 1:500, Mouse, Covance, Princeton, NJ, #SIG-39320-20), anti-Actin (1:5,000, Mouse, Sigma, #A2066), anti-ApoE (1:1,000, Rabbit, Abcam, #ab20874), anti-BACE1 (1:1,000, Rabbit, Cell signaling, #5606P), anti-GFAP (1:5,000, Rabbit, Dako), anti-IDE (1:400, Rabbit, Abcam, #ab32216), and anti-Tubulin α (1:1,000, Mouse, Sigma, #T5168). After 3×10 min washes in TBST, membranes were incubated for 1 h at RT with HRP-conjugated secondary antibodies (1:5,000, Vector laboratories) diluted in TBST with 5% milk. Membranes were incubated with the Clarity Western ECL substrate (Bio-Rad) and the signal was detected with a Fusion FX7 camera (ThermoFisher Scientific). Band intensity was quantified with Image J and normalized to actin or tubulin α . Each antibody was used on at least 2 different membranes.

MSD[®] ELISA tests

Triton X-100 soluble proteins were diluted in the diluent provided for the V-PLEX A β peptide panel kit (6E10 antibody, MSD[®], Rockville, MD). Samples were loaded in triplicate and manufacturer's protocol was followed. A β levels were quantified with the Discovery Workbench 4.0, MSD[®] software thanks to a standard curve, and normalized to the protein content in each well.

Cell sorting for RNAseq analysis

Mice were killed and their hippocampus rapidly collected in Hank's Balanced Salt Solution (HBSS; Sigma). Cells were mechanically and enzymatically dissociated with fire-polished Pasteur pipettes and the neural tissue dissociation kit with papain (Miltenyi Biotec), following manufacturer's instructions. After filtration through a 50 μm -filter, cells were centrifuged 10 min at 300 g, and diluted in 500 μl of HBSS. Myelin removal beads II and MS columns (Miltenyi Biotec) were used to deplete myelin from cell suspensions, as described by the manufacturer's protocol. Cell sorting was performed on a BD Influx cell sorter, equipped with a 488 nm laser and a 530/40 detector. Non-fluorescent brain cells were used to set up the detector gain and position gates, which were kept constant throughout sorting. Cells were gated on a forward scatter/side scatter plot, then singlets were selected and finally cells were collected based on their GFP expression. Cells were centrifuged at 300 g for 5 min at RT, lysed in 400 μl TRIzol (Invitrogen) and stored at -80°C before RNA extraction. The two hippocampi of each mouse was processed and sorted independently. Typically, 6,000 to 20,000 GFP⁺ astrocytes

and 50,000 to 100,000 GFP⁻ cells were collected for each sample within 15–25 min.

Measure of A β uptake in vivo by flow cytometry

Three hours before sacrifice, mice received an *i.p.* injection of 10 mg/kg MXO4 (diluted at 2.5 mg/ml in 50% DMSO in saline, pH = 12) to label amyloid material and monitor its uptake in cells [39]. Mice were perfused for 4 min with cold dPBS. Their hippocampus was rapidly collected in HBSS. Cells were dissociated and myelin was depleted as describe above. Cells were centrifuged at 300 g for 5 min at 4 °C and resuspended in Fc block (1: 100, TruStain FcX™, anti-mouse CD16/32, Biolegend, San Diego, CA) in HBSS for 10 min on ice. Samples were centrifuged at 300 g for 5 min at 4 °C and resuspended in cell staining buffer (Biolegend) with anti-CD11b-PE (1: 100, eBioscience, San Diego, CA) and anti-CD45-PE-Cy5 (1: 300, eBioscience) for 30 min on ice, under mild agitation. Cells were centrifuged at 300 g for 5 min at 4 °C and resuspended in 400 μ l HBSS. Cell sorting was performed on a BD Influx cell sorter. MXO4 was detected at 450/30 nm (408 nm excitation), GFP at 530/40 nm (488 nm excitation), CD11b-PE and CD45-PECy5 at 594/26 nm and 670/30 nm, respectively (561 nm excitation). MXO4⁺ and MXO4⁻ microglial cells were sorted separately and analyzed by RT-qPCR. Control samples of unlabeled or mono-fluorescent brain cells were used to set up detector gains and position sort gates, which were kept constant for all sorted samples. No compensation was required to accurately quantify MXO4, GFP, CD11b-PE and CD45-PECy5 signals within the same sample.

RNA extraction

Sorted cells were placed 5 min at RT and chloroform was added to TRIzol for 3 min. Samples were centrifuged at 12,000 g for 15 min at RT. Aqueous phase was collected and 1 volume of 70% ethanol was added. Samples were transferred onto an RNeasyMin Elute spin column and RNA was purified according to manufacturer's instructions, with on-column DNase treatment (RNeasy micro kit, Qiagen, Hilden, Germany). RNA was eluted with 14 μ l of RNase-free deionized water and stored at -80 °C until transcriptomic analysis.

RNAseq analysis

RNA quality and integrity were evaluated with an Agilent RNA 6000 Pico assay and the Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent technologies, Santa Clara, CA). As the number of sorted cells was limited, especially for GFP⁺ astrocytes, we quantified total RNA with Agilent RNA 6000 Pico assay and used 0.8 to 1 ng of total RNA per sample. Full length double strand cDNA libraries were constructed with the Smarter Ultra Low Input RNA kit

v4 (Takara-Clontech, Mountain View, CA) with 11 to 14 LD-PCR cycles. Purification was done with Ampure XP (Beckman Coulter Genomics, Brea, CA). The full length ds cDNA libraries were qualified with an Agilent High Sensitivity DNA kit and quantified with the Qubit dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen). All libraries were normalized to 750 pg in 5 μ l as starting material to Nextera XT sample preparation kit (Illumina Incorporated, San Diego, CA). Ligation products were amplified with 12 PCR cycles. Stringent purification was done (0.6X of AMPure XP) to remove small inserts that would be sequenced preferentially. mRNAseq libraries were qualified and quantified with Agilent High Sensitivity DNA kit and Qubit dsDNA HS Assay Kit respectively, before sequencing on a HiSeq 2000 Illumina platform (2 \times 100 bp). Quality controls and data analysis was performed by GenoSplice technology® (www.genosplice.com). Sequencing data quality, read repartition and insert size estimation were performed with FastQC, Picard-Tools, Samtools and rseqc. Reads were mapped on the mm10 Mouse genome assembly with STARv2.4.0 [17]. Gene expression analysis was performed as described previously [57]. Briefly, for each gene present in the Mouse FAST DB v2016_1_full annotations, reads aligning on constitutive regions (i.e. that are not prone to alternative splicing) were counted. Normalization of read counts and differential gene expression were performed with DESeq2 [49] on R (v.3.2.5). Only genes expressed in at least one of the two compared experimental conditions were analyzed. Genes were considered as expressed if their rpkms value was greater than 97.5% of the background rpkms value measured in intergenic regions. Results were considered statistically significant for *p* values ≤ 0.05 and fold-changes ≥ 1.5 .

Three sets of analysis were performed: (1) 7 GFP⁺ astrocyte samples were compared to 3 GFP⁻ cell samples from the WT-GFP group, to validate sorting efficiency; (2) 4 GFP⁺ astrocyte samples from APP-GFP mice were compared to 7 GFP⁺ astrocyte samples from WT-GFP mice to identify transcriptional changes in reactive astrocytes due to AD; and (3) 5 GFP⁺ astrocyte samples from APP-SOCS3 mice were compared to 4 GFP⁺ astrocyte samples from APP-GFP mice to identify astrocyte genes that are normalized by SOCS3 in AD mice. Hierarchical clustering between GFP⁺ and GFP⁻ cell samples was generated with MeV software, using Euclidean distance and average agglomeration method. RNAseq datasets are deposited on GEO under reference GSE108520.

Gene ontology analysis

Analysis for enriched Gene ontology (GO) terms were performed with Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) Functional annotation Tool (v6.8) [28] by Genosplice Technology®. GO

terms and pathways were considered as enriched for fold enrichment ≥ 2.0 , uncorrected p value ≤ 0.05 and minimum number of regulated genes in pathway/term ≥ 2.0 .

Weighted correlation network analysis (WGCNA)

WGCNA was performed with WGCNA R package [40] by GenosplICE Technology[®]. Genes expressed in at least 20% of samples (14 029) were used. Modules with at least 30 genes and a $kME > 0.7$ were defined, with split = 2. ANOVA was performed on the Eigengene calculated in each sample, as defined in [40] and the module with a $p < 0.05$ was further analyzed by STRING to identify functional networks of regulated genes (<https://string-db.org/>).

RT-qPCR

RT-qPCR were performed on sorted astrocytes or microglial cells. Reverse transcription was performed with the VILO™ kit according to the manufacturer's protocol (SuperScript[®] VILO™ cDNA synthesis kit; Life Technologies, Carlsbad, CA). Samples were diluted at 0.2 ng/ μ l in H₂O with 100 μ g/ml BSA and mixed with 250 nM of primers and Platinum SYBR-Green[®] (Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix-UDG; Life Technologies) for qPCR. PCR efficiency was between 85 and 110% for each set of primers (sequences shown in Additional file 2: Table S1). Nuclease-free water and samples without reverse transcription were used as negative controls. Expression levels of transcripts of interest were normalized with the Δ Ct method to the abundance of *Rpl13a* and *actin* for hippocampal astrocytes or *Eef1a1* and *Actin* for microglial cells.

Electrophysiological recordings

Transverse hippocampal slices were prepared as described previously [65], from 8 to 9 month-old WT-GFP, 3xTg-GFP and 3xTg-SOCS3 mice and from 4 to 6 month-old WT-GFP and WT-JAK2ca mice. Briefly, mice were anesthetized with 5% isoflurane and decapitated. The brain was rapidly removed and placed in ice-cold artificial cerebrospinal fluid (ACSF) saturated with 95% O₂ and 5% CO₂, containing (in mM): 125 NaCl, 2.5 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 1.3 MgCl₂, 2 CaCl₂, 26 NaHCO₃ and 10 glucose (pH = 7.4; 305 mOsmol/kg). A block of tissue containing the hippocampus was prepared and 350 μ m transversal hippocampal slices were cut on a vibratome (Leica). Slices were incubated 30 min at 32 °C and allowed to recover for at least 1 h at RT.

Slices were transferred to a recording immersion chamber and were perfused with ACSF (3 ml/min) at RT during the whole experiment. For the input/output experiment in WT and 3xTg mice, an incision between CA3 and CA1 regions was made in presence of 50 μ M picrotoxin in the perfusion bath. CA3 and CA1 areas

were identified with differential interference contrast microscopy and the region of interest (GFP⁺) was visualized with the epifluorescent mode of the microscope (Olympus BX50, Tokyo, Japan). Extracellular field excitatory postsynaptic potentials (fEPSPs) were evoked by orthodromic stimulations (100 μ s, 0.033 Hz) of Schaffer collaterals with a glass pipette filled with ACSF or a tungsten bipolar electrode placed in the *stratum radiatum*, more than 150 μ m away from the recording electrode. Then, fEPSPs were recorded, in current clamp mode ($I = 0$), with a glass pipette filled with ACSF (2–3 M Ω) and placed in the GFP⁺ region, in the *stratum radiatum* of CA1 area. Data were acquired with a Multi-clamp 700B amplifier (Molecular Devices, Sunnyvale, CA), digitized with a Digidata 1320A digitizer (Axon Instruments Inc., Sunnyvale, CA), recorded and analyzed off line with pClamp and Clampfit 10.3 respectively (Molecular Devices). Recordings were low-pass filtered at 2 kHz and digitized at 10 kHz.

A stable baseline was recorded for at least 20 min before starting the input/output experiment. The same amplitude of stimulation was applied three times (0.033 Hz), before being increased by 10 V. Paired-pulse stimulation experiments were performed with two pulses of stimulation induced at 50 or 100 ms interval. The paired pulse ratio was calculated as the slope of the second fEPSP over the slope of the first fEPSP. Long-term potentiation (LTP) was induced after 20 min of baseline recording, by applying a high-frequency stimulation (HFS) protocol (100 Hz train of stimuli for 1 s, repeated three times at 20 s interval).

At the end of the recording session, slices were post-fixed in 4% paraformaldehyde for 48 h and processed for GFAP immunostaining following the protocol described above except that GFAP-Cy3 antibody was incubated at 1:200 for 48 h.

Morris water maze

The water maze was a white circular pool (120 cm diameter, 60 cm high) filled with water and white soluble paint at 21 °C. The testing room contained numerous black extra maze cues and was illuminated with 400 Lux at the pool center. Mouse behavior (distance to the platform and swim speed) was monitored by a video camera, mounted on the ceiling above the pool center, and a computerized tracking system (Ethovision 11.5, Noldus IT, The Netherlands). All tests were performed between 8 am and 1 pm. Mice were handled daily for 2 min for 5 d preceding the training. First, their ability to see and shelter on an emerged platform (11 cm diameter) was assessed with four trials of 60 s in one day, with an inter-trial interval (ITI) of 30 min, each with a different platform location. A 10 cm high object was placed on the emerged platform. For the training phase, mice were

given three trials every day for 5 d, with an ITI of 30 min. The starting position differed for each trial but was identical for all animals, with mice placed in the water facing the wall of the pool. An invisible escape platform was placed in the middle of one of the quadrants (1 cm below the water surface) equidistant from the sidewalls and the middle of the pool. The platform location remained constant throughout training. Each trial lasted 60 s or until the animal located the platform. Animals that did not find the platform were guided to it and given a latency score of 60 s. All animals were left on the platform for 30 s and then taken back to their home cage before starting the next trial. 72 h after training, animals were given one 30 s probe trial during which the platform was removed from the pool. The probe trial started from a position opposite to the platform. The pool was divided into four quadrants of equal size. The percentage of time spent in each quadrant was recorded. No mouse was excluded from the analysis.

Statistics

Results are expressed as mean \pm SEM. N are indicated for each group in the order presented on the histogram. No statistical method was used to predetermine sample size. Sample size was chosen based on prior experience for each experiment, to yield adequate power to detect specific effects. Statistical analysis were performed with Statistica software (StatSoft, Tulsa, OK) or GraphPad Prism 7 (La Jolla, CA). We used paired or unpaired two-tailed Student *t* test to compare two groups and repeated-measures or one-way ANOVA and Tukey's post hoc test to compare three groups. For each analysis, normality of residues and homoscedasticity were assessed, as well as sphericity for repeated-measures ANOVA. If any conditions of application was not fulfilled, we used non-parametric tests. Two groups were compared by the Mann-Whitney or Wilcoxon test and three independent groups were compared by a Kruskal-Wallis test followed by post-hoc comparison of mean ranks. Percentages were normalized by Arcsin transformation and analyzed with parametric tests. The significance level was set at $p < 0.05$. Investigators were partially blinded to the group when performing experiments and measuring outcomes (as the group can be guessed based on the presence of amyloid plaques or GFP levels for example).

Results

The JAK2-STAT3 pathway controls astrocyte reactivity in AD mice

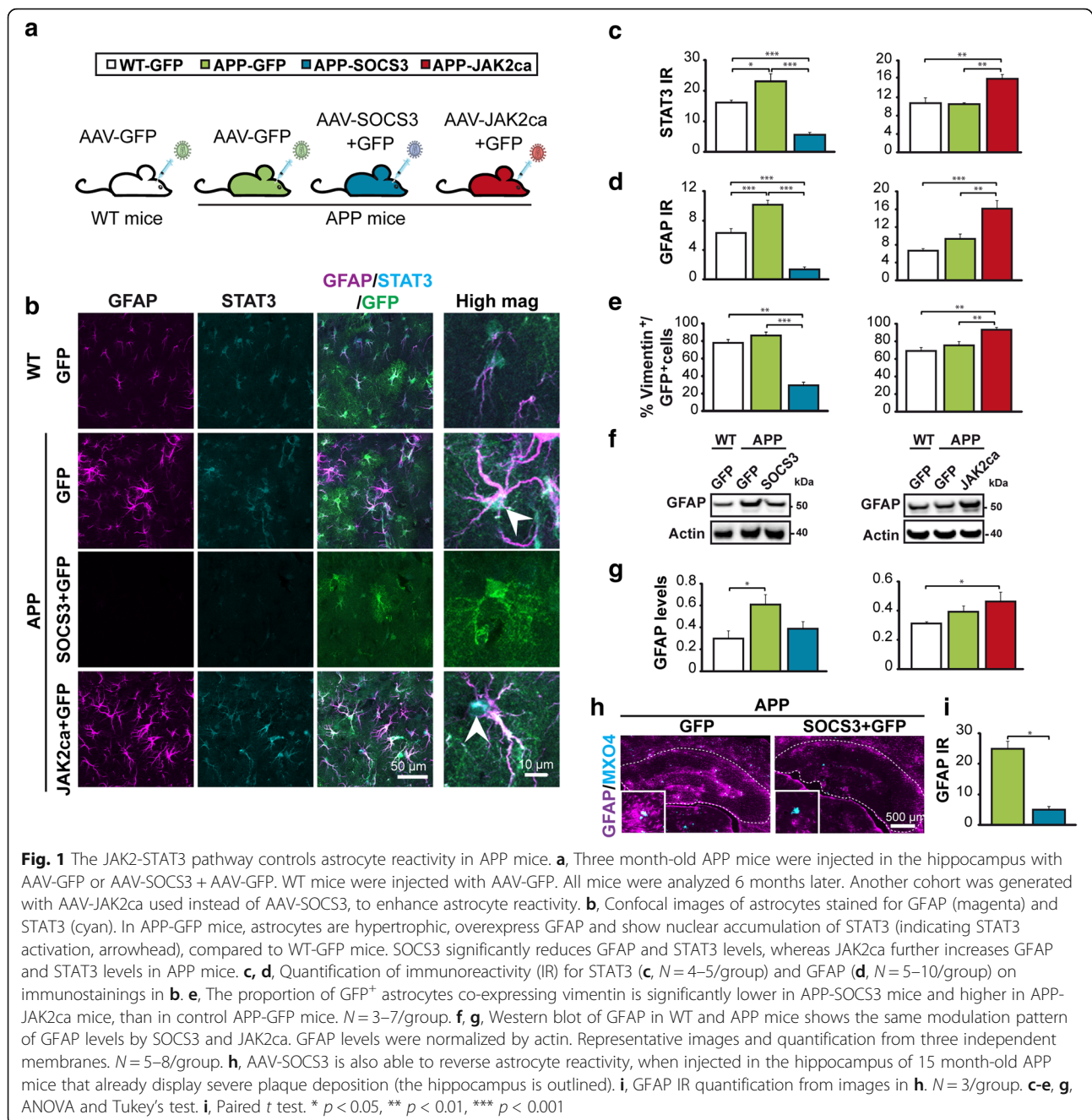
To study whether the JAK2-STAT3 pathway controls astrocyte reactivity in AD, we inhibited this pathway by overexpressing its endogenous inhibitor Suppressor Of Cytokine Signaling 3 (SOCS3, [6]) in APP/PS1dE9 mice

(hereafter called APP mice). We used adeno-associated vectors (AAV) that target astrocytes (Additional file 1: Figure S1) to express SOCS3 or GFP in hippocampal astrocytes. APP mice display progressive astrocyte reactivity in the hippocampus, where amyloid plaques accumulate [8, 30]. They were injected with AAVs in the CA1 region of the hippocampus, before detectable amyloid plaque deposition. AAV-SOCS3 was co-injected with AAV-GFP to visualize infected astrocytes (APP-SOCS3 mice). Control mice included APP and WT littermates injected with AAV-GFP alone, at the same total viral titer (Fig. 1a). Approximately 25% of the hippocampus was targeted by these AAV, as quantified with GFP staining, and more than 97% of GFAP⁺ astrocytes were GFP⁺ within the infected volume (data not shown). By immunostaining, we found that nuclear STAT3 levels in hippocampal astrocytes were higher in 9 month-old APP mice than in WT-GFP mice, indicating STAT3 activation. STAT3 immunoreactivity was efficiently reduced by SOCS3 in APP mice at 9 months (Fig. 1b, c) and even more so at 12 months (Additional file 3: Figure S2). Of the seven members of the STAT family, astrocytes express STAT3 at highest levels ([75] and our own RNAseq data). However, STAT1 was proposed to play important roles in brain inflammatory processes [71]. Here, we found that STAT1 expression was not induced in APP mice, confirming that STAT3 is the major STAT effector in astrocytes (Additional file 3: Figure S2). Likewise, extracellular signal-regulated kinase (ERK), a kinase that could also be inhibited by SOCS3 [36] was not activated in APP astrocytes and not further modulated by SOCS3 (Additional file 3: Figure S2).

Compared to WT, APP astrocytes were hypertrophic and overexpressed GFAP, the two classical hallmarks of reactive astrocytes (Fig. 1b, d). SOCS3 prevented GFAP upregulation in the hippocampus of APP mice, as shown by immunostaining (Fig. 1b, d) and western blotting on hippocampal samples from WT-GFP, APP-GFP and APP-SOCS3 mice (Fig. 1f, g). SOCS3 also reduced the number of vimentin⁺ astrocytes, another intermediate filament upregulated in reactive astrocytes (Fig. 1e).

Interestingly, over-activation of STAT3 by expression of a constitutively active mutant of the upstream kinase JAK2 (JAK2ca [23]) was able to further increase astrocyte reactivity in APP mice. By contrast to APP-GFP mice, APP-JAK2ca mice displayed enhanced STAT3 nuclear accumulation in astrocytes (Fig. 1b, c) and increased GFAP and vimentin protein levels (Fig. 1b-g).

Importantly, SOCS3 was also efficient in aged APP mice that already display strong astrocyte reactivity. Injection of AAV-SOCS3 in the hippocampus of 15 month-old APP mice reversed established astrocyte reactivity, as seen by a significant decrease in GFAP levels (Fig. 1h, i). These results show that the JAK2-STAT3 pathway is necessary for

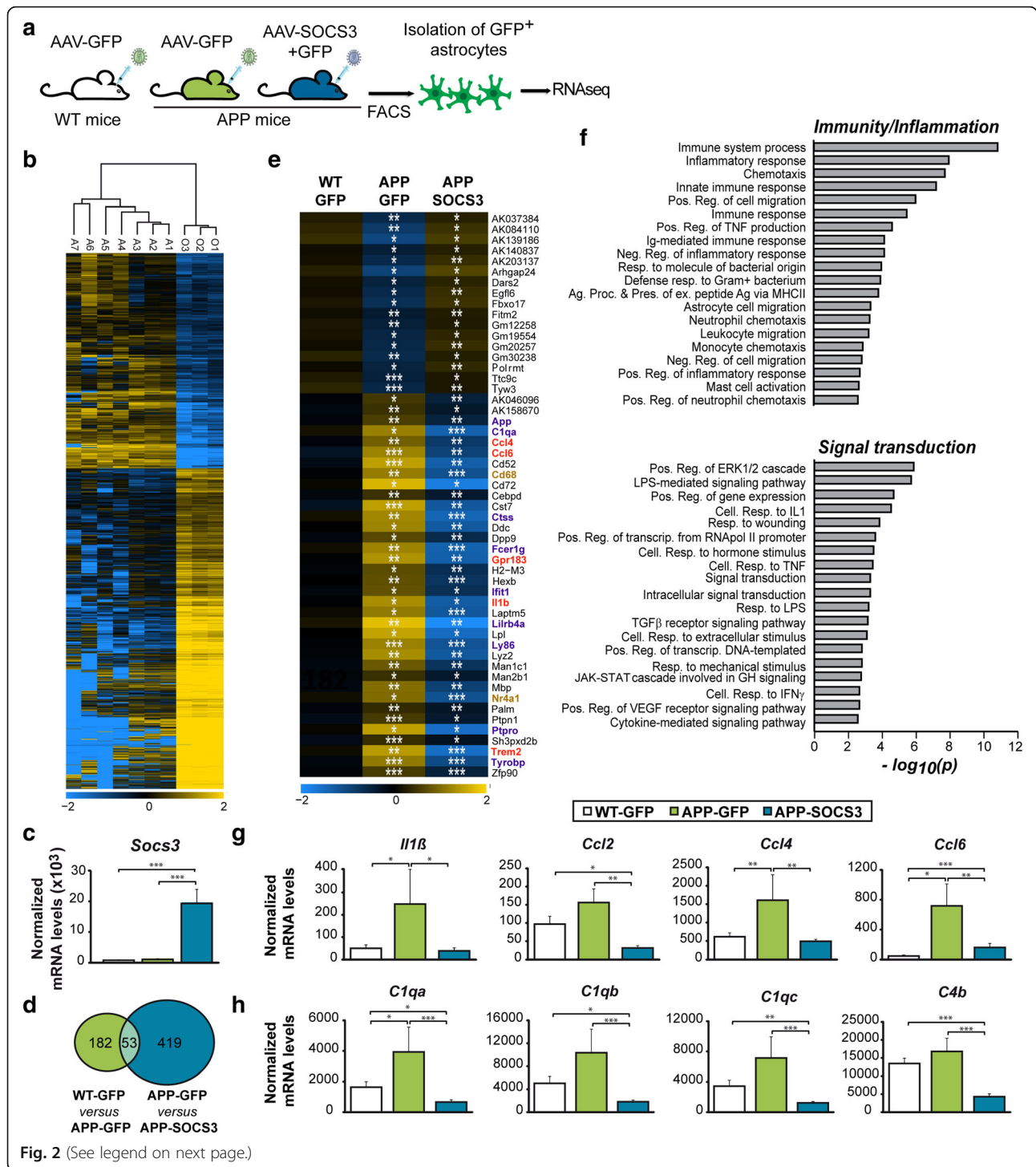


the induction and long-term maintenance of the basic morphological features of reactive astrocytes in APP mice.

SOCS3 normalizes multiple reactive astrocyte markers in AD mice

Besides morphological alterations, astrocyte reactivity is characterized by significant gene expression changes, especially during AD [48, 62, 85]. We thus studied the effects of SOCS3 on the transcriptional profile of APP astrocytes. We performed RNA sequencing (RNAseq) of

GFP⁺ astrocytes acutely isolated by FACS from WT-GFP, APP-GFP and APP-SOCS3 hippocampi (Fig. 2a). GFP⁻ cells comprising microglia, neurons, oligodendrocyte precursor cells and non-infected astrocytes were collected together. Genome-wide RNAseq analysis of GFP⁺ astrocytes and other GFP⁻ cells from WT-GFP mice identified 6949 genes differentially-expressed (Fold change > 1.5 and $p < 0.05$, Fig. 2b). Expression of cell-type specific markers validated the purity of sorted GFP⁺ astrocytes (Additional file 4: Figure S3).



(See figure on previous page.)

Fig. 2 SOCS3 restores the transcriptional profile of APP astrocytes. **a**, Hippocampal astrocytes of 9 month-old WT-GFP ($N = 7$), APP-GFP ($N = 4$) or APP-SOCS3 ($N = 5$) mice were isolated by FACS and their transcriptome examined by RNAseq analysis. **b**, Hierarchical clustering of the ~ 7000 differentially expressed genes between GFP⁺ astrocytes (samples A1-A7) and all other GFP⁻ cells (samples O1-O3), which comprise microglial cells, neurons, oligodendrocyte precursor cells and non-infected astrocytes. **c**, *Socs3* mRNA levels are increased more than 10 times in APP-SOCS3 astrocytes compared to WT-GFP and APP-GFP astrocytes. **d**, Venn Diagram showing the number of differentially expressed genes between WT-GFP and APP-GFP astrocytes and APP-GFP and APP-SOCS3 astrocytes. **e**, Expression levels for the 53 genes dysregulated in APP-GFP astrocytes and normalized in APP-SOCS3. Color scale represents mean-centered expression (log₂-transformed). Genes belonging to immunity/inflammation pathways are in purple, those belonging to signal transduction are in brown. Genes common to the two pathways are in red. **f**, Pathway analysis on the 472 genes regulated by SOCS3 in APP astrocytes reveals a specific enrichment in GO terms linked to immunity/ inflammation and signal transduction. Ag. Proc & Pres. = antigen processing and presentation. Cell. = cellular. Ex. = exogenous. Neg. = negative. Pos. = positive. Reg. = regulation. Resp. = response. **g, h**, SOCS3 normalizes gene expression of cytokines/chemokines (**g**) and complement factors (**h**), which are induced in APP-GFP astrocytes. Wald test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

After validation of sorting efficiency, we then compared the transcriptome of GFP⁺ astrocytes between the three groups. *Socs3* mRNA levels were 12 to 16 times higher in astrocytes of the APP-SOCS3 group than in the APP-GFP and WT-GFP groups respectively (Fig. 2c). We found hundreds of genes differentially expressed between APP-GFP and WT-GFP astrocytes groups and between APP-SOCS3 and APP-GFP astrocytes (Fig. 2d). A majority of genes (85%) were down-regulated by SOCS3, consistent with its inhibitory action on STAT3-mediated transcription. Several genes previously described as up-regulated in astrocytes acutely isolated from 15 month-old APP mice [62], were already induced at 9 months in APP-GFP compared to WT-GFP astrocytes (e.g. *Cst7*, *Ccl4*, *Ccl6*, *Ctss*, *Trem2*, *Tyrobp*, *Il1b*). Gene Ontology (GO) analysis with DAVID showed an enrichment in biological processes related to inflammation/immunity (data not shown), as reported in 15 month-old APP mice [62], as well as in laser captured cortical astrocytes from AD patients [73]. Fifty-three genes were either down- or up-regulated in APP-GFP mice relatively to WT-GFP mice and restored by SOCS3 (Fig. 2d, e). This list was also significantly enriched in GO biological processes linked to inflammation/immunity and signal transduction ($p < 0.05$, Fig. 2e). In the list of 472 genes regulated by SOCS3 in APP mice, there was an even larger number of enriched GO terms linked to these biological processes ($p < 3.10^{-3}$, Fig. 2f). For example, SOCS3 abrogated the induction of the cytokines and chemokines *Il1 β* , *Ccl2*, *Ccl4* and *Ccl6* observed in APP-GFP astrocytes (Fig. 2g). Interestingly, several complement factors (*C1qa*, *C1qb*, *C4b*, *C1qc*), were down-regulated by SOCS3 in APP astrocytes (Fig. 2h).

We then studied SOCS3 effects on reactive astrocyte genes, as described in previous transcriptional studies [14, 48]. Strikingly, SOCS3 reduced the expression of genes from all three categories of reactive markers (pan, A1 and A2) that were induced in APP astrocytes (Fig. 3a). Few genes were not down-regulated by SOCS3, suggesting that even if SOCS3-expressing astrocytes show a significant down-regulation of reactive genes, they may

still not be fully comparable to normal astrocytes from WT mice. Last, to gain insight into the transcriptional networks regulated by SOCS3 in APP astrocytes, we performed a weighted gene correlation network analysis (WGCNA). This statistical method identifies modules of co-regulated genes across samples. One module among 19 was identified as differentially expressed between the three groups ($p = 0.018$, Fig. 3b). This module was comprised of 567 genes mainly down-regulated by SOCS3 (Fig. 3c). Interestingly, this module contained several pan (*Gfap*, *Vimentin*), A1 (*Serping1*, *H2-D1*, *Srgn*) and A2 (*Tm4sf1*, *CD14*) genes (Additional file 5: Table S2), emphasizing that markers of these two extreme classes are co-regulated by SOCS3. This module also contained genes related to inflammation (e.g. *C1qa*, *C1qb*, *C1qc*, *Ccl3*, Additional file 5: Table S2, Additional file 6: Figure S4). We performed an interaction network analysis with STRING on the 100 most connected genes of the module. Gene networks linked to complement system/inflammation were identified, as well as cytoskeleton and cell adhesion, which may underlie the morphological changes characteristic of reactive astrocytes (Additional file 6: Figure S4).

Overall, these results show that SOCS3 operates as a master inhibitor on transcriptional programs of reactivity, regulating different neuroinflammatory markers in reactive astrocytes.

JAK2-STAT3-mediated astrocyte reactivity promotes amyloid deposition in APP mice

The identification of a master regulator of reactive astrocytes makes it possible to evaluate their overall contribution to AD pathological outcomes. We first investigated the impact of JAK2-STAT3-mediated astrocyte reactivity on amyloid deposition, a major histopathological hallmark of AD [24]. SOCS3-mediated inhibition of astrocyte reactivity significantly reduced the number of BAM10⁺ amyloid plaques in the hippocampus of 9 month-old APP mice (Fig. 4a, b). This effect was also observed after labeling plaques with methoxy-XO4 (MXO4), a fluorescent Congo red-derivative that binds

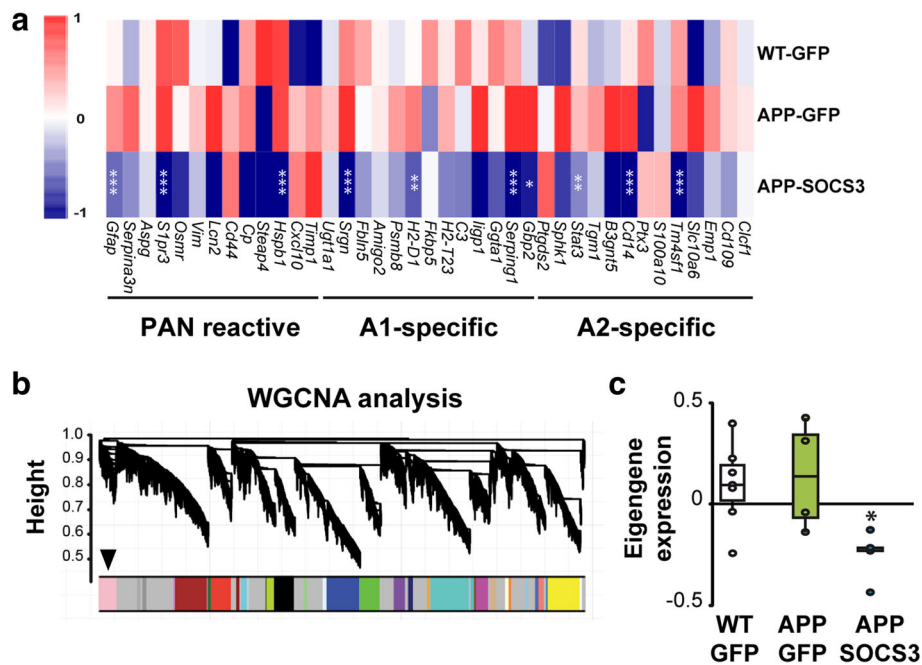


Fig. 3 SOCS3 inhibits the expression of reactive astrocyte markers. **a**, Heatmaps of genes belonging to the pan, A1 or A2 reactive astrocyte cassettes. SOCS3 decreases the expression of markers belonging to all categories, in APP astrocytes. Color scales represent mean-centered expression (log₂-transformed). Wald test. **b**, Dendrogram obtained by WGCNA with the significant module indicated with an arrow. **c**, The significant WGCNA module is mainly formed by genes down-regulated by SOCS3. ANOVA. $N = 7-4-5$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

aggregated amyloid (-36% , $p < 0.05$, Student t test, data not shown). Importantly, over-activation of astrocytes with JAK2ca had opposite effects (Fig. 4a, b). The average size of individual plaques was identical between groups, suggesting that only the number, not the properties of plaques was impacted by SOCS3 (Fig. 4c). Levels of soluble human amyloid β (A β)₄₂ and A β ₄₀ peptides, and their ratio were not significantly different between APP-GFP, APP-SOCS3 or APP-JAK2ca mice (Fig. 4d). Moreover, changes in amyloid plaque load were not due to changes in the expression of proteins involved in amyloid precursor protein (APP) metabolism. Indeed, protein levels of APP itself, of the pro-amyloidogenic β -secretase BACE1, or of insulin degrading enzyme (IDE) and apolipoprotein E (ApoE), two proteins released by astrocytes and involved in A β elimination, were not impacted by SOCS3 or JAK2ca (Additional file 7: Figure S5).

We then focused on SOCS3, as its plaque lowering effects were more therapeutically relevant. Because microglia play a key role in amyloid plaque elimination via phagocytosis [42], we investigated whether inhibition of astrocyte reactivity increases microglia phagocytic activity, which could explain decreased amyloid load in APP-SOCS3 mice. The number of IBA1⁺ microglial cells in contact with MXO4⁺ amyloid plaques was not different between APP-SOCS3 and APP-GFP mice (Fig. 4e, f).

MXO4 also labelled intracellular amyloid material in IBA1⁺ microglial cells on brain sections. In fact, more than 95% of microglia cells in contact with plaques were MXO4⁺, revealing active microglial phagocytosis of amyloid plaques (Fig. 4g, h). MXO4⁺ material was either localized at the membrane or within the soma (Fig. 4g), but the relative localization of MXO4⁺ within microglia was not different between APP-SOCS3 and APP-GFP mice (Fig. 4h). To have dynamic quantification of microglia (and astrocyte) phagocytic capacity, MXO4 was injected *i.p.* 3 h before mouse sacrifice and its accumulation within dissociated brain cells was monitored by FACS. Astrocytes were identified by their GFP expression, while microglial cells were labelled with CD11b and CD45 antibodies (Fig. 4i). The percentages of GFP⁺ astrocytes (4%) and total microglial cells (14%) were not different between WT-GFP, APP-GFP and APP-SOCS3 mice (data not shown). No MXO4 uptake was detected in WT cells (Fig. 4j). Strikingly, we found no evidence for active MXO4 uptake in GFP⁺ astrocytes (Fig. 4j). In addition, the expression of several receptors or proteins involved in phagocytosis (*Abca1*, *ApoE*, *Axl*, *Gulp1*, *Itgav*, *Itgb5*, *Ldlr*, *Lrp1*, *Megf10*, *Mertk*, [10, 55]) were expressed at similar levels in astrocytes of the three groups or only down-regulated by SOCS3 (*Fcer1g*, *Fcgr2b* and *Fcgr3*, Additional file 8: Table S3), further suggesting that astrocyte phagocytosis is not involved in

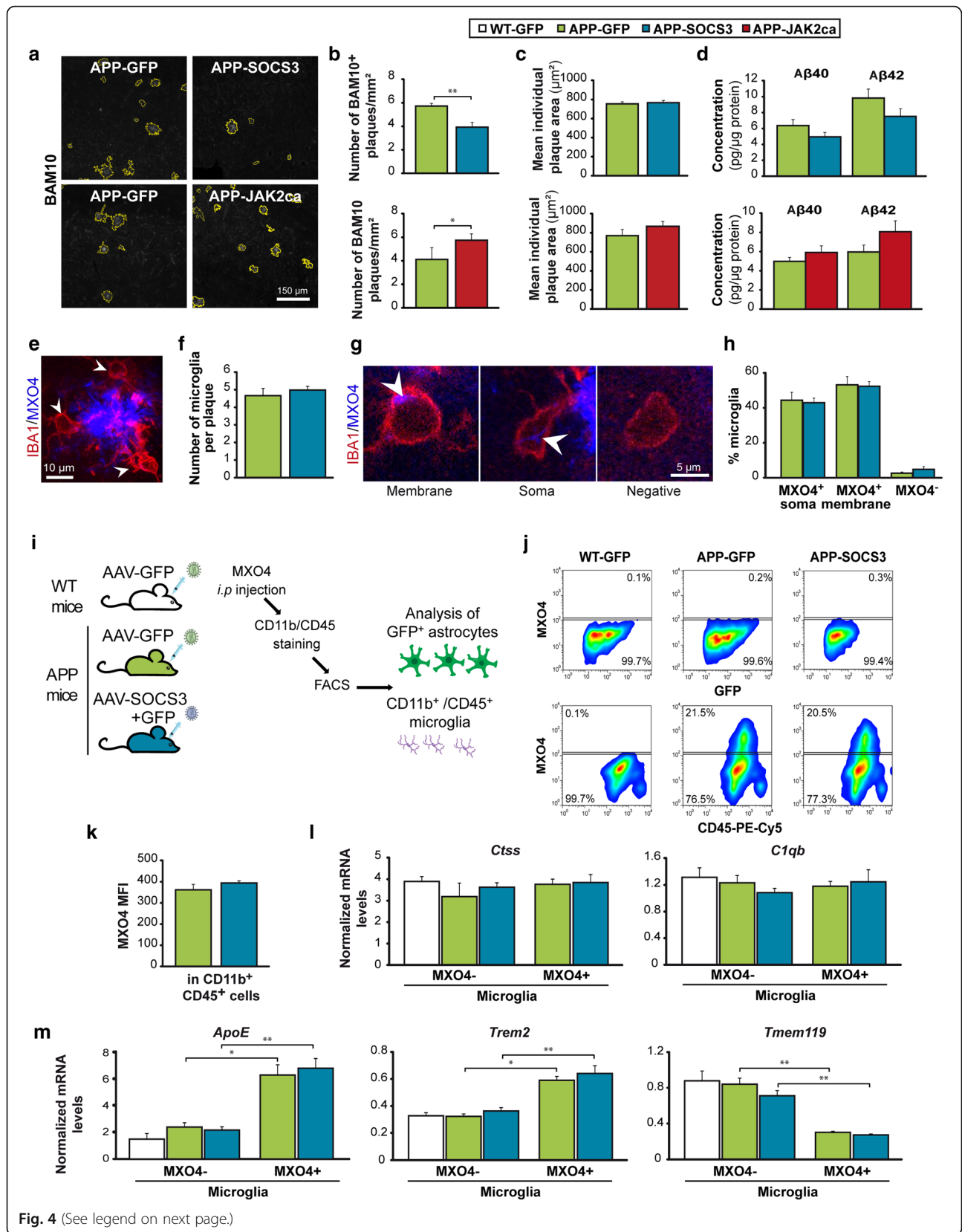


Fig. 4 (See legend on next page.)

(See figure on previous page.)

Fig. 4 Inhibition of JAK2-STAT3-mediated astrocyte reactivity reduces amyloid load in APP mice without impacting microglial cells **a**, Representative images of BAM10⁺ amyloid plaques (white) automatically delineated in yellow in APP-GFP, APP-SOCS3 and APP-JAK2ca mice. **b**, The number of hippocampal BAM10⁺ plaques is significantly decreased by SOCS3 ($N = 9-8$) and increased by JAK2ca in APP mice ($N = 6-6$). SOCS3 and JAK2ca effects were measured in two independent cohorts. **c**, The average size of individual BAM10⁺ amyloid plaque is similar between groups. **d**, Dosage of A β 40 and A β 42 peptide concentrations in Triton-X100-soluble protein homogenates from the hippocampus of APP-GFP ($N = 10$ or 6), APP-SOCS3 ($N = 8$) and APP-JAK2ca mice ($N = 6$). A β 40 and 42 levels are not significantly different between groups. **e**, IBA1⁺ microglial cells (red, arrowheads) in contact with a MXO4⁺ amyloid plaque (blue). **f**, The number of microglia per plaque is similar between APP-GFP and APP-SOCS3 mice. $N = 10-8$. **g**, Confocal images of MXO4⁺ material (blue) in IBA1⁺ microglial cells (red). Microglial cells in contact with plaques either display MXO4 staining (white arrowhead) at the membrane, in the cytosol or are MXO4⁻. **h**, The proportion of these three classes of microglial cells is not different between groups. $N = 10-8$. **i**, Experimental design to monitor A β phagocytosis. WT-GFP ($N = 10$), APP-GFP ($N = 6$) and APP-SOCS3 ($N = 8$) mice were injected with MXO4, 3 h before sacrifice. After staining, hippocampal CD11b⁺/CD45⁺ microglia and GFP⁺ astrocytes were analyzed by FACS. **j**, Representative gates to analyze MXO4⁺ amyloid uptake in astrocytes and microglia. There are 20% MXO4⁺ microglial cells in both APP-GFP and APP-SOCS3 groups and no MXO4⁺ astrocytes. **k**, No difference in the MXO4 median fluorescent intensity (MFI) is observed between APP-GFP and APP-SOCS3 microglial cells. **l-m**, RT-qPCR analysis on microglial cells acutely isolated from the hippocampus of 12 month-old WT-GFP, APP-GFP and APP-SOCS3 mice. **l** mRNA levels of *Ctss* and *C1qb*, two microglial homeostatic genes, is similar in all groups. **m**, *ApoE* and *Trem2* mRNA levels are higher in phagocytic MXO4⁺ microglia than non-phagocytic MXO4⁻ microglia, while *Tmem119* levels are lower in MXO4⁺ microglia. This transcriptional profile is reminiscent of DAM microglia [34]. Astrocyte de-activation by SOCS3 does not impact the transcriptional profile of either type of microglia. $N = 3-8$ /group. **b, d, h**, Student t test. **c, f, k**, Kruskal-Wallis test. **l, m**, One way ANOVA to compare the 3 groups within MXO4⁻ cells and Student t test to compare two groups within MXO4⁺ cells. Mann-Whitney test to compare MXO4⁺ and MXO4⁻ microglial cells within APP-GFP or APP-SOCS3 groups. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

reduced amyloid deposition with SOCS3. In contrast to astrocytes, ~20% of CD11b⁺/CD45⁺ microglial cells accumulated MXO4⁺ material in both APP-GFP and APP-SOCS3 mice (Fig. 4j). MXO4 median fluorescent intensity in microglia was not different between these two groups (Fig. 4k). A sub-class of microglia with active phagocytic capacities was recently described as « disease-associated microglia » DAM, [34]. It is possible that inhibition of astrocyte reactivity with SOCS3 only impacts a specific class of microglial cells like DAM. To explore this possibility, expression of genes specific for homeostatic microglia (*Ctss* and *C1qb*) and DAM cells were analyzed in MXO4⁻ and MXO4⁺ microglial cells. MXO4⁺ microglia had a gene profile characteristic of DAM (up-regulation of *ApoE* and *Trem2*; downregulation of *Tmem119*), consistent with the strong phagocytic activity of these cells. SOCS3 expression in astrocytes did not change the levels of homeostatic microglia or DAM-specific markers (Fig. 4l, m).

Overall, we show that SOCS3 does not significantly impact microglial molecular profile or phagocytic capacity. The reduction in amyloid deposition with SOCS3 is not due to enhanced phagocytosis by glial cells.

Inhibition of astrocyte reactivity improves spatial learning in APP mice

We next tested whether SOCS3-mediated inhibition of astrocyte reactivity improved behavioral defects in APP mice. Nine month-old WT-GFP, APP-GFP and APP-SOCS3 mice were tested on the Morris water maze to assess spatial learning and memory. Swim speed was not different between groups ($p = 0.63$ for group effect,

repeated-measure ANOVA). As previously described [16], APP-GFP mice displayed delayed task learning, as they only improved their ability to find the hidden platform by training day 4, while WT-GFP mice achieved this performance by day 2 (Fig. 5a, repeated-measures ANOVA $p = 0.0136$ for group effect, $p < 10^{-6}$ for day effect). By contrast, APP-SOCS3 mice learnt the task as quickly as WT-GFP mice, showing that SOCS3 corrects learning deficits in APP mice. Mice were probed for spatial memory 72 h after the last day of training. WT-GFP mice displayed the expected preference for the target quadrant, while APP-GFP mice explored all quadrants similarly (Fig. 5b). SOCS3 did not improve spatial memory in APP mice (Fig. 5b), showing that inhibition of hippocampal astrocyte reactivity by SOCS3 improves spatial learning but not memory retrieval in APP mice.

SOCS3 restores synaptic transmission and plasticity in 3xTg mice

Given that astrocyte reactivity inhibition restores a complex behavioral task, we then examined the underlying cellular mechanisms in acute hippocampal slices. We studied synaptic transmission and plasticity, which are altered in AD [74] and regulated by astrocytes [5]. For this study, we used 3xTg-AD mice (thereafter called 3xTg mice) that display more robust synaptic deficits than APP mice [50]. 3xTg mice show early impairment in synaptic transmission and long-term plasticity before amyloid and Tau pathology [59]. 3xTg mice were injected at 3–4 months with AAV-GFP or AAV-SOCS3 + AAV-GFP (3xTg-GFP and 3xTg-SOCS3 mice respectively) and studied 5 months later, when they display synaptic deficits and higher GFAP levels [11, 53] but before

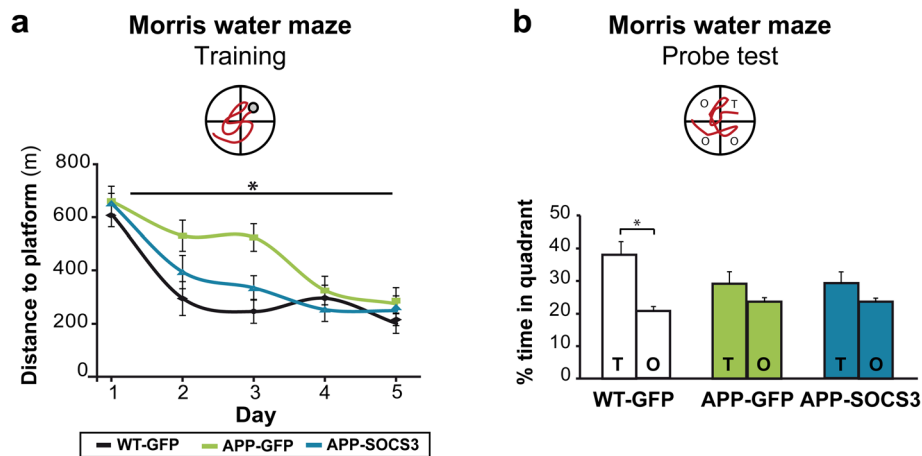


Fig. 5 Inhibition of STAT3-mediated astrocyte reactivity improves spatial learning in APP mice **a**, Training phase of the Morris water maze. APP-GFP mice ($N = 12$) need more trials to learn the task than WT-GFP mice ($N = 11$). This learning deficit is corrected by SOCS3 expression in APP astrocytes ($N = 11$). Repeated-measures ANOVA. **b**, Probe phase of the Morris Water maze, 72 h after the last training session. Unlike WT-GFP mice, APP-GFP mice do not display preference for the target quadrant (T) over other quadrants (O). This memory deficit is not corrected by SOCS3. Wilcoxon test. * $p < 0.05$

amyloid plaque and Tau deposition ([59], Fig. 6a). Like in APP mice, SOCS3 was able to block astrocyte reactivity in the hippocampus of 3xTg mice, as seen by significantly lower GFAP levels in 3xTg-SOCS3 mice than in 3xTg-GFP mice (Fig. 6b). We then studied basal glutamatergic synaptic transmission, short-term and long-term synaptic plasticity in acute hippocampal slices prepared from the three groups. Field excitatory post-synaptic potentials (fEPSPs) were recorded in the infected, GFP⁺ region of the *stratum radiatum* in the CA1 area (Fig. 6a). As reported previously in 3xTg-GFP mice [59], the input-output relationship for evoked fEPSPs at CA3-CA1 synapses was shifted to the right, indicating impaired basal glutamatergic synaptic transmission (Fig. 6c). This was probably not due to a modification of glutamate release probability because the paired-pulse ratio was unchanged (Fig. 6c, d). Interestingly, inhibition of astrocyte reactivity by SOCS3 rescued the input-output relationship (Fig. 6c). As reported before [59], LTP induced by high frequency stimulation (HFS) of Schaffer collaterals was impaired in 3xTg-GFP mice, in comparison to WT-GFP mice that displayed a 50% increase in fEPSPs after HFS (Fig. 6e, f). Strikingly, SOCS3 fully restored LTP deficits in 3xTg mice (Fig. 6e, f), suggesting that astrocyte reactivity plays a major role in AD-related synaptic alterations, and that these alterations can be reversed.

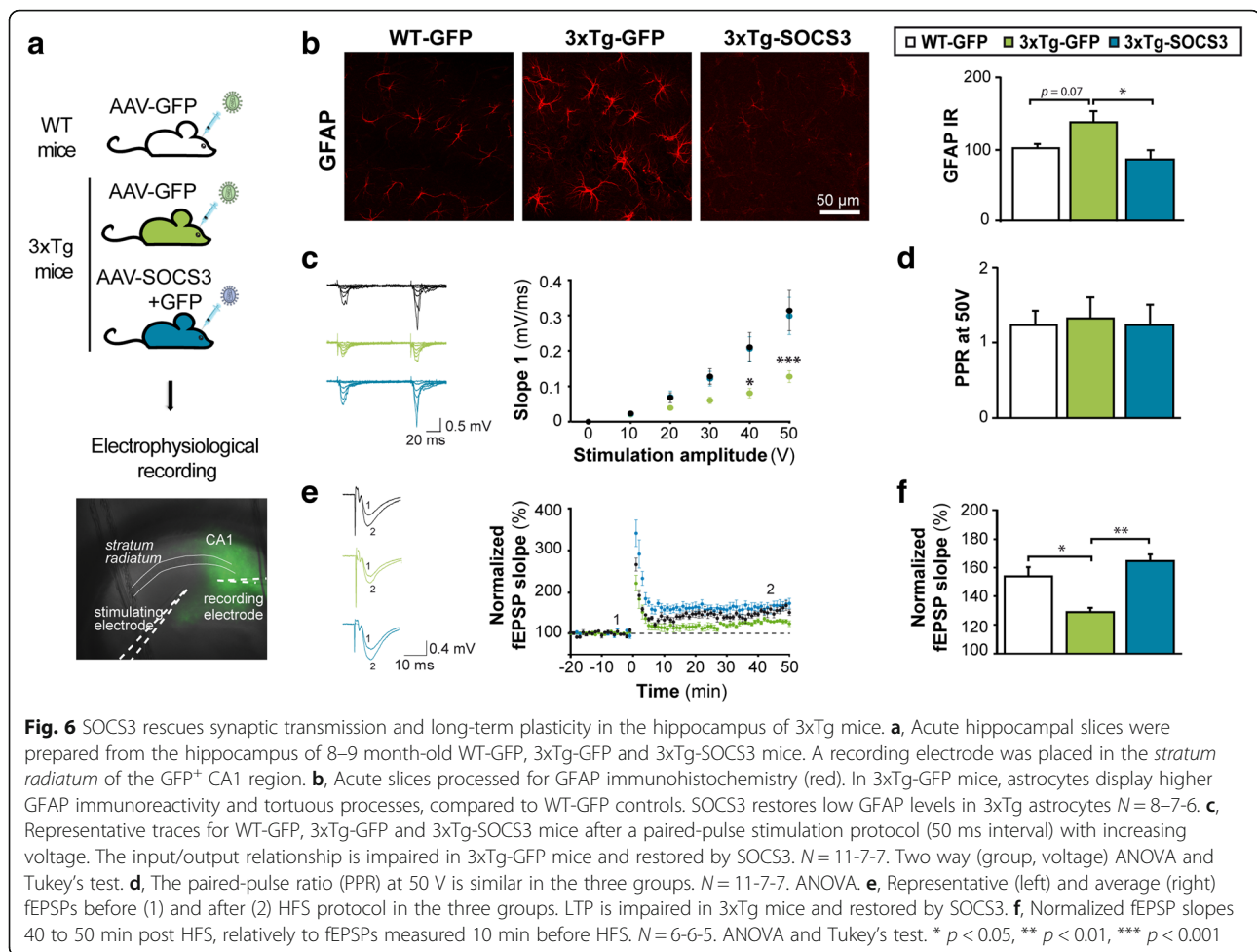
JAK2-STAT3 pathway activation in astrocytes induces reactivity and synaptic alterations

We reasoned that if synaptic deficits in 3xTg mice are due to JAK2-STAT3 pathway activation in astrocytes, its

stimulation in naïve WT mice should result in comparable synaptic deficits.

To this end, we first studied whether activation of the JAK2-STAT3 pathway by JAK2ca was sufficient to induce astrocyte reactivity in the hippocampus of WT mice (Fig. 7a). As expected, we found that JAK2ca significantly increased STAT3 immunoreactivity in hippocampal astrocytes (Fig. 7b, c). Importantly, immunoreactivity for GFAP was increased in a large part of the hippocampus of WT-JAK2ca mice (Fig. 7d-f). JAK2ca-astrocytes also over-expressed vimentin (Fig. 7e) and had enlarged soma with tortuous processes (Fig. 7e, g). RT-qPCR analysis on acutely isolated astrocytes from WT-JAK2ca or WT-GFP mice confirmed that JAK2ca significantly increased mRNA levels of reactive genes (*Gfap*, *serpina3n*) in astrocytes (Fig. 7h). Overall, activation of the JAK2-STAT3 pathway in astrocytes was sufficient to induce morphological and molecular hallmarks of reactivity in the complete absence of pathological environment.

We then recorded synaptic activity in the infected GFP⁺ hippocampal CA1 region of WT-GFP and WT-JAK2ca mice (Fig. 8a). JAK2ca-mediated astrocyte reactivity impaired basal glutamatergic synaptic transmission (Fig. 8b) but it did not impact the paired-pulse ratio (Fig. 8c). Strikingly, HFS protocol failed to induce LTP in JAK2ca mice, as in 3xTg mice, while it induced a 60% increase in fEPSP in WT-GFP mice (Fig. 8d, e), showing that JAK2ca causes significant deficits in long-term synaptic plasticity. Taken together, our results show that JAK2-STAT3-mediated astrocyte reactivity induces synaptic dysfunction in the hippocampus, and is a potent target for synaptic restoration in AD.



Discussion

In this study, we combined astrocyte-targeted viral gene transfer, histology, biochemical analysis, cell sorting, astrocyte-specific transcriptomics, behavioral analysis and electrophysiology, in mouse models of AD and naïve WT mice. We used two transgenic mouse models of AD that recapitulate amyloid deposition, synaptic and behavioral alterations characteristic of AD, as well as progressive astrocyte reactivity including morphological and molecular changes. We found that inhibition of the JAK2-STAT3 pathway normalizes several features of astrocyte reactivity and improves three key pathological hallmarks in AD mouse models, showing that reactive astrocytes have deleterious effects in AD (Fig. 9).

The JAK2-STAT3 pathway controls astrocyte reactivity

We previously reported that STAT3 is activated in reactive astrocytes in several mouse and primate models of ND [8], and the active, phosphorylated form of STAT3 is found in some hippocampal GFAP⁺ astrocytes in AD patients [81]. STAT3 is also activated in

reactive astrocytes in acute CNS diseases such as ischemia, or spinal cord injury [12, 61]. Many molecular triggers are able to activate STAT3 (e.g. cytokines, growth factors, as well as ephrins [80] or the Notch pathway [41]). Therefore, despite the variety of pathological stimuli associated with these disorders, they appear to converge, either directly or indirectly, on STAT3, making STAT3 activation a universal feature of astrocyte reactivity.

We used viral gene transfer in the mouse brain to inhibit or activate the JAK2-STAT3 pathway in astrocytes and identified this cascade as a master regulator of astrocyte reactivity. We show that overexpression of a constitutively active form of JAK2 in WT astrocytes is sufficient to trigger robust astrocyte reactivity in the hippocampus, in the absence of pathological stimulus. By expressing the inhibitor SOCS3 in astrocytes, we also showed that the JAK2-STAT3 pathway controls astrocyte reactivity in two mouse models of AD. Interestingly, SOCS3 was not only able to prevent, but also to reverse astrocyte reactivity in the hippocampus of aged APP mice. Thus, activation of

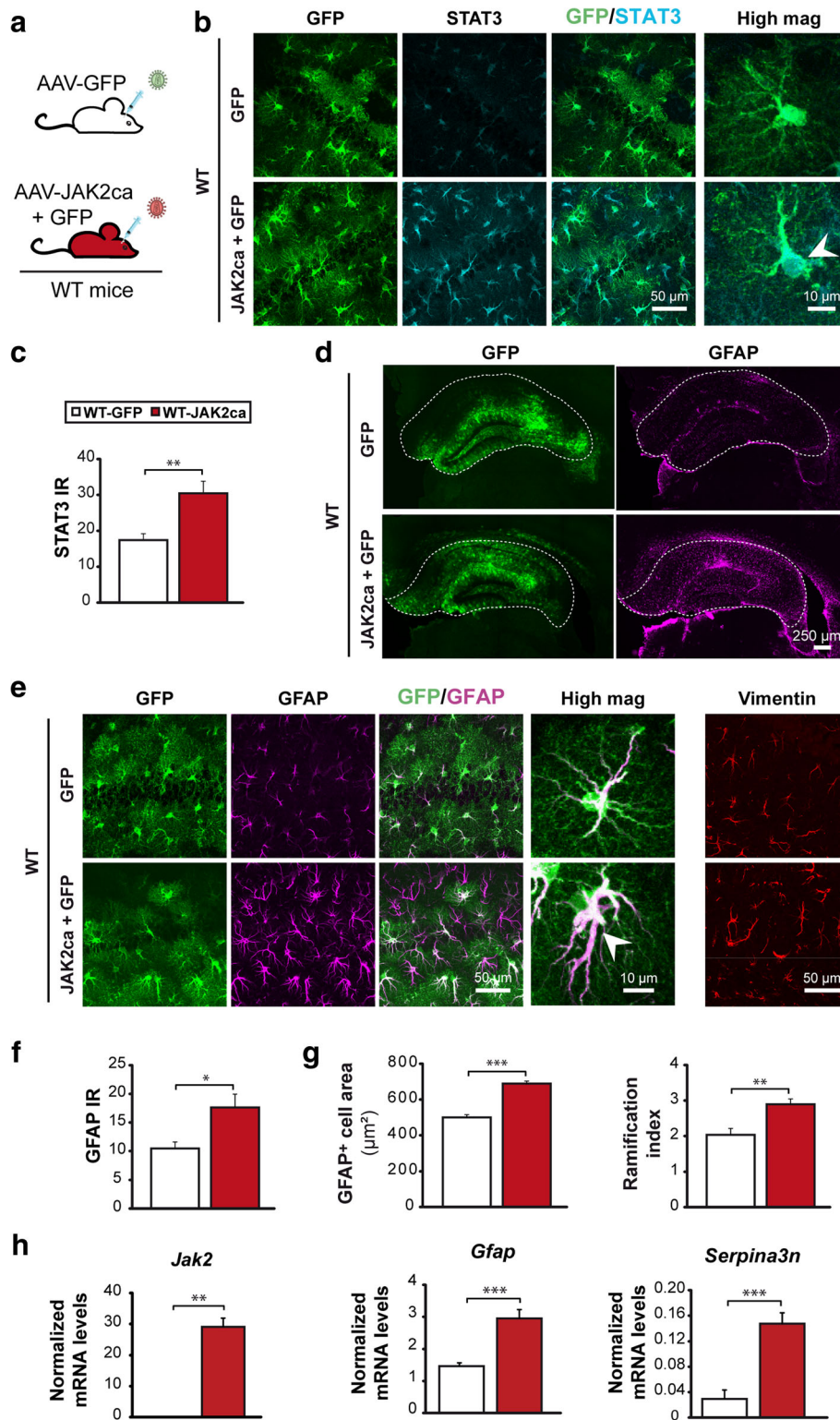


Fig. 7 (See legend on next page.)

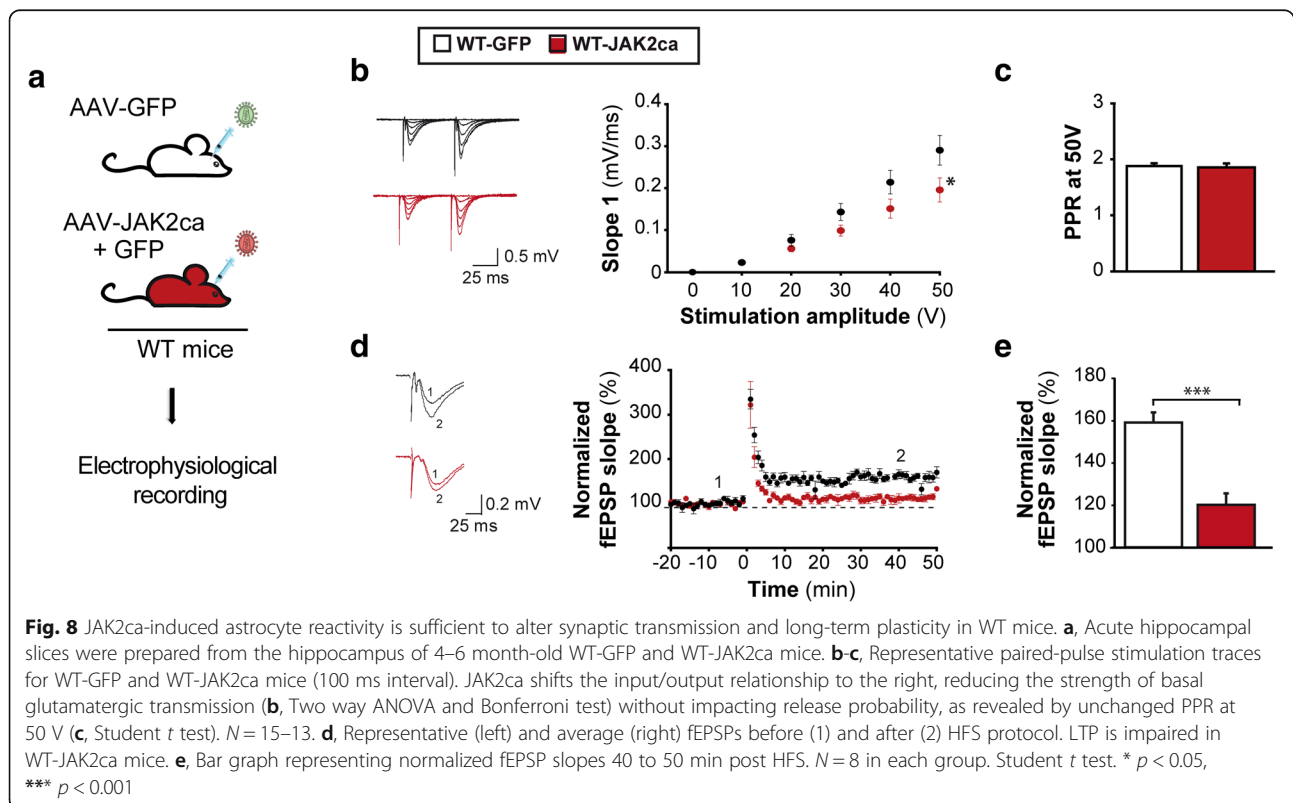
(See figure on previous page.)

Fig. 7 JAK2ca activates the JAK2-STAT3 pathway and induces astrocyte reactivity. **a**, WT mice were injected in the hippocampus with AAV-GFP alone ($N = 6$) or AAV-JAK2ca + AAV-GFP (JAK2ca + GFP, $N = 6$) at the same total viral titer and were studied 1–2 months later. **b**, Confocal images of hippocampal sections, stained for GFP (green) and STAT3 (cyan) in WT-GFP or WT-JAK2ca mice. JAK2ca induces STAT3 upregulation and nuclear accumulation in astrocytes, indicating STAT3 activation (arrowhead). **c**, STAT3 IR quantification in astrocyte nucleus from images in **b**. **d**, Representative low magnification images showing the transduced area (GFP⁺, green) and corresponding GFAP staining (magenta) in the hippocampus of WT-GFP and WT-JAK2ca mice. JAK2ca increases GFAP levels in a large part of the hippocampus (outlined). **e**, Confocal images of astrocytes stained for GFP (green), GFAP (magenta) and vimentin (red) in WT-GFP and WT-JAK2ca mice. JAK2ca increases GFAP and vimentin expression in hippocampal astrocytes and induces morphological changes. **f**, GFAP IR is increased by 70% in JAK2ca-injected hippocampus. **g**, Sholl analysis applied to GFAP-labelled astrocytes shows that reactive astrocytes in WT-JAK2ca mice have a larger domain area and a higher ramification index, a measure of cell complexity. **h**, RT-qPCR analysis was performed on acutely sorted hippocampal astrocytes from WT-GFP and WT-JAK2ca mice. *Jak2*, *Gfap* and *Serpina3n* are significantly overexpressed in WT-JAK2ca astrocytes. $N = 7$ /group. **c**, **f**, **g**, Student *t* test. **h**, *Gfap*, *Serpina3n*: Student *t* test, *Jak2*: Mann-Whitney test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

the JAK2-STAT3 pathway is necessary both for the induction and persistence of many aspects of astrocyte reactivity (Fig. 9). Contrary to conditional approaches used in acute injury models [4, 26, 61], our SOCS3-based strategy to block reactivity has the advantage of inhibiting only the JAK-dependent effects of STAT3, without impacting other non-canonical functions of STAT3 that do not require phosphorylation on Tyrosine 705 [12]. In addition, our virus-based method provides a local and time-controlled inhibition of the JAK-STAT3 pathway, avoiding peripheral or developmental side effects. SOCS3 is a specific inhibitor of the JAK-STAT3 cascade thanks to its dual recognition of JAK and the phosphorylated motif on the cytokine

receptor [6, 35]. We controlled that SOCS3 overexpression did not affect other signaling cascades. We did not find evidence for ERK or STAT1 activation in APP astrocytes and no further effect of SOCS3, suggesting that STAT3 is the main transcription factor regulated by SOCS3 in our conditions.

We found that SOCS3 regulates many genes linked to inflammation and immunity that are induced in astrocytes of AD mouse models (our data and [45, 62]) and in astrocytes of AD patient brains [62, 73]. In particular, several genes encoding cytokines and complement factors, which are associated with synaptic alterations and molecular defects characteristic of AD [25, 45, 78], were down-regulated by SOCS3.



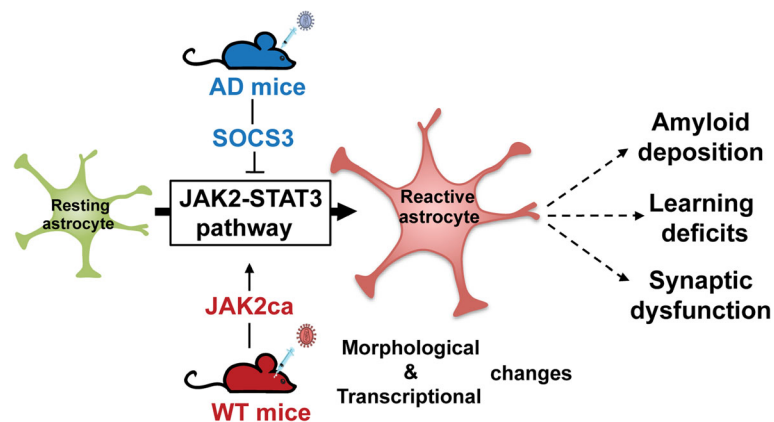


Fig. 9 The JAK2-STAT3 pathway is a master regulator of astrocyte reactivity that contributes to AD deficits. SOCS3-mediated inhibition of this cascade in AD mouse models blocked and even reversed morphological and molecular hallmarks of reactivity. Conversely, activation of the JAK2-STAT3 pathway by viral gene transfer of JAK2ca in WT mice was sufficient to induce those hallmarks. Inhibition of this cascade in AD mice reduced amyloid deposition, deficits in spatial learning and synaptic dysfunction, showing that reactive astrocytes significantly contribute to AD pathological outcomes

Interestingly, the induction of some SOCS3-regulated genes was shown to be dependent on STAT3, in a model of spinal cord injury in mice with an astrocyte-specific knock out of STAT3 [4]. Our study is of high therapeutic relevance for AD as it identifies the cascade controlling the transcription of neuroinflammatory genes by astrocytes. It will be important to measure how those inflammatory mediators are impacted by SOCS3 at the protein level.

Besides the JAK2-STAT3 pathway, other signaling cascades were reportedly activated during AD [7, 33]. But only a few cascades have been specifically manipulated in astrocytes to test their requirement for reactivity during AD. Constitutive activation of calcineurin in APP mice decreases astrocyte reactivity [19]. Surprisingly, the opposite manipulation of the calcineurin/Nuclear Factor of Activated T-cells (NFAT) pathway by expression of a blocking peptide in astrocytes also attenuates reactivity in the same mouse model [22], questioning the regulatory action of this pathway. Activation of the Nuclear Factor of κ light polypeptide gene enhancer in B-cells (NF- κ B) pathway in astrocytes, through a conditional knock-out of the I κ B α inhibitor or by expression of a constitutively active IKK, increases glial reactivity in the cortex and hippocampus of WT and AD mice [44, 60]. But, to our knowledge, the specific inhibition of this cascade in astrocytes has not been performed in AD models. Overall, modulation of calcineurin/NFAT or NF- κ B pathways appear to have inconsistent, transient or moderate effects on astrocyte reactivity in AD models. On the contrary, we studied two mouse models of AD (APP and 3xTg) and observed consistent effects of JAK2-STAT3 pathway

modulation on astrocyte reactivity. Importantly, these effects were remarkably stable over time, lasting up to 9 months post-injection.

The concept of reactive astrocyte heterogeneity is emerging [3, 47], especially with the recent description of A1 and A2 subtypes of reactive astrocytes [48, 68, 76, 84]. Reactive astrocytes may thus form discrete subtypes with specific molecular and functional properties. The precise signaling pathways controlling these reactive states are still unknown. Unexpectedly, we found that SOCS3 regulates the expression of pan, A1 and A2 specific genes. In fact, the core WGCNA module of SOCS3-regulated genes contained all types of reactive markers. These results suggest that SOCS3 mediates a global inhibition of astrocyte reactivity, which operates beyond specific classes of reactive astrocytes. In this study, we did not explore the effects of SOCS3 in WT astrocytes, it will be interesting to see whether SOCS3 also regulates the transcriptome of astrocytes and some of their functions when they are not in an AD pathological environment.

Surprisingly, we found that inhibition of astrocyte reactivity in APP mice by SOCS3 did not impact the molecular and functional features of microglial cells. Microglia and astrocytes are engaged in complex bidirectional communications [25]. In particular, reactive microglial cells are reported to play a key role in triggering astrocyte reactivity in inflammatory conditions [70]. Our results, suggest that, at least in AD, reactive astrocytes do not significantly regulate microglial activation. Microglial cells may be already strongly activated by toxic amyloid proteins and neuronal dysfunction as occurring in AD.

Reactive astrocytes contribute to pathological outcomes in AD models

We found that inhibition of astrocyte reactivity by SOCS3 reduces the number of amyloid plaques in APP mice, a key pathological hallmark of AD. Intriguingly, the average size of plaques and the overall size distribution were not changed, suggesting that SOCS3 reduces amyloid seeding into plaques, but once amyloid plaques form, their growth and evolution are not impacted. Amyloid production, aggregation and clearance involve several brain cell types, including neurons that produce the bulk of A β peptides and microglial cells that actively degrade amyloid plaques. Astrocytes may produce low levels of A β as well [46] and are able to degrade amyloid plaques [37, 79, 82]. However, our FACS analysis evidenced no A β phagocytosis in astrocytes, and RNAseq data showed no increase in the expression of phagocytic receptors in astrocytes, suggesting that SOCS3-astrocytes do not contribute to A β phagocytosis. In addition, we ruled out microglial involvement in enhanced A β clearance in the SOCS3 group. Last, stable levels of soluble A β 40 and A β 42, as well as proteins involved in APP metabolism, suggest that A β production is not altered by JAK2-STAT3 pathway modulation in astrocytes. The molecular and cellular mechanisms responsible for the reduced number of amyloid plaques with SOCS3 are still unknown. Astrocytes were recently shown to contribute to A β elimination through the glymphatic system, which allows perivascular drainage of interstitial fluid to remove soluble brain waste [29]. SOCS3 could improve this clearance mechanism, thereby diverting soluble A β from aggregating into plaques. It is however quite difficult to test this hypothesis, as available methods to probe the glymphatic system lack spatial resolution to quantify SOCS3 local effects in the hippocampus.

We also report that SOCS3-mediated inhibition of astrocyte reactivity restores spatial learning on the Morris water maze, without correcting deficits in memory retrieval at 72 h. It is striking that expression of SOCS3 in only 25% of hippocampal astrocytes is able to restore spatial learning. Spatial learning is a hippocampal-dependent task [56], and it is now well documented that astrocytes are able to regulate hippocampal circuits and impact behavior [1, 66, 69]. However, the local action of AAV on hippocampal astrocytes may explain why long term memory was not corrected by AAV-SOCS3 in APP mice, because storage and retrieval of spatial memories mostly involve neocortical regions, which are not targeted by AAVs [52]. The finding that hippocampal astrocyte reactivity contributes to learning deficits in APP mice and is amenable to restoration by SOCS3 opens new therapeutic applications for AD.

Further demonstrating SOCS3 therapeutic potential, we found that its expression in astrocytes fully restored early synaptic and LTP alterations in 3xTg mice. Partial reduction in astrocyte reactivity by NFAT inhibition also improves synaptic transmission in aged APP mice [22]. Here, we uncover an implication of reactive astrocytes in the initial stages of synaptic dysfunction, before overt amyloid and Tau pathology, stressing the importance of astrocytes as therapeutic targets for AD. In accordance, we found that induction of astrocyte reactivity by JAK2ca was sufficient to induce synaptic deficits in WT mice, similar to those observed in 3xTg mice. Astrocytes regulate synaptic transmission by promoting ion homeostasis, recycling neurotransmitters or releasing active molecules such as gliotransmitters [5, 64, 65]. Some of these mechanisms are altered in AD mouse models [7, 15, 31] and could be restored by SOCS3. In addition, mRNA levels of several synaptotoxic complement factors [45, 78] were reduced by SOCS3. It is thus possible that SOCS3 normalizes several aspects of neuron-astrocyte interactions at the synapse, and further experiments will be needed to identify the exact mechanisms at play. Our model of JAK2ca-induced astrocyte reactivity will be helpful to isolate astrocyte-specific mechanisms of synaptic impairment.

The fact that JAK2-STAT3-mediated astrocyte reactivity contributes to three AD pathological outcomes contrasts with the beneficial effects of astrocytic STAT3 in spinal cord injury [4] or lack of effects after chemical lesions [58]. It is possible that some, but not all, astrocyte functions are regulated by this pathway. Depending on the disease context, STAT3-mediated astrocyte reactivity may thus have variable effects.

Conclusion

We show that the JAK2-STAT3 pathway is a core signaling cascade for the induction and maintenance of astrocyte reactivity. This pathway controls key morphological features and coordinates gene expression in reactive astrocytes. The JAK2-STAT3 pathway is a potent molecular target to establish the overall role of reactive astrocytes in CNS diseases. Our results show that in AD, reactive astrocytes are mostly deleterious, contributing to amyloid deposition, spatial learning deficits and synaptic dysfunction. Blocking astrocyte reactivity via the JAK2-STAT3 pathway offers new therapeutic opportunities for AD.

Additional files

Additional file 1: Figure S1. AAV infect astrocytes selectively. To validate astrocyte tropism of the AAVs used in our study, an AAV2/9 encoding GFP was injected in the hippocampus of WT mice. GFP⁺ cells co-express the astrocytic marker GFAP and S100 β , but not NeuN, IBA1,

Olig2 and MBP, which are markers of neurons, microglial cells, cells of the oligodendrocyte lineage and myelinating oligodendrocytes, respectively. Astrocyte tropism of these vectors was confirmed in AD mice as well (See colocalization of GFP with GFAP in Figs. 1b and S2). (TIF 14477 kb)

Additional file 2: Table S1. Sequences of primers used for qPCR. (DOCX 17 kb)

Additional file 3: Figure S2. Unlike STAT3, STAT1 and Erk are not activated in APP astrocytes. Confocal images of stained hippocampal sections from 12-month-old WT-GFP, APP-GFP and APP-SOCS3 mice. **a**, GFP⁺ astrocytes (green) stained for GFAP (magenta) and STAT3 (cyan). APP astrocytes are reactive (hypertrophic and GFAP overexpression). They display STAT3 nuclear accumulation. SOCS3 reduces GFAP and STAT3 expression in APP mice, even around amyloid plaques (star). **b**, Quantification of STAT3 immunoreactivity in astrocyte soma. $N = 5-7/\text{group}$. One way ANOVA and Tukey's post hoc test. $*** p < 0.001$. **c-d**, Sections stained in magenta for STAT1 (**c**) or P-ERK (**d**), DAPI (blue) and GFP (green). STAT1 and P-ERK are not induced in APP reactive astrocytes while CNTF induces significant STAT1 nuclear accumulation (**c**) and LPS triggers ERK phosphorylation (**d**). DAPI stains nuclei as well as amyloid plaques. Representative images from $N = 4-6/\text{group}$. (TIF 15218 kb)

Additional file 4: Figure S3. Validation of astrocyte sorting. Normalized expression of cell type specific genes. GFP⁺ astrocytes are enriched in astrocyte markers while GFP⁻ cells, which comprise uninfected astrocytes, neurons, microglial cells and oligodendrocyte precursor cells (OPC) are enriched in other cell type markers. Oligodendrocyte markers are undetectable due to the myelin removal step. $N = 3-7/\text{group}$. Wald test. $* p < 0.05$, $** p < 0.01$, $*** p < 0.001$, $\# p < 10^{-20}$, $### p < 10^{-40}$. (TIF 12358 kb)

Additional file 5: Table S2. WGCNA: Top 20 most connected genes regulated by SOCS3 in APP astrocytes. Three of the top 20 hub genes, highlighted in bold, are pan or A1 reactive astrocyte genes. (DOCX 17 kb)

Additional file 6: Figure S4. SOCS3 regulates gene networks linked to reactivity in APP astrocytes. The top 100 most connected genes of the WGCNA module were analyzed for protein-protein interaction networks with STRING. Groups of proteins related to complement system and inflammation, cytoskeleton and cell adhesion were found co-regulated by SOCS3 (circles). Protein-protein interaction p value $< 10^{-6}$. (TIF 54618 kb)

Additional file 7: Figure S5. Modulation of the JAK2-STAT3 pathway does not change expression of proteins involved in A β production and clearance in APP mice. Representative western blottings on protein homogenates prepared from WT-GFP, APP-GFP, APP-SOCS3 and APP-JAK2ca mice. The expression of human (hAPP) (**a**), BACE1 (**b**), IDE (**c**) and ApoE (**d**) are stable across the groups (protein levels are normalized by actin or tubulin α). $N = 3-8/\text{group}$. **a**, Student t test, **b-d**, ANOVA or Kruskal-Wallis tests. (TIF 10130 kb)

Additional file 8: Table S3. Expression of phagocytic receptors and genes in astrocytes RNAseq analysis of astrocytes shows that most genes involved in A β phagocytosis are expressed at similar levels in all groups. Only mRNA levels for three Fc receptors are down-regulated by SOCS3. Data are presented as normalized mRNA levels \pm SEM. $## p < 0.01$ versus WT-GFP, $** p < 0.01$, $*** p < 0.001$ versus APP-GFP. Wald test. (DOCX 18 kb)

Acknowledgments

We thank Drs. N. Robil and P. de la Grange from Genosplice Technology® for bioinformatics analysis of RNAseq data. We thank Profs. Haan, Bjørnbæk and Shoelton for sharing JAK2ca and SOCS3 plasmids. We thank Drs. S. Alves and N. Cartier for sharing their IDE antibody. We thank L. Vincent, K. Bastide, P. Woodling and J.M. Hélie for their help with mouse housing and transfer to Bordeaux; C. Garin and C. Duffe for help with the APP/PS1dE9 colony. We are grateful to F. Aubry for help with initial AAV vector cloning and FACS experiments; D. Cheramy and Dr. E. Diguët (Servier) for sharing their expertise and equipment for MSD® kits; Dr. L. Juricek and Dr. C. Jan for help with pilot experiments and Prof. N. Déglon for technical input at the initial part of the project. We acknowledge the help of V. Lavilla and C. Dulary on transcriptomic studies; D. Bacq and the QC team, the informatic and bioinformatic teams at the CNRGH. We thank D. Gonzales, S. Laumond, J. Tessaire and the NeuroCentre Magendie mouse facility staff for mouse care and genotyping. We are grateful to Dr. L. Schirmer for his comments and careful reading of an earlier version of the manuscript.

Funding

This study was supported by CEA, CNRS and grants from the French National Research Agency (grants # 2010-JCJC-1402-1, 2011-BSV4-021-03 and ANR-16-TERC-0016-01 to C.E. and 2011-INBS-0011 NeurATRIS to P.H.), from Fondation Vaincre Alzheimer (grant # FR-15015, to C. E.), Laboratory of Excellence in Medical Genomics: GENMED (to J-F.D.) as well as CNRS and INSERM (to S.H.R.O. and A.P.) and Association France Alzheimer and Fondation de France (Prix Spécial 2012 to G.B.). C.E. and A.P. received support from the Fédération pour la Recherche sur le Cerveau. K. Ceyzériat, L. Ben Haim and O. Guillemaud are recipients of a doctoral fellowship from the CEA.

Availability of data and materials

RNAseq dataset is deposited on the GEO server under reference GSE108520.

Authors' contributions

KCe, LBH, performed experiments, analyzed data and wrote the manuscript. AD, DP, MM, VL, JV performed and analyzed electrophysiological recordings. OG, LA performed experiments and analyzed data. MAP performed RNAseq experiments. PG, FP performed some histological stainings. MCG contributed to primer design and vector cloning. MGU, SB, GA, MGa helped with mouse surgery and breeding. CJ produced viral vectors. ND, JB performed cell sorting. KCa supervised the Morris water maze test. ABe supervised viral vector production. GB provided 3xTg mice. MD provided APP mice. GB, SHRO, JFD, PH, EB provided additional funding. MACS performed experiments, analyzed data and supervised some experiments. RO designed and supervised transcriptomic experiments. AP designed, analyzed and supervised electrophysiological recordings and wrote the manuscript. CE designed the study, obtained funding, analyzed data and wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Ethics approval and consent to participate

All experimental protocols were reviewed and approved by the local ethics committee (CETEA N°44) and submitted to the French Ministry of Education and Research (Approvals # APAFIS#4565-20 16031711426915 v3, APAFIS#4503-2016031409023019). They were performed in a facility authorized by local authorities (authorization #B92-032-02), in strict accordance with recommendations of the European Union (2010-63/EEC).

Consent for publication

Not applicable

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives, Département de la Recherche Fondamentale, Institut de Biologie François Jacob, MIRCen, 92260 Fontenay-aux-Roses, France. ²Centre National de la Recherche Scientifique, Université Paris-Sud, UMR 9199, Neurodegenerative Diseases Laboratory, 92260 Fontenay-aux-Roses, France. ³Neurocentre Magendie, INSERM U1215, 33077 Bordeaux, France. ⁴Université de Bordeaux, 33077 Bordeaux, France. ⁵Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives, Département de la Recherche Fondamentale, Institut de Biologie François Jacob, Centre National de Recherche en Génomique Humaine (CNRGH), F-91057 Evry, France. ⁶Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives, Département de la Recherche Fondamentale, Institut de Biologie François Jacob, Institut de Radiobiologie Cellulaire et Moléculaire, UMR 967 92260 Fontenay-aux-Roses, France. ⁷CEA-INSERM, Université Paris-Diderot et Université Paris-Sud, Paris, France. ⁸Present address: F.M. Kirby Neurobiology Center, Boston Children's Hospital, and Department of Neurology, Harvard Medical School, Boston, USA.

Received: 30 August 2018 Accepted: 24 September 2018

Published online: 16 October 2018

References

- Adamsky A, Kol A, Kreisel T, Doron A, Ozeri-Engelhard N, Melcer T et al (2018) Astrocytic activation generates De novo neuronal potentiation and memory enhancement. *Cell* 174:59–71 e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.05.002>
- Allaman I, Gavillet M, Belanger M, Laroche T, Viertl D, Lashuel HA et al (2010) Amyloid-beta aggregates cause alterations of astrocytic metabolic phenotype: impact on neuronal viability. *J Neurosci* 30:3326–3338. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5098-09.2010>
- Anderson MA, Ao Y, Sofroniew MV (2014) Heterogeneity of reactive astrocytes. *Neurosci Lett* 565:23–29. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.12.030>
- Anderson MA, Burda JE, Ren Y, Ao Y, O'Shea TM, Kawaguchi R et al (2016) Astrocyte scar formation aids central nervous system axon regeneration. *Nature* 532:195–200. <https://doi.org/10.1038/nature17623>
- Araque A, Carmignoto G, Haydon PG, Oliet SH, Robitaille R, Volterra A (2014) Gliotransmitters travel in time and space. *Neuron* 81:728–739. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.02.007>
- Babon JJ, Kershaw NJ, Murphy JM, Varghese LN, Laktyushin A, Young SN et al (2012) Suppression of cytokine signaling by SOCS3: characterization of the mode of inhibition and the basis of its specificity. *Immunity* 36:239–250. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.12.015>
- Ben Haim L, Carrillo-de Sauvage MA, Ceyzeriat K, Escartin C (2015) Elusive roles for reactive astrocytes in neurodegenerative diseases. *Front Cell Neurosci* 9:278. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00278>
- Ben Haim L, Ceyzeriat K, Carrillo-de Sauvage MA, Aubry F, Auregan G, Guillermier M et al (2015) The JAK/STAT3 pathway is a common inducer of astrocyte reactivity in Alzheimer's and Huntington's diseases. *J Neurosci* 35:2817–2829. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3516-14.2015>
- Burda JE, Sofroniew MV (2014) Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease. *Neuron* 81:229–248. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.12.034>
- Cahoy JD, Emery B, Kaushal A, Foo LC, Zamanian JL, Christopherson KS et al (2008) A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. *J Neurosci* 28:264–278. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4178-07.2008>
- Cantarella G, Di Benedetto G, Puzzo D, Privitera L, Loreto C, Saccone S et al (2015) Neutralization of TNFSF10 ameliorates functional outcome in a murine model of Alzheimer's disease. *Brain* 138:203–216. <https://doi.org/10.1093/brain/awu318>
- Ceyzeriat K, Abjean L, Carrillo-de Sauvage MA, Ben Haim L, Escartin C (2016) The complex STATes of astrocyte reactivity: how are they controlled by the JAK-STAT3 pathway? *Neuroscience* 330:205–218. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.05.043>
- Chun H, Lee CJ (2018) Reactive astrocytes in Alzheimer's disease: a double-edged sword. *Neurosci Res* 126:44–52. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2017.11.012>
- Clarke LE, Liddelow SA, Chakraborty C, Munch AE, Heiman M, Barres BA (2018) Normal aging induces A1-like astrocyte reactivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115:E1896–E1905. <https://doi.org/10.1073/pnas.1800165115>
- Delekate A, Fuchtemeier M, Schumacher T, Ulbrich C, Foddis M, Petzold GC (2014) Metabotropic P2Y1 receptor signalling mediates astrocytic hyperactivity in vivo in an Alzheimer's disease mouse model. *Nat Commun* 5:5422. <https://doi.org/10.1038/ncomms6422>
- Ding Y, Qiao A, Wang Z, Goodwin JS, Lee ES, Block ML et al (2008) Retinoic acid attenuates beta-amyloid deposition and rescues memory deficits in an Alzheimer's disease transgenic mouse model. *J Neurosci* 28:11622–11634. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3153-08.2008>
- Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S et al (2013) STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 29:15–21. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts635>
- Escartin C, Brouillet E, Gubellini P, Trioulier Y, Jacquard C, Smadja C et al (2006) Ciliary neurotrophic factor activates astrocytes, redistributes their glutamate transporters GLAST and GLT-1 to raft microdomains, and improves glutamate handling in vivo. *J Neurosci* 26:5978–5989
- Fernandez AM, Jimenez S, Mecha M, Davila D, Guaza C, Vitorica J et al (2012) Regulation of the phosphatase calcineurin by insulin-like growth factor I unveils a key role of astrocytes in Alzheimer's pathology. *Mol Psychiatry* 17:705–718. <https://doi.org/10.1038/mp.2011.128>
- Ferreira TA, Blackman AV, Oyrer J, Jayabal S, Chung AJ, Watt AJ et al (2014) Neuronal morphometry directly from bitmap images. *Nat Methods* 11:982–984. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3125>
- Fol R, Braudeau J, Ludewig S, Abel T, Weyer SW, Roederer JP et al (2016) Viral gene transfer of APPsalpha rescues synaptic failure in an Alzheimer's disease mouse model. *Acta Neuropathol* 131:247–266. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1498-9>
- Furman JL, Sama DM, Gant JC, Beckett TL, Murphy MP, Bachstetter AD et al (2012) Targeting astrocytes ameliorates neurologic changes in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 32:16129–16140. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2323-12.2012>
- Haan S, Wuller S, Kaczor J, Rolvering C, Nocker T, Behrmann I et al (2009) SOCS-mediated downregulation of mutant Jak2 (V617F, T875N and K539L) counteracts cytokine-independent signaling. *Oncogene* 28:3069–3080
- Hardy JA, Higgins GA (1992) Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 256:184–185
- Heneka MT, Carson MJ, El Khoury J, Landreth GE, Brosseron F, Feinstein DL et al (2015) Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* 14:388–405. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)70016-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)70016-5)
- Herrmann JE, Imura T, Song B, Qi J, Ao Y, Nguyen TK et al (2008) STAT3 is a critical regulator of astrogliosis and scar formation after spinal cord injury. *J Neurosci* 28:7231–7243
- Hol EM, Pekny M (2015) Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system. *Curr Opin Cell Biol* 32:121–130. <https://doi.org/10.1016/j.jceb.2015.02.004>
- Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA (2009) Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* 4:44–57. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.211>
- Iliff JJ, Wang M, Liao Y, Plogg BA, Peng W, Gundersen GA et al (2012) A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid beta. *Sci Transl Med* 4:147ra111. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003748>
- Jankowsky JL, Fadale DJ, Anderson J, Xu GM, Gonzales V, Jenkins NA et al (2004) Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue beta-amyloid peptide in vivo: evidence for augmentation of a 42-specific gamma secretase. *Hum Mol Genet* 13:159–170. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddh019>
- Jo S, Yarishkin O, Hwang YJ, Chun YE, Park M, Woo DH et al (2014) GABA from reactive astrocytes impairs memory in mouse models of Alzheimer's disease. *Nat Med*. <https://doi.org/10.1038/nm.3639>
- Kamphuis W, Kooijman L, Orre M, Stassen O, Pekny M, Hol EM (2015) GFAP and vimentin deficiency alters gene expression in astrocytes and microglia in wild-type mice and changes the transcriptional response of reactive glia in mouse model for Alzheimer's disease. *Glia*. <https://doi.org/10.1002/glia.22800>
- Kang W, Hebert JM (2011) Signaling pathways in reactive astrocytes, a genetic perspective. *Mol Neurobiol* 43:147–154. <https://doi.org/10.1007/s12035-011-8163-7>
- Keren-Shaul H, Spinrad A, Weiner A, Matcovitch-Natan O, Dvir-Szternfeld R, Ulland TK et al (2017) A unique microglia type associated with restricting development of Alzheimer's disease. *Cell* 169:1276–1290 e1217. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.018>
- Kershaw NJ, Murphy JM, Liao NP, Varghese LN, Laktyushin A, Whitlock EL et al (2013) SOCS3 binds specific receptor-JAK complexes to control cytokine signaling by direct kinase inhibition. *Nat Struct Mol Biol* 20:469–476. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2519>
- Kim D, Kim SH, Cho SH, Shin K, Kim S (2011) SOCS3 suppresses the expression of IL-4 cytokine by inhibiting the phosphorylation of c-Jun through the ERK signaling pathway in rat mast cell line RBL-2H3. *Mol Immunol* 48:776–781. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2010.11.005>
- Koistinaho M, Lin S, Wu X, Esterman M, Koger D, Hanson J et al (2004) Apolipoprotein E promotes astrocyte colocalization and degradation of deposited amyloid-beta peptides. *Nat Med* 10:719–726. <https://doi.org/10.1038/nm1058>

38. Kraft AW, Hu X, Yoon H, Yan P, Xiao Q, Wang Y et al (2013) Attenuating astrocyte activation accelerates plaque pathogenesis in APP/PS1 mice. *FASEB J* 27:187–198. <https://doi.org/10.1096/fj.12-208660>
39. Krauthausen M, Kummer MP, Zimmermann J, Reyes-Irisarri E, Terwel D, Bulic B et al (2015) CXCR3 promotes plaque formation and behavioral deficits in an Alzheimer's disease model. *J Clin Invest* 125:365–378. <https://doi.org/10.1172/JCI66771>
40. Langfelder P, Horvath S (2008) WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis. *BMC Bioinform* 9:559. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-559>
41. LeComte MD, Shimada IS, Sherwin C, Spees JL (2015) Notch1-STAT3-ETBR signaling axis controls reactive astrocyte proliferation after brain injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:8726–8731. <https://doi.org/10.1073/pnas.1501029112>
42. Lee CY, Landreth GE (2010) The role of microglia in amyloid clearance from the AD brain. *J Neural Transm* 117:949–960. <https://doi.org/10.1007/s00702-010-0433-4>
43. Lee Y, Messing A, Su M, Brenner M (2008) GFAP promoter elements required for region-specific and astrocyte-specific expression. *Glia* 56:481–493. <https://doi.org/10.1002/glia.20622>
44. Lian H, Litvinchuk A, Chiang AC, Aithmitti N, Jankowsky JL, Zheng H (2016) Astrocyte-microglia cross talk through complement activation modulates amyloid pathology in mouse models of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 36:577–589. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2117-15.2016>
45. Lian H, Yang L, Cole A, Sun L, Chiang AC, Fowler SW et al (2015) NFKappaB-activated Astroglial release of complement C3 compromises neuronal morphology and function associated with Alzheimer's disease. *Neuron* 85:101–115. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.11.018>
46. Liao MC, Muratore CR, Gierahn TM, Sullivan SE, Srikanth P, De Jager PL et al (2016) Single-cell detection of secreted Abeta and sAPPalpha from human iPSC-derived neurons and astrocytes. *J Neurosci* 36:1730–1746. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2735-15.2016>
47. Liddelow SA, Barres BA (2017) Reactive astrocytes: production, function, and therapeutic potential. *Immunity* 46:957–967. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.06.006>
48. Liddelow SA, Guttenplan KA, Clarke LE, Bennett FC, Bohlen CJ, Schirmer L et al (2017) Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature* 541:481–487. <https://doi.org/10.1038/nature21029>
49. Love MI, Huber W, Anders S (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 15:550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
50. Marchetti C, Marie H (2011) Hippocampal synaptic plasticity in Alzheimer's disease: what have we learned so far from transgenic models? *Rev Neurosci* 22:373–402. <https://doi.org/10.1515/RNS.2011.035>
51. Masliah E, Alford M, DeTeresa R, Mallory M, Hansen L (1996) Deficient glutamate transport is associated with neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 40:759–766. <https://doi.org/10.1002/ana.410400512>
52. Maviel T, Durkin TP, Menzaghi F, Bontempi B (2004) Sites of neocortical reorganization critical for remote spatial memory. *Science* 305:96–99. <https://doi.org/10.1126/science.1098180>
53. McManus MJ, Murphy MP, Franklin JL (2011) The mitochondria-targeted antioxidant MitoQ prevents loss of spatial memory retention and early neuropathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 31:15703–15715. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0552-11.2011>
54. Mertens C, Darnell JE Jr (2007) SnapShot: JAK-STAT signaling. *Cell* 131:612. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.10.033>
55. Morizawa YM, Hirayama Y, Ohno N, Shibata S, Shigetomi E, Sui Y et al (2017) Reactive astrocytes function as phagocytes after brain ischemia via ABCA1-mediated pathway. *Nat Commun* 8:28. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00037-1>
56. Morris RG, Garrud P, Rawlins JN, O'Keefe J (1982) Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 297:681–683
57. Noli L, Capalbo A, Ogilvie C, Khalaf Y, Ilic D (2015) Discordant growth of monozygotic twins starts at the blastocyst stage: a case study. *Stem Cell Reports* 5:946–953. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2015.10.006>
58. O'Callaghan JP, Kelly KA, VanGilder RL, Sofroniew MV, Miller DB (2014) Early activation of STAT3 regulates reactive astrogliosis induced by diverse forms of neurotoxicity. *PLoS One* 9:e102003. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102003>
59. Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R et al (2003) Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron* 39:409–421. Doi: S0896627303004343
60. Oeckl P, Lattke M, Wirth T, Baumann B, Ferger B (2012) Astrocyte-specific IKK2 activation in mice is sufficient to induce neuroinflammation but does not increase susceptibility to MPTP. *Neurobiol Dis* 48:481–487. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2012.06.010>
61. Okada S, Nakamura M, Katoh H, Miyao T, Shimazaki T, Ishii K et al (2006) Conditional ablation of Stat3 or Socs3 discloses a dual role for reactive astrocytes after spinal cord injury. *Nat Med* 12:829–834
62. Orre M, Kamphuis W, Osborn LM, Jansen AH, Kooijman L, Bossers K et al (2014) Isolation of glia from Alzheimer's mice reveals inflammation and dysfunction. *Neurobiol Aging* 35:2746–2760. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.06.004>
63. Osborn LM, Kamphuis W, Wadman WJ, Hol EM (2016) Astroglial: an integral player in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol* 144:121–141. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2016.01.001>
64. Panatier A, Theodosis DT, Mothet JP, Touquet B, Pellegrioni L, Poulain DA et al (2006) Glia-derived D-serine controls NMDA receptor activity and synaptic memory. *Cell* 125:775–784
65. Panatier A, Vallee J, Haber M, Murai KK, Lacaille JC, Robitaille R (2011) Astrocytes are endogenous regulators of basal transmission at central synapses. *Cell* 146:785–798. Doi: S0092-8674(11)00820-8 [pii]. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.07.022>
66. Papouin T, Dunphy JM, Tolman M, Dineley KT, Haydon PG (2017) Septal cholinergic Neuromodulation tunes the astrocyte-dependent gating of hippocampal NMDA receptors to wakefulness. *Neuron* 94:840–854 e847. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.04.021>
67. Pekny M, Pekna M, Messing A, Steinhauser C, Lee JM, Parpura V et al (2015) Astrocytes: a central element in neurological diseases. *Acta Neuropathol*. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1513-1>
68. Priego N, Zhu L, Monteiro C, Mulders M, Wasilewski D, Bindeman W et al (2018) STAT3 labels a subpopulation of reactive astrocytes required for brain metastasis. *Nat Med*. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0044-4>
69. Robin LM, Oliveira da Cruz JF, Langlais VC, Martin-Fernandez M, Metna-Laurent M, Busquets-Garcia A et al (2018) Astroglial CB1 receptors determine synaptic D-serine availability to enable recognition memory. *Neuron* 98:935–944 e935. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.04.034>
70. Rothhammer V, Borucki DM, Tjon EC, Takenaka MC, Chao CC, Ardura-Fabregat A et al (2018) Microglial control of astrocytes in response to microbial metabolites. *Nature* 557:724–728. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0119-x>
71. Rothhammer V, Muncanfroni ID, Bunse L, Takenaka MC, Kenison JE, Mayo L et al (2016) Type I interferons and microbial metabolites of tryptophan modulate astrocyte activity and central nervous system inflammation via the aryl hydrocarbon receptor. *Nat Med* 22:586–597. <https://doi.org/10.1038/nm.4106>
72. Sancheti H, Patil I, Kanamori K, Diaz Brinton R, Zhang W, Lin AL et al (2014) Hypermetabolic state in the 7-month-old triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease and the effect of lipoic acid: a 13C-NMR study. *J Cereb Blood Flow Metab* 34:1749–1760. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2014.137>
73. Sekar S, McDonald J, Cuyugan L, Aldrich J, Kurdoglu A, Adkins J et al (2015) Alzheimer's disease is associated with altered expression of genes involved in immune response and mitochondrial processes in astrocytes. *Neurobiol Aging* 36:583–591. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.09.027>
74. Selkoe DJ (2002) Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science* 298:789–791. <https://doi.org/10.1126/science.1074069>
75. Sharma K, Schmitt S, Bergner CG, Tyanova S, Kannaiyan N, Manrique-Hoyos N et al (2015) Cell type- and brain region-resolved mouse brain proteome. *Nat Neurosci* 18:1819–1831. <https://doi.org/10.1038/nn.4160>
76. Shi Y, Yamada K, Liddelow SA, Smith ST, Zhao L, Luo W et al (2017) ApoE4 markedly exacerbates tau-mediated neurodegeneration in a mouse model of tauopathy. *Nature* 549:523–527. <https://doi.org/10.1038/nature24016>
77. Sompol P, Furman JL, Pleiss MM, Kraner SD, Artiushin IA, Batten SR et al (2017) Calcineurin/NFAT signaling in activated astrocytes drives network Hyperexcitability in Abeta-bearing mice. *J Neurosci* 37:6132–6148. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0877-17.2017>
78. Stephan AH, Barres BA, Stevens B (2012) The complement system: an unexpected role in synaptic pruning during development and disease.

- Annu Rev Neurosci 35:369–389. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-061010-113810>
79. Thal DR, Hartig W, Schober R (1999) Diffuse plaques in the molecular layer show intracellular a beta(8-17)-immunoreactive deposits in subpial astrocytes. *Clin Neuropathol* 18:226–231
80. Tyzack GE, Hall CE, Sibley CR, Cymes T, Forostyak S, Carlino G et al (2017) A neuroprotective astrocyte state is induced by neuronal signal EphB1 but fails in ALS models. *Nat Commun* 8:1164. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01283-z>
81. Wan J, Fu AK, Ip FC, Ng HK, Hugon J, Page G et al (2010) Tyk2/STAT3 signaling mediates beta-amyloid-induced neuronal cell death: implications in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 30:6873–6881. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0519-10.2010>
82. Wyss-Coray T, Loike JD, Brionne TC, Lu E, Anankov R, Yan F et al (2003) Adult mouse astrocytes degrade amyloid-beta in vitro and in situ. *Nat Med* 9:453–457
83. Ye B, Shen H, Zhang J, Zhu YG, Ransom BR, Chen XC et al (2015) Dual pathways mediate beta-amyloid stimulated glutathione release from astrocytes. *Glia* 63:2208–2219. <https://doi.org/10.1002/glia.22886>
84. Yun SP, Kam TI, Panicker N, Kim S, Oh Y, Park JS et al (2018) Block of A1 astrocyte conversion by microglia is neuroprotective in models of Parkinson's disease. *Nat Med*. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0051-5>
85. Zamanian JL, Xu L, Foo LC, Nouri N, Zhou L, Giffard RG et al (2012) Genomic analysis of reactive astrogliosis. *J Neurosci* 32:6391–6410. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6221-11.2012>

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



ANNEXE 2: ARTICLE 3

The complex STATES of astrocyte reactivity: How are they controlled by the JAK–STAT3 pathway?

Objectifs de la revue

Les astrocytes deviennent réactifs en conditions pathologiques aiguës et chroniques. La réactivité astrocytaire est une réponse complexe caractérisée par des changements morphologiques bien décrits tels que l'hypertrophie du soma et des prolongements ainsi que la surexpression de protéines de filaments intermédiaires comme la GFAP et la Vimentine. D'importants changements transcriptionnels et moléculaires sont également observés dans les astrocytes réactifs.

De nombreuses voies de signalisation sont activées dans les astrocytes réactifs. Nous nous sommes particulièrement intéressés à la voie JAK-STAT3. Cette voie est impliquée dans de nombreuses fonctions cellulaires comme l'inflammation et la prolifération. Dans cette revue, nous discutons du rôle de la voie JAK-STAT3 dans le contrôle de la réactivité astrocytaire *in vivo* au cours des conditions pathologiques à la fois aiguës et chroniques. Nous montrons aussi que STAT3, via la voie JAK-STAT3 mais également par d'autres voies non canoniques, est impliqué dans de nombreuses fonctions dans les astrocytes comme dans le contrôle de la morphologie ou le sécrétome astrocytaire. L'ensemble de ces fonctions pourrait notamment expliquer le rôle majeur de cette voie dans le contrôle de la réactivité astrocytaire

Contribution à la revue

Dans cette revue, j'ai rédigé la partie sur le rôle de STAT3 sur la morphologie et la migration astrocytaire, dans les fonctions mitochondriales ainsi que dans l'autophagie, et participé à la relecture de l'ensemble de la revue.

NEUROSCIENCE FOREFRONT REVIEW

THE COMPLEX STATES OF ASTROCYTE REACTIVITY: HOW ARE THEY CONTROLLED BY THE JAK–STAT3 PATHWAY?

KELLY CEYZÉRIAT,^{a,b} LAURENE ABJEAN,^{a,b}
 MARÍA-ANGELES CARRILLO-DE SAUVAGE,^{a,b}
 LUCILE BEN HAIM^{a,b,c} AND CAROLE ESCARTIN^{a,b*}

^a Commissariat à l’Energie Atomique et aux Energies Alternatives (CEA), Département de la Recherche Fondamentale (DRF), Institut d’Imagerie Biomédicale (I2BM), MIRCen, F-92260 Fontenay-aux-Roses, France

^b Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Université Paris-Sud, UMR 9199, Neurodegenerative Diseases Laboratory, F-92260 Fontenay-aux-Roses, France

^c Eli and Edythe Broad Institute for Stem Cell Research and Regeneration Medicine, University of California, San Francisco, CA 94143, USA

Abstract—Astrocytes play multiple important roles in brain physiology. In pathological conditions, they become reactive, which is characterized by morphological changes and upregulation of intermediate filament proteins. Besides these descriptive hallmarks, astrocyte reactivity involves significant transcriptional and functional changes that are far from being fully understood. Most importantly, astrocyte reactivity seems to encompass multiple states, each having a specific influence on surrounding cells and disease progression. These diverse functional states of reactivity must be regulated by subtle signaling networks. Many signaling cascades have been associated with astrocyte reactivity, but among them, the JAK–STAT3 pathway is

emerging as a central regulator. In this review, we aim (i) to show that the JAK–STAT3 pathway plays a key role in the control of astrocyte reactivity, (ii) to illustrate that STAT3 is a pleiotropic molecule operating multiple functions in reactive astrocytes, and (iii) to suggest that each specific functional state of reactivity is governed by complex molecular interactions within astrocytes, which converge on STAT3. More research is needed to precisely identify the signaling networks controlling the diverse states of astrocyte reactivity. Only then, we will be able to precisely delineate the therapeutic potential of reactive astrocytes in each neurological disease context. © 2016 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Key words: reactive astrocytes, STAT3, JAK–STAT pathway, neurological diseases, signaling cascades.

Contents

Introduction	206
The JAK–STAT3 pathway	206
A linear, canonical JAK–STAT3 pathway from the membrane to the nucleus	206
Additional branching points on the pathway increase the complexity of STAT3 signaling cascades	206
STAT3 has non-canonical functions independent of transcription	208
Retro-controls on the JAK–STAT3 pathway	208
The JAK–STAT3 pathway is a universal inducer of astrocyte reactivity	209
Activation of the JAK–STAT3 pathway in acute diseases	209
Activation of the JAK–STAT3 pathway in ND	209
What does STAT3 do in astrocytes?	210
STAT3 induces the expression of intermediate filament proteins	210
STAT3 controls proliferation of a subset of reactive astrocytes	211
STAT3 regulates the secretome of reactive astrocytes	211
STAT3 modulates astrocyte morphology and migration	211
STAT3 regulates mitochondrial functions	212
Other important functions for STAT3 in astrocytes	212
How does STAT3 generate so many functional outcomes?	213
Interactions between the JAK–STAT3 pathway and other cascades	213
A signaling code	213
Differential abilities to engage in STAT3 signaling	214
Conclusions and perspectives	214
Acknowledgments	214
References	214

*Correspondence to: C. Escartin, UMR9199, MIRCen, Bat 61, 18, route du Panorama, 92260 Fontenay-aux-Roses, France.

E-mail addresses: kelly.cezyeriat@cea.fr (K. Ceyzeriat), Laurene.abjean@cea.fr (L. Abjean), maria.carrillo@cea.fr (M.-A. Carrillo-de Sauvage), Lucile.BenHaim@ucsf.edu (L. Ben Haim), carole.escartin@cea.fr (C. Escartin).

Abbreviations: AD, Alzheimer’s disease; ALS, amyotrophic lateral sclerosis; CNS, central nervous system; CNTF, ciliary neurotrophic factor; Cx43, connexin 43; DN, dominant negative; EGF, epidermal growth factor; ETC, electron transport chain; GFAP, glial fibrillary acidic protein; GPCR, G-protein-coupled receptor; HD, Huntington’s disease; HDAC, histone deacetylase; IL, interleukin; JAK, janus kinase; KO, knock out; Lcn2, lipocalin 2; LPS, lipopolysaccharide; Lys, lysine; MAPK, mitogen-activated protein kinase; MCAO, middle cerebral artery occlusion; MMP, matrix metallo-proteinase; MPTP, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine; MS, multiple sclerosis; mSTAT3, mitochondrial STAT3; MnSOD, manganese superoxide dismutase; ND, neurodegenerative diseases; NF-κB, nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells; PD, Parkinson’s disease; PIAS, protein inhibitor of activated STAT; PKR, protein kinase R; PTM, post-translational modifications; ROS, reactive oxygen species; SCI, spinal cord injury; Ser, serine; Shh, Sonic Hedgehog; SOCS, suppressor of cytokine signaling; SRE, STAT3-responsive element; STAT, signal transducer and activator of transcription; TBI, traumatic brain injury; TSP1, thrombospondin-1; Tyr, tyrosine; UCP, uncoupling protein.

INTRODUCTION

In response to the multiple pathological conditions that affect the central nervous system (CNS), astrocytes become reactive. This response develops after acute injuries such as ischemia, traumatic brain injury (TBI), spinal cord injury (SCI) or infection, as well as under progressive conditions like neurodegenerative diseases (ND) or multiple sclerosis (MS). Astrocyte reactivity was initially characterized by morphological changes (hypertrophy of soma and processes) and by the upregulation of intermediate filament proteins such as glial fibrillary acidic protein (GFAP) or vimentin. Besides these two hallmarks, astrocyte reactivity involves multiple transcriptional and functional changes that are still being elucidated (Burda and Sofroniew, 2014; Pekny and Pekna, 2014; Ben Haim et al., 2015a). Importantly, astrocyte reactivity is now recognized as a heterogeneous response resulting in various functional states depending on the disease context. In fact, it is important to note that reactivity is not the only change observed in astrocytes during diseases. For example, astrocytes may be dystrophic in the brain of patients with schizophrenia or even degenerate following encephalopathies. They may directly be hit by the disease and dysfunction, like in Alexander's disease, which is caused by mutations in the *gfap* gene (Verkhatsky et al., 2015; Pekny et al., 2016).

Given the multiple roles operated by astrocytes in physiological conditions (Papura et al., 2012), the functional changes occurring with reactivity could have major consequences on surrounding cells like neurons or microglial cells and influence disease progression. Therefore, it is crucial to unravel the signaling cascades controlling the specific states of astrocyte reactivity.

Multiple pathways are associated with astrocyte reactivity (Buffo et al., 2010; Kang and Hebert, 2011; Ben Haim et al., 2015a). Among them, the janus kinase-signal transducer and activator of transcription 3 (JAK–STAT3) pathway seems to play a central role that we will cover in this review.

We will focus on the roles of STAT3 in astrocytes during various brain diseases, but we will also describe data from other cell types in the CNS or peripheral organs, when they give insight into the functions of the JAK–STAT3 pathway. Indeed, seminal discoveries on this cascade were made in cell cultures in the fields of Immunology and Oncology. Although very potent, *in vitro* studies have serious limitations when applied to the brain, because of the significant phenotypic changes occurring when brain cells are isolated in a dish. This is especially true for primary astrocytes that tend to become reactive without stimulation (Ben Haim et al., 2015a). In this review, we will thus present *in vivo* studies whenever possible, and landmark *in vitro* studies to illustrate the complex roles played by STAT3 in the control of astrocyte reactivity. We will (i) show that the JAK–STAT3 pathway plays a key role in the control of astrocyte reactivity, (ii) illustrate that STAT3 is a pleiotropic molecule operating multiple functions in reactive astrocytes and (iii) propose that each specific functional state of reactivity is governed by complex molecular interactions within astrocytes, which converge on STAT3.

THE JAK–STAT3 PATHWAY

A linear, canonical JAK–STAT3 pathway from the membrane to the nucleus

The JAK–STAT pathway is a ubiquitous, evolutionarily conserved signaling cascade, present in various species from *Dictyostelium* and *Drosophila* to mammals (Decker and Kovarik, 2000). It was discovered more than twenty years ago, as the cascade mediating interferon effects (Darnell et al., 1994; Stark and Darnell, 2012). There are four JAKs (JAK1-3, and TYK2) and seven STATs (STAT1-4, 5A, 5B, and 6) in mammals (Darnell, 1997). STAT3 was sequenced and cloned in 1994 (Akira et al., 1994; Zhong et al., 1994b). STAT3 is well expressed in the brain (Zhong et al., 1994a) and has been the most extensively STAT studied in the context of astrocyte reactivity.

The canonical JAK–STAT3 pathway is activated by the binding of polypeptides such as cytokines, hormones or growth factors to their multimeric receptor (Mertens and Darnell, 2007, Fig. 1). Conformational changes on the intracellular tail of the receptor bring the kinase domains of two JAKs in apposition (Brooks et al., 2014). JAKs are receptor-associated tyrosine (Tyr) kinases that phosphorylate each other and the receptor on several residues. The latent transcription factor STAT3 is then recruited to the phosphorylated receptor through its Src homology 2 (SH2) domain and is transphosphorylated by JAK on Tyr705 (Lim and Cao, 2006). Phospho-STAT3 proteins dimerize and accumulate in the nucleus. There, dimers of phospho-STAT3 bind specific sequences called STAT3-responsive elements (SRE) in the promoter of target genes and induce their transcription (Shuai et al., 1993; Darnell, 1997). These transcriptional changes impact cell growth, proliferation, differentiation and survival. This pathway is particularly important during development and immune responses, and its dysregulation is involved in cancer and immune diseases (see, Yu et al., 2009; O'Shea et al., 2013, for a complete review, as this will not be developed here). Activation of the JAK–STAT3 pathway increases the expression of several elements of the pathway, including *stat3* itself, which promotes a positive feedback loop (Hutchins et al., 2013).

Additional branching points on the pathway increase the complexity of STAT3 signaling cascades

Besides the linear “canonical” pathway, STAT3 is connected to alternative signaling cascades within the cell (Fig. 1).

First, some G-protein-coupled receptors (GPCRs), which are seven-transmembrane domain receptors for growth factors or purines, may be coupled to JAKs and phosphorylate STAT3 (Mertens and Darnell, 2007). Alternatively, STAT3 can be phosphorylated on Tyr705 by other upstream kinases than JAKs (Fig. 1). They include receptors with an intrinsic Tyr kinase activity, like the receptor for epidermal growth factor (EGF), and non-receptor Tyr kinases, which are usually cytoplasmic and of viral origin, such as v-src (Mertens and Darnell, 2007).

In addition, STAT3 can be phosphorylated on Serine 727 (Ser727) by various Ser kinases, especially by mitogen-activated protein kinases (MAPK) (Wen et al., 1995; Decker and Kovarik, 2000). Depending on the

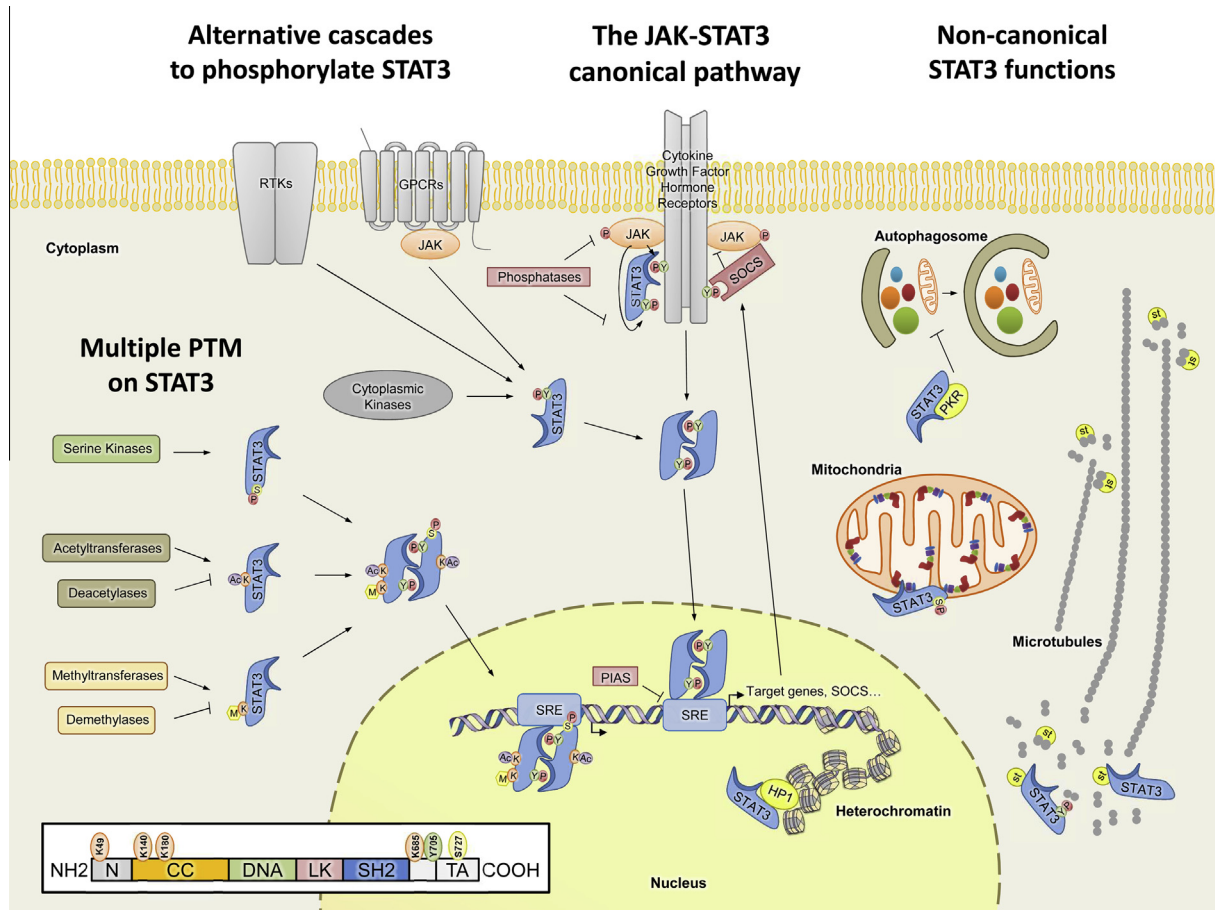


Fig. 1. STAT3 is a signaling hub. STAT3 is involved in complex signaling cascades within the cell. The **canonical JAK–STAT3 pathway** (center), is triggered by the binding of cytokines, hormones or growth factors to their multimeric receptors (e.g. receptors for IL, growth hormone, CNTF or LIF). It causes conformational changes and activation of JAKs bound to the receptor. JAKs phosphorylate the receptor and then STAT3, after its recruitment to the phosphorylated receptor through its SH2 domain. Tyr705-phospho-STAT3 dimerizes and accumulates in the nucleus where it recognizes SRE in the promoter region of target genes, inducing their transcription. STAT3 is involved in **alternative signaling cascades** (left). It can be directly phosphorylated on Tyr705 by receptors with an intrinsic Tyr kinase activity (RTK, e.g. receptors for EGF or platelet-derived growth factor) or by cytoplasmic kinases like v-src. Alternatively, GPCRs (which include receptors for purines, growth factors like angiotensin, or for chemokines like CCL5), can trigger Tyr705 phosphorylation by JAK (Reich and Liu, 2006; Mertens and Darnell, 2007). STAT3 may also be phosphorylated at Ser727 by Ser kinases such as MAP kinases. **Additional PTMs** on STAT3 include Lys acetylations, which are regulated by acetyltransferases (like p300/CBP) and deacetylases (like HDACs) and methylations, which are regulated by methyltransferases (like EZH2 or SET9) and demethylases (like LSD1). These PTMs may occur in the cytoplasm or in the nucleus. Overall, multiple isoforms of STAT3 with different sets of PTMs (two are represented on the left) can be present in the nucleus, each with its own transcriptional activity. Even unphosphorylated STAT3 may activate the transcription of some genes. Finally, STAT3 performs **non-canonical functions** through non-transcriptional mechanisms (right). STAT3 contributes to the maintenance of cellular shape and migration by preventing stathmins (st) from sequestering tubulin and destabilizing microtubule networks. STAT3 is also present in the mitochondria where it regulates energy production, antioxidant defense and apoptosis. The phosphorylation of Ser727 appears to be important for these functions (Yang and Rincon, 2016). STAT3 also represses autophagy by inhibiting PKR and stabilizes heterochromatin by binding to HP1. The JAK–STAT3 pathway is inhibited by at least three mechanisms: (i) dephosphorylation of the receptors, JAKs and STAT3 by phosphatases like SHP2, (ii) direct inhibition of JAKs by SOCS proteins and (iii) inhibition of DNA binding by PIAS in the nucleus. It is important to note that most of these cascades, PTMs and non-canonical functions have been primarily studied in cell types other than astrocytes. They are rather unexplored in the context of astrocyte reactivity. **Insert:** STAT3 is composed of several functional domains: the N terminal domain (N), the coiled-coiled domain (CC), the DNA binding domain (DNA) and the linker domain (LK). The SH2 domain binds to phospho-Tyr on the receptor and on other STATs for dimer formation. The transactivator domain (TA) is responsible for transcriptional induction. Tyr705 (Y705) and Ser727 (S727) are represented, as well as the main Lys that are acetylated or methylated. Ac = acetylation; M = methylation; P = phosphorylation; K = lysine; S = serine; Y = tyrosine. For other abbreviations, see main text.

experimental conditions (stimulus, promoter studied, cell type), phosphorylation at Ser727 has positive or negative effects on Tyr705-dependent transcription (Decker and Kovarik, 2000). Activation of STAT3 via P2Y receptors was reported in astrocyte cultures, resulting in the phosphorylation of both Tyr705 and Ser727 (Washburn and Neary, 2006). Other toxic stimuli were reported to trigger Ser727 phosphorylation like TBI (Oliva et al., 2012, see Fig. 2), or lipopolysaccharide (LPS, Moravcova et al., 2016).

Lastly, besides phosphorylations, STAT3 is subjected to multiple other post-translational modifications (PTM, see Fig. 1) that modulate its transcriptional activity (Lim and Cao, 2006). STAT3 is acetylated on several Lysine (Lys) residues. Acetylation levels are regulated by the balance of activity between histone acetyl-transferases like p300/CREB binding protein and deacetylases like histone deacetylases (HDAC, Zhuang, 2013). Acetylation of Lys685 by p300 promotes STAT3 dimerization, nuclear

localization and transcriptional activation (Wang et al., 2005; Yuan et al., 2005). STAT3 acetylation was recently observed in hypothalamic neurons (Chen et al., 2015) and cultured microglia (Eufemi et al., 2015) but its physiological role in astrocytes is largely unexplored. STAT3 may also be methylated on several Lys residues, which influences the pattern of genes regulated by STAT3 (Yang et al., 2010; Kim et al., 2013; Dasgupta et al., 2015). *In vitro* studies suggest that even non-phosphorylated STAT3 is able to increase the transcription of specific genes (Yang and Stark, 2008).

Overall, STAT3 represents a hub for multiple signaling cascades that converge towards the nucleus to modulate transcriptional activity.

STAT3 has non-canonical functions independent of transcription

Another layer of complexity in STAT3 signaling was discovered more recently, when STAT3 was found to be more than a simple transcription factor (see, Gao and Bromberg, 2006, and Fig. 1). In the nucleus, STAT3 also induces global chromatin remodeling (Li, 2008). STAT3 is able to interact with microtubules to regulate their stability (Ng et al., 2006, and section “STAT3 modulates astrocyte morphology and migration”). In the cytoplasm, STAT3 may also participate in the control of the autophagic flux by binding to protein kinase R (PKR, Shen et al., 2012, and section “Other important functions for STAT3 in astrocytes”) or contribute to long term depression in hippocampal neurons, by yet unknown mechanisms independent of transcription (Nicolas et al., 2012). Last, STAT3 is found in mitochondria where it modulates their functions (Yang and Rincon, 2016, and section “STAT3 regulates mitochondrial functions”).

It is important to note that most of these alternative, non-transcriptional STAT3 functions have been characterized in cancer and immune cells *in vitro* (Mohr et al., 2012). Whether they also occur in astrocytes *in situ*, is mostly unknown.

Retro-controls on the JAK–STAT3 pathway

The JAK–STAT3 pathway is tightly regulated by phosphatases, suppressors of cytokine signaling (a family of eight members SOCS1–7 and CIS) and protein inhibitors of activated STAT (PIAS) (Heinrich et al., 2003, and see Fig. 1). Protein Tyr phosphatases like Src homology 2 domain-containing phosphatase 2 (SHP2) terminate signal transduction at the different steps of the pathway. They may dephosphorylate the receptor, JAKs or STAT3, including within the nucleus (Heinrich et al., 2003; Mertens and Darnell, 2007). SOCS proteins inhibit JAK–STAT3 signaling by two mechanisms: they either promote ubiquitination of JAKs and their associated receptors, targeting them for proteasome degradation or they directly inhibit JAK activity (Babon et al., 2014). The second mechanism is more prominent in the case of SOCS1 and 3, the two most studied SOCSs (Babon et al., 2014). SOCS3 is a very efficient inhibitor of the JAK2–STAT3 pathway, thanks to its capacity to bind JAK2 and the activated, phosphorylated receptor concomitantly, acting as a pseudo-substrate for JAK2 (Kershaw et al., 2013). SOCS3 expression is strongly induced by the JAK–STAT3 pathway, operating a retro-control on the pathway. On the contrary, the expression of PIAS is constitutive. PIAS3 interacts with phosphorylated STAT3 in the nucleus and reduces its binding to DNA (Chung et al., 1997; Lim and Cao, 2006).

Box 1: An extensive toolbox to study the JAK–STAT3 pathway

There are many molecular tools and techniques to study the JAK–STAT3 pathway in the brain.

A. To evidence the activation of the pathway with biochemical & histological techniques:

Standard and widely used techniques applied to *in vitro* or *in vivo* samples include (see Fig. 2 for examples):

- Detection of phosphorylated active forms (e.g. gp130, JAK, STAT3). Phospho-specific antibodies may be used for western blotting, ELISA or immunostaining on slices, cultured cells or cell suspensions for cytometry analysis.
- Detection of STAT3 nuclear translocation by immunostaining or subcellular fractionation.
- Detection of transcriptional induction of target genes by RT-qPCR (e.g. *socs3*, *stat3*).
- Detection of STAT3 binding to specific DNA sequences by electromobility shift assay or chromatin immunoprecipitation.

B. To monitor the activity of the pathway with reporter systems

- **To monitor transcriptional induction:** Consensus SRE (TTG(N)₃CAA), coupled with a minimal promoter control the expression of a fluorescent protein or an enzyme whose activity is easily measured (e.g. luciferase, alkaline phosphatase, β-galactosidase). Such reporters are generally used *in vitro* but, they could be used to produce viral vectors (Gabel et al., 2010) to infect brain cells or to generate transgenic reporter mice.
- **To monitor STAT3 intracellular trafficking:** STAT3 is tagged with a fluorescent protein, and its subcellular location and trafficking is monitored by time-lapse fluorescent microscopy or fluorescent recovery after photobleaching (FRAP, Selvaraj et al., 2012).
- **To monitor the formation of protein complexes:** Förster resonance energy transfer (FRET) imaging can be used to reveal protein-protein interactions, for example, when STAT3 dimerizes (Kretzschmar et al., 2004) or when JAK2 is activated at the growth hormone receptor (Brooks et al., 2014).

C. To modulate the JAK–STAT3 pathway

- **Pharmacological inhibitors:** They are numerous inhibitors of JAKs and STAT3. They were initially developed for the treatment of cancer and immune diseases (Yu et al., 2009; O’Shea et al., 2013). AG490 and Stattic are two commonly used inhibitors of JAK2 and STAT3 respectively (Meydan et al., 1996; Schust et al., 2006). Their use may be limited by poor blood brain barrier penetration and their potential side-effects on multiple cell types in the brain and periphery.
- **Conditional KO:** Given the important developmental and peripheral roles of the pathway, conditional recombination is required to restrict expression of the Cre recombinase to astrocytes by specific promoters such as the *gfap* promoter (Herrmann et al., 2008). It is also advisable to control the time window of recombination with *tet*-operated promoters or by using tamoxifen inducible Cre (Pfrieger and Slezak, 2012).
- **Expression of inhibitors or dominant negative mutants:** Several mutant forms of STAT3 have been developed. They act as dominant negatives [e.g. STAT3^{Y705F}, STAT3D with a mutation in the DNA binding domain (Nakajima et al., 1996; He et al., 2005; Kohro et al., 2015)]. Alternatively, expression of endogenous inhibitors like SOCS3 in astrocytes prevents STAT3 activation (Ben Haim et al., 2015b).
- **Expression of constitutively active mutants:** Introduction of two cysteine residues by point mutation in STAT3 was used to create STAT3-C, a mutant that should be capable of auto-dimerization by disulfide bonds (Bromberg et al., 1999). Recent studies suggest that STAT3-C still needs to be phosphorylated to bind DNA, but it does so with greater efficacy (Li and Shaw, 2006).

THE JAK–STAT3 PATHWAY IS A UNIVERSAL INDUCER OF ASTROCYTE REACTIVITY

Astrocytes become reactive in response to various pathological conditions affecting the CNS. While several signaling cascades are found activated in reactive astrocytes over the course of diseases or following injuries (Kang and Hebert, 2011; Ben Haim et al., 2015a), STAT3 appears as a key regulator of astrocyte reactivity.

Activation of the JAK–STAT3 pathway in acute diseases

STAT3 activation is detected by its phosphorylation, nuclear translocation and/or nuclear accumulation (Box 1). Activated STAT3 is observed in reactive astrocytes in various acute injury models, including TBI (Li and Shaw, 2006; Oliva et al., 2012 and see Fig. 2), excitotoxicity (Acarin et al., 2000), neonatal white matter injury (Nobuta et al., 2012), neuropathic pain (Tsuda et al., 2011), axotomy (Xia et al., 2002; Schubert et al., 2005; Tyzack et al., 2014), infection with scrapie (Na et al., 2007), glaucoma (Zhang et al., 2013), epilepsy (Choi et al., 2003b; Xu et al., 2011), ischemia (Justicia et al., 2000; Choi et al., 2003a) and after exposure to neurotoxins (Sriram et al., 2004; O'Callaghan et al., 2014) or LPS (Gautron et al., 2002). The activation of upstream cascades was explored in some studies: JAK2 and the cytokine receptor gp130 are also phosphorylated in a rat TBI model (Oliva et al., 2012, and see Fig. 2); JAK2 (but not JAK1 or Tyk2) is also activated by the injection of the neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP, Sriram et al., 2004).

Overall, there is ample evidence that activation of the JAK–STAT3 pathway is associated with astrocyte reactivity. However, to demonstrate that STAT3 is really required for astrocyte reactivity, it is necessary to interfere with it (see Box 1). This was nicely demonstrated in the case of the glial scar, a dense structure of cells that aggregate at the site of parenchyma disruption (Sofroniew, 2009; Pekny and Pekna, 2014; Ben Haim et al., 2015a). Conditional knock-out (KO) of *stat3* in reactive astrocytes (*Nestin-Cre* × *stat3^{fl/fl}*) reduces glial scar formation while *socs3* deletion (*Nestin-Cre* × *socs3^{fl/fl}*) has opposite effects (Okada et al., 2006). Similarly, *stat3* KO in astrocytes (*Gfap-Cre* × *stat3^{fl/fl}*) attenuates GFAP upregulation and disrupts glial scar formation after SCI (Herrmann et al., 2008; Wanner et al., 2013).

STAT3 is also responsible for astrocyte reactivity in acute disease models without glial scarring. For example, pharmacological inhibition of JAK2 decreases STAT3 activation and astrocyte reactivity after hypoxic-ischemic damage in the neonatal mouse brain (Hristova et al., 2016), in the epileptic rat hippocampus (Xu et al., 2011), after MPTP injection (Sriram et al., 2004) and in a model of peripheral nerve injury (Tsuda et al., 2011). Khoro et al. later used viral gene transfer of a dominant negative (DN) form of STAT3 to inhibit this cascade more specifically in spinal astrocytes after peripheral nerve

injury in mice. They demonstrate that this pathway contributes to astrocyte reactivity, as the mRNA levels of *gfap*, *vimentin* and *socs3* were reduced by STAT3-DN (Kohro et al., 2015). Genetic studies based on *Gfap-Cre* × *stat3^{fl/fl}* transgenic mice further established the importance of STAT3 for astrocyte reactivity. By contrast to controls, transgenic mice display reduced astrocyte hypertrophy and GFAP upregulation following neonatal white matter injury in the brain (Nobuta et al., 2012) and spinal cord (Monteiro de Castro et al., 2015), axotomy (Tyzack et al., 2014), in a model of chronic itch (Shiratori-Hayashi et al., 2015) or after exposure to a range of neurotoxins causing neuronal death in different brain regions and species (O'Callaghan et al., 2014). Interestingly, STAT3 involvement in astrocyte reactivity is conserved in *Drosophila*. Stat92E, the *Drosophila* homolog of STAT3, controls glial reactivity after axonal injury (Doherty et al., 2014).

These results show that STAT3 is a central regulator of glial reactivity, conserved across evolution, as well as between disease conditions.

Activation of the JAK–STAT3 pathway in ND

In progressive pathological conditions such as ND, where astrocyte reactivity, neuroinflammation and neuronal death are gradually established over years, STAT3 appears to play a central role as well. STAT3 activation is reported in reactive astrocytes of patients with MS (Lu et al., 2013) or amyotrophic lateral sclerosis (ALS, Shibata et al., 2009). Similarly, STAT3 activation is found in mouse models of ALS (Shibata et al., 2010) and Alzheimer's disease (AD, Ben Haim et al., 2015b and see Fig. 2), in pharmacological models of Parkinson's disease (PD, Sriram et al., 2004; O'Callaghan et al., 2014) and in mouse and primate models of Huntington's disease (HD, Ben Haim et al., 2015b).

While STAT3 activation is consistently detected in reactive astrocytes in ND models, few studies have investigated its role in the establishment of astrocyte reactivity (see Ben Haim et al., 2015a for review). Pharmacological inhibition of JAK2 and astrocyte-specific KO of *stat3* in the MPTP model of PD attenuates astrocyte reactivity (Sriram et al., 2004; O'Callaghan et al., 2014). A similar reduction in reactivity is observed with JAK2 inhibition in a pharmacological model of HD based on striatal injection of an excitotoxin (Ignarro et al., 2013). To improve cell-type specificity, our group used lentiviral vectors to overexpress SOCS3 selectively in astrocytes, in mouse models of AD and HD (Ben Haim et al., 2015b). SOCS3 overexpression prevented STAT3 activation and GFAP upregulation in astrocytes of AD and HD mice. Furthermore, SOCS3-expressing astrocytes displayed resting-like morphology, demonstrating that the JAK–STAT3 pathway is a key pathway mediating astrocyte reactivity in ND models.

The JAK–STAT3 pathway is a central mediator of astrocyte reactivity in a variety of pathological conditions in the CNS. What are the functional outcomes of this cascade in reactive astrocytes?

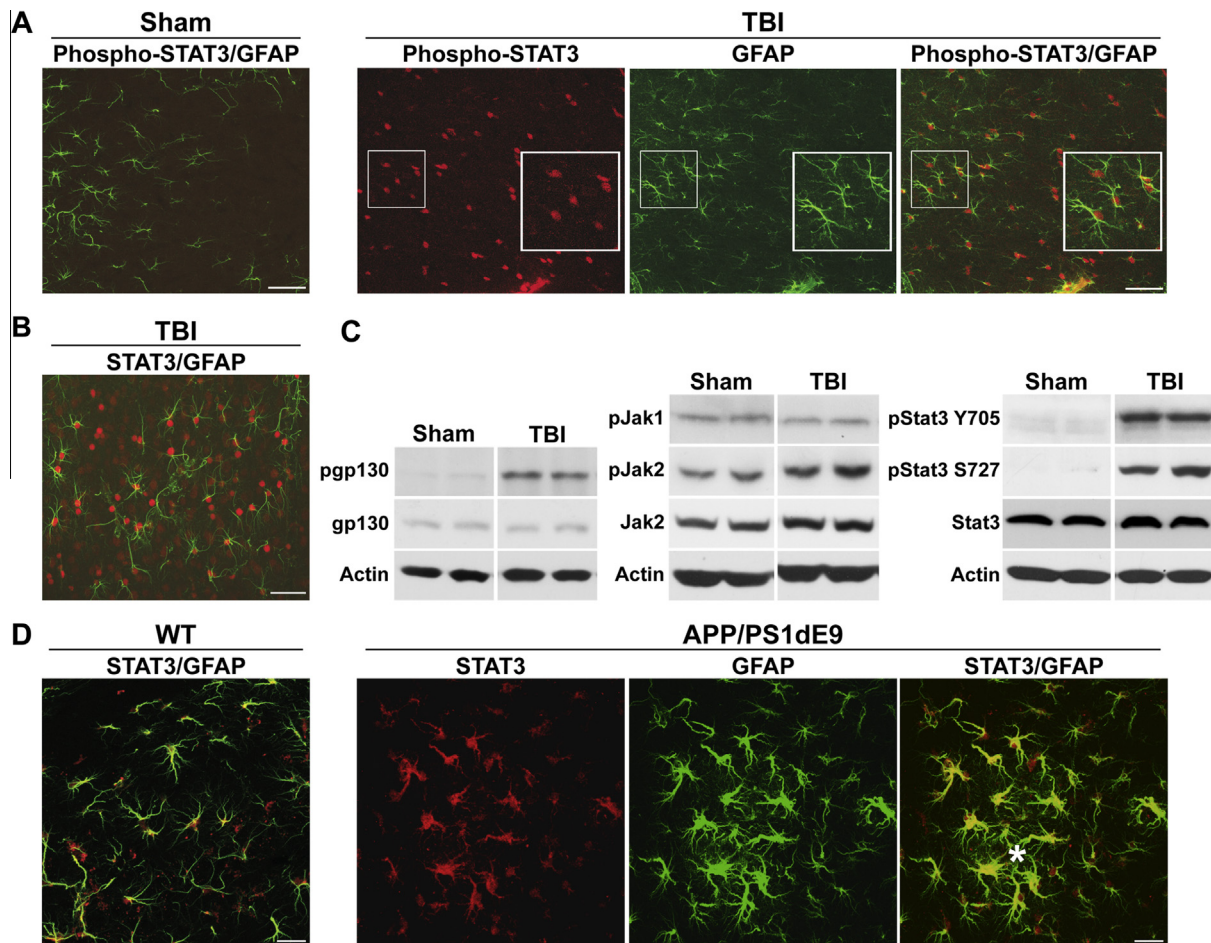


Fig. 2. The JAK–STAT3 pathway is activated in reactive astrocytes in two models of brain disease. **A** In a model of TBI, the phosphorylated form of STAT3 (red) accumulates in reactive astrocytes overexpressing GFAP (green). Sham-operated rats display low GFAP and no phospho-STAT3 immunoreactivity. **B** In the cortex exposed to TBI, activation of the JAK–STAT3 pathway is also detected by accumulation of total STAT3 in the nucleus of astrocytes. **C** In this model, Oliva et al. explored the upstream cascades responsible for STAT3 activation. TBI induces phosphorylation of the gp130 receptor (pJAK2) but not JAK1 (pJAK1). Interestingly, STAT3 is phosphorylated at Tyr705 as well as Ser727 (**A**, **B**: 6 h post TBI, **C**: 3 h post TBI, modified from, Oliva et al., 2012). In more progressive models, the detection of STAT3 phosphorylation is sometimes difficult, as it is usually quite transient and prone to post-mortem dephosphorylation (O’Callaghan and Sriram, 2004). Yet, accumulation of STAT3 in the nucleus of reactive astrocytes is observed in many disease models (Ben Haim et al., 2015a). **D** For example, STAT3 activation (red) is observed in GFAP⁺ reactive astrocytes (green), in the hippocampus of APP/PS1dE9 mice, a transgenic model of AD. Reactive astrocytes with strong STAT3 activation are especially visible around amyloid plaques (star). GFAP and STAT3 staining is low in wildtype (WT) littermates. Scale bars: A, B = 50 μ m, D = 25 μ m.

WHAT DOES STAT3 DO IN ASTROCYTES?

STAT3 induces the expression of intermediate filament proteins

One of the best-known target genes of STAT3 is *gfap*, whose induction in astrocytes is the primary hallmark of their reactive state (Hol and Pekny, 2015). As described in section “The JAK–STAT3 pathway is a universal inducer of astrocyte”, pharmacological inhibition or genetic invalidation of *stat3*, consistently prevents or reduces the increase in *gfap* mRNA and/or protein levels in astrocytes following induction of reactivity. In fact, levels of GFAP are also reduced by STAT3 inhibition or invalidation in non-lesioned groups (Herrmann et al., 2008; Wannier et al., 2013; Levine et al., 2015), suggesting that STAT3 controls the basal expression of GFAP. The human *gfap* promoter is well characterized; it displays at

least one SRE that contributes to high GFAP expression in multiple brain regions (Yeo et al., 2013). These SRE are conserved in the rodent *gfap* promoter (Nakashima et al., 1999). Vimentin, another intermediate filament characteristic of reactive as well as immature astrocytes, is similarly regulated by STAT3 (Herrmann et al., 2008).

Interestingly, STAT3-mediated induction of intermediate filaments in reactive astrocytes recapitulates an important signaling cascade occurring at the time of astrogliogenesis (Kanski et al., 2014). The JAK–STAT3 pathway is inhibited during neurogenesis and activation of STAT3 coincides with the expression of glial markers GFAP and S100 β at E18.5 in mice (He et al., 2005). STAT3 binds to the *gfap* promoter and increases GFAP expression in cortical progenitors (Bonni et al., 1997). STAT3-dependent induction of GFAP is modulated by the pattern of histone and DNA methyl-

tion of the *gfap* promoter (Takizawa et al., 2001; Song and Ghosh, 2004).

STAT3 controls proliferation of a subset of reactive astrocytes

The JAK–STAT3 pathway is involved in normal proliferation of neuronal precursor cells during development (Kim et al., 2010) and abnormal proliferation of cancer cells (de la Iglesia et al., 2009; Yu et al., 2009). Does STAT3 also promote the proliferation of reactive astrocytes?

Recent studies show that contrary to the common belief, proliferation of reactive astrocytes is quite limited, being transient or involving only a small percentage of astrocytes (5–10%), especially in chronic diseases or injuries that do not involve rupture of the blood brain barrier (Dimou and Gotz, 2014). These subsets of proliferative astrocytes are located in specific niches, in contact with the vasculature (Bardehle et al., 2013) or the lesion core (Wanner et al., 2013; LeComte et al., 2015) and display stem cell properties (Sirko et al., 2013). There is some indirect evidence that STAT3 controls the proliferation of reactive astrocytes. JAK inhibitors reduce the number of proliferating reactive astrocytes following spinal nerve injury (Tsuda et al., 2011). The formation of the glial scar, which is composed of newly proliferated astrocytes, is also altered in *Gfap-Cre* × *stat3^{fl/fl}* transgenic mice (Wanner et al., 2013; Anderson et al., 2016).

By which mechanisms does STAT3 control astrocyte proliferation? In cancer cells, it is well known that STAT3 promotes the expression of cell cycle genes, like cyclin D1 (Yu et al., 2009), and this regulation also occurs in cultured astrocytes (Sarafian et al., 2010). In addition, STAT3 activates the expression of anti-apoptotic genes (Sarafian et al., 2010, see section “STAT3 regulates mitochondrial functions”), which may promote the survival of proliferating reactive astrocytes. More recently, Lecomte et al. showed that following middle cerebral artery occlusion (MCAO), STAT3 is activated within a subset of reactive astrocytes sensitive to Notch signaling. STAT3 promotes the expression of the endothelin B receptor, which acts in an autocrine manner to stimulate the proliferation of this subset of cells (LeComte et al., 2015).

Of note, it was shown recently that the morphogen Sonic Hedgehog (Shh), which is abundant in the cerebrospinal fluid, also controls the proliferation of reactive astrocytes and their stem cell potential after invasive injuries (Sirko et al., 2013). Whether and how the Shh cascade interacts with STAT3 in astrocytes is unknown.

STAT3 regulates the secretome of reactive astrocytes

In immune cells, STAT3 is an established transcriptional activator of cytokines (Yu et al., 2009). In astrocytes as well, STAT3 regulates the production of cytokines and chemokines during reactivity.

Pharmacological inhibition of the JAK–STAT3 pathway reduces mRNA levels of *interleukin 6 (IL-6)*, *IL-1 β* , *IL-4* and *vascular endothelial growth factor* by astrocytes made reactive by high glucose concentration

in culture (Wang et al., 2012). Likewise, expression of a siRNA against STAT3 reduces LPS-mediated induction of the chemokines Ccl20, Cx3cl1, Cxcl5 and Cxcl10 in primary astrocytes. Similar effects are observed *in vivo*, after intrathecal injection of the STAT3 inhibitor Stattic, in a LPS model of inflammation (Liu et al., 2013).

Lipocalin-2 (Lcn2) is one of the proteins released by reactive astrocytes (Zamanian et al., 2012). Its specific function in the brain is still unclear (Jha et al., 2015), but it may serve as an inflammatory mediator, as shown under chronic itch conditions (Shiratori-Hayashi et al., 2015). Lcn2 production by reactive astrocytes is dependent upon STAT3, as demonstrated by pharmacological inhibition in cultured astrocytes and astrocyte-specific KO of *stat3* in mice (Shiratori-Hayashi et al., 2015).

Molecules released by reactive astrocytes may further activate microglial cells or recruit immune cells from the periphery, contributing to a feed forward effect on neuroinflammation. Indeed, specific inhibition of the JAK–STAT3 pathway in astrocytes by SOCS3 reduces the mRNA levels of the microglial markers *Iba1* and *CD11b* in a mouse model of HD (Ben Haim et al., 2015b). Likewise, the astrocyte-specific KO of *stat3* reduces microglial reactivity induced by hypoxia–ischemia (Hristova et al., 2016). The factors released by astrocytes in a STAT3-dependant manner do not only activate microglial cells but also modulate their activity. For example, reactive astrocytes release yet unidentified factors that reduce the production of transforming growth factor β by microglia in culture (Nobuta et al., 2012).

The STAT3-dependent release of proteins by reactive astrocytes not only impacts microglial cells but also neurons. For example, facial nucleus axotomy increases mRNA levels of *thrombospondin-1 (tsp1)*, a secreted protein promoting synapse formation and stability during development) in reactive astrocytes. This induction is reduced in *Gfap-Cre* × *stat3^{fl/fl}* mice, which is associated with decreased synapse number and activity in neighboring neurons. Therefore, reactive astrocytes produce TSP1 in a STAT3-dependent manner, as further demonstrated by the direct binding of STAT3 to the *tsp1* promoter in astrocyte cultures (Tyzack et al., 2014). Recently, Anderson et al. showed that reactive astrocytes forming the glial scar after SCI, express a range of molecules in a STAT3-dependent manner (like chondroitin surface proteoglycans), which overall have axon-growth promoting effects (Anderson et al., 2016).

STAT3 modulates astrocyte morphology and migration

STAT3 plays a role in the migration of multiple cell types including glioblastoma cells (Zhang et al., 2015) and reactive astrocytes (Okada et al., 2006). The deletion of *Stat3* in reactive astrocytes (*Nestin-Cre* × *stat3^{fl/fl}*) reduces the migration of reactive astrocytes after *in vitro* scratch injury. Impaired migration after SCI could be responsible for the altered wound closure and enhanced infiltration of inflammatory cells observed in these mice. The opposite is observed in *Nestin-Cre* × *socs3^{fl/fl}* mice whose astrocytes display a quicker migration *in vitro* and an efficient compaction of the lesion in the spinal cord (Okada

et al., 2006). In different cell types, STAT3 regulates the transcription of genes implicated in matrix remodeling such as matrix metallo-proteinases MMP-1, MMP-2 and MMP-10 and the zinc transporter LIV-1, which regulates the expression of the adhesion molecule E-cadherin (Gao and Bromberg, 2006). In the spinal cord as well, *Nestin-Cre* × *stat3^{fl/fl}* mice exposed to SCI display lower mRNA levels of LIV-1 than wild-type littermates, and a concomitant increase in E-cadherin levels (Okada et al., 2006). The impairment of cell migration may thus be explained by the altered expression of cell adhesion proteins in absence of STAT3. But STAT3 may also regulate migration by non-canonical mechanisms. In neuronal cell lines and in fibroblasts, STAT3 was shown to interact with stathmin, a cytoplasmic protein that binds to tubulin and prevents its assembly into microtubules (Ng et al., 2006). The interaction of STAT3 with stathmin is also observed in cultured motoneurons, it promotes microtubule stability and axonal elongation. Intriguingly, this interaction requires Tyr705 phosphorylation but no transcriptional regulation (Selvaraj et al., 2012). It is currently unknown whether such non-canonical effects of STAT3 are involved in the migration of reactive astrocytes.

In fact, reactive astrocytes display limited capacity to migrate towards an injury site (Bardehle et al., 2013; Wanner et al., 2013); instead, astrocyte reactivity is characterized by striking morphological changes (hypertrophy, reorientation of processes). Such morphological plasticity appears to be regulated by STAT3 as well. During glial scar formation following SCI, the reorientation of astrocyte processes parallel to the lesion and the formation of bundles between apposed astrocytes are important to “corral” immune cells and fibroblasts. These morphological changes are disturbed in *Gfap-Cre* × *stat3^{fl/fl}* mice (Wanner et al., 2013). Following axotomy of the facial nucleus, reactive astrocytes increase their coverage of axotomized neuronal cell bodies, a response found altered in *stat3* KO astrocytes (Tyzack et al., 2014). Similarly, STAT3 induces the expression of growth associated protein 43, which contributes to increased process arborization in primary rat astrocytes exposed to LPS (Hung et al., 2016), confirming STAT3 importance for different types of morphological rearrangements. It is noteworthy that in neurons, STAT3 is also an important regulator of morphology and it promotes axonal regrowth (Moore and Goldberg, 2011).

STAT3 regulates mitochondrial functions

Interestingly, a pool of STAT3 proteins is present at the mitochondria (mSTAT3) and interacts with the complexes I and II of the electron transport chain (ETC) in the murine heart and liver (Wegrzyn et al., 2009). The KO of *stat3* in cultured B cells reduces complex I and II activities, which is restored by viral gene transfer of *stat3* (Wegrzyn et al., 2009). Strikingly, the effects of mSTAT3 on the ETC are mediated by its mitochondrial localization and its phosphorylation on Ser727 and not by its transcriptional activity. In other experimental conditions however, STAT3 does modulate metabolism by transcriptional regulation of genes involved in glycolysis and mitochondrial respiration. In particular, STAT3

induces the expression of hypoxia inducible factor 1 α , which promotes glycolysis over mitochondrial respiration (Demaria et al., 2010).

Does STAT3 play similar roles in astrocytes? Sarafian et al. found that cultured astrocytes from *Gfap-Cre* × *stat3^{fl/fl}* mice display lower mitochondrial mass and membrane potential and reduced ATP production (Sarafian et al., 2010). Inhibition of JAK2 by AG490 in wildtype astrocytes reproduces the decrease in mitochondrial membrane potential, suggesting that STAT3 operates through a canonical cascade involving JAK2 phosphorylation. The expression of several ETC enzymes is decreased in *stat3* KO astrocytes, further confirming that STAT3 regulation of astrocyte metabolism is controlled at the transcriptional level.

STAT3 may also lower the production of reactive oxygen species (ROS) by the mitochondria, although the mechanisms are still unclear (Szczepek et al., 2012; Yang and Rincon, 2016). Indeed, *stat3* KO astrocytes display increased generation of ROS and reduced levels of the antioxidant glutathione (Sarafian et al., 2010). STAT3 also promotes ROS detoxification by activating the expression of several antioxidant genes. For example in the mouse brain, STAT3 directly binds to the promoter of the manganese superoxide dismutase (MnSOD) gene, a mitochondrial enzyme that metabolizes superoxide anions (Jung et al., 2009). Inhibition of the JAK2–STAT3 pathway by AG490 or STAT3 decoy DNA in leptin-treated cultures of hippocampal neurons reduces MnSOD expression and increases ROS production (Guo et al., 2008). Other transcriptional targets of STAT3 include the uncoupling proteins (UCP), which are able to decrease mitochondrial ROS production (Negre-Salvayre et al., 1997). In astrocyte cultures treated with leukemia inhibitory factor (LIF), STAT3 is activated, binds to the *ucp2* promoter and increases its transcription. This new pool of *ucp2* mRNA can be later mobilized by astrocytes exposed to oxidative stress to quickly produce UCP2 protein (Lapp et al., 2014).

Lastly, STAT3 may have an anti-apoptotic action on the mitochondria. In cardiomyocytes, STAT3 prevents the formation of the mitochondrial permeability transition pore (Boengler et al., 2010) and enhances cell resistance to apoptotic stimuli (Szczepek et al., 2012). As for metabolic regulation and antioxidant defense, the anti-apoptotic effect of STAT3 is governed both by a direct action at the mitochondria, through interactions with components of the mitochondrial permeability transition pore, and by transcriptional regulation in the nucleus (Szczepek et al., 2012). STAT3 promotes the expression of anti-apoptotic genes like *bcl-xl* in neurons (Guo et al., 2008) and of *bcl2* in astrocytes (Sarafian et al., 2010; Gu et al., 2016).

Other important functions for STAT3 in astrocytes

There are a few additional functions regulated by STAT3 that are important for brain homeostasis or response to injury.

Ozog et al. found that activation of the JAK2–STAT3 pathway by ciliary neurotrophic factor (CNTF) increases mRNA and protein levels of connexin 43 (Cx43),

resulting in an enhanced gap junction-coupling between astrocytes (Ozog et al., 2004). They identified three putative SRE on the *cx43* promoter. Interestingly, CNTF-mediated increase in *Cx43* levels is also observed in reactive astrocytes of the rat brain (Escartin et al., 2006). Gap junction coupling plays key roles in the normal and diseased brain, modulating synaptic transmission and metabolic supply to neurons (Giaume et al., 2010).

Recently, STAT3 was found to regulate autophagy, a key homeostatic mechanism whose alteration is linked to many brain diseases (Choi et al., 2013). Cytoplasmic STAT3, through a transcription-independent mechanism involving the binding to PKR, tonically suppresses autophagy in cell lines (Shen et al., 2012, see Fig. 1). STAT3 also regulates the expression of genes involved in the control of the autophagic flux (You et al., 2015).

Finally, Doherty et al. reported that Stat92E regulates the ability of glial cells to engulf debris of dead neurons by enhancing the expression of the *Draper* receptor in *Drosophila* (Doherty et al., 2014). Interestingly, they report that the upstream activator of Stat92E is the G-protein Rac1, and not the JAK homologue, suggesting that in *Drosophila* glia, non-canonical pathways operate as well.

Overall, the range of astrocyte functions regulated by STAT3 is extremely large, and most of them appear to be of great importance for neuronal survival in disease conditions.

HOW DOES STAT3 GENERATE SO MANY FUNCTIONAL OUTCOMES?

Previous paragraphs illustrate a puzzling fact: a unique pathway is able to control diverse functions ranging from cell proliferation to morphological remodeling in many cell types and organs. Even within reactive astrocytes, STAT3 mediates various effects depending on the disease, brain region or model studied. How does a single protein trigger so many functional outcomes?

An easy explanation is that STAT3 does not act alone. Besides the JAK–STAT3 pathway, other signaling cascades may be activated in reactive astrocytes (Buffo et al., 2010; Kang and Hebert, 2011; Ben Haim et al., 2015a) and STAT3 may interact with other transcription factors in the nucleus (Hutchins et al., 2013).

Interactions between the JAK–STAT3 pathway and other cascades

For example, the MAPK pathways and the nuclear factor-kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B) pathway are sometimes found activated in reactive astrocytes (Ben Haim et al., 2015a). For example, IL-6 activates the MAPK and STAT3 pathways, and the equilibrium between the two is controlled by a Tyr motif on the IL-6 receptor (Eulenfeld et al., 2012). Many interactions may take place between the JAK–STAT3 and these other pathways (Yu et al., 2009): they may act in synergy on the same target genes, activate one another in cascade (e.g. STAT3 target genes are activators of the NF- κ B pathway,

and reciprocally) or regulate one other (e.g. MAPKs phosphorylate STAT3 on Ser727, modulating its transcriptional activity). Conversely, these pathways can inhibit one another or compete for binding sequences on gene promoters (Oeckinghaus et al., 2011).

The interaction between the JAK–STAT3 pathway and other signaling cascades is particularly well studied in the context of astroglialogenesis. The JAK–STAT3 pathway interacts with the fibroblast growth factor 2 pathway (Song and Ghosh, 2004), the Notch/Hes pathway (Kamakura et al., 2004), and the bone morphogenetic protein-2/Smad1 pathway (Nakashima et al., 1999), to activate the *gfap* promoter during development (see, Kanski et al., 2014 for a recent review).

The pattern of activation of these cascades in a disease-specific manner may underlie the diverse transcriptional and functional outcomes observed in reactive astrocytes.

A signaling code

Even without resorting to interactions with other signaling cascades, the canonical JAK–STAT3 pathway has already a large potential for complexity and signaling subtleties. There are many ligands, acting on different receptors, activating several JAKs; STAT3 can form heterodimers with other STATs, and the pathway is retro-controlled by several inhibitors (see details in section “The JAK–STAT3 pathway”). New modulators or interactors of the pathway are still being discovered (Icardi et al., 2012; Matsuda et al., 2015). Overall, there is an immense potential for signaling complexity within the JAK–STAT3 pathway (Ernst and Jenkins, 2004).

The upstream ligands activating STAT3 influence the resulting transcriptional and functional effects. For example, IL-6 and IL-10, two cytokines relying on STAT3 as their effector, have opposite effects on inflammatory processes. Computational modeling and experiments on dendritic cells revealed that this could be explained by different temporal profiles of STAT3 activation, resulting in different transcriptional outcomes (Braun et al., 2013). An emerging theme in cell signaling is that the intensity, duration, frequency and pattern of receptor stimulation encode information that translates into different transcriptional profiles (Lemmon et al., 2016).

Another level of complexity resides in the numerous PTMs on STAT3 (see Fig. 1). The pattern of PTMs constitutes a molecular code that significantly impacts the profile of genes regulated at a given time by STAT3 (see section “Additional branching points on the pathway increase the complexity of STAT3 signaling cascades”).

Finally, the non-canonical actions that STAT3 performs outside of the nucleus may further diversify STAT3 functional outputs in reactive astrocytes. How these non-canonical functions are regulated in the context of astrocyte reactivity is an open question.

Overall, the JAK–STAT3 pathway is composed of multiple elements that can generate significant signaling

complexity and contribute to the observed diversity in astrocyte reactivity.

Differential abilities to engage in STAT3 signaling

The functional outcomes mediated by STAT3 may be influenced by the cell's ability to mediate STAT3 signaling. Indeed, depending on the specific status of the cell, its response to the same stimulus on the JAK–STAT3 pathway will be different. Many factors can influence the capacity of a cell to efficiently operate the JAK–STAT3 pathway, including the abundance of pathway inhibitors, its epigenetic status, the activity of molecular machinery involved in signal transduction (e.g. nuclear import, ATP-dependent phosphorylation) and termination (e.g. nuclear export, phosphatase activity, degradation by the proteasome).

For example, the JAK–STAT3 pathway will be more or less active, depending on how much of SOCS and PIAS inhibitors are present and located at the right place to inhibit this pathway. SOCS3 is strongly induced by the JAK–STAT3 pathway, depending on the “signaling history” of the cell, the abundance of SOCS3 will vary (Linossi and Nicholson, 2015).

STAT3 binding to promoters is influenced by DNA and histone methylation, a regulation well described in the context of astrogliogenesis (Kanski et al., 2014, and section “STAT3 induces the expression of intermediate filament proteins”). Therefore, it is expected that the epigenetic status of the cell will impact the transcriptional outcomes of the JAK–STAT3 pathway.

The disease context itself may influence how a cell is able to respond to a stimulation of the JAK–STAT3 pathway. For example in *Drosophila*, the formation of tau aggregates in glia reduces STAT-dependent promoter activity (Colodner and Feany, 2010). Likewise, the amyloid β protein reduces the activity of the JAK–STAT3 pathway in neurons (Chiba et al., 2009).

Global impairment in the cell's ability to engage in a STAT3 response may occur in brain diseases. Several elements of the JAK–STAT3 pathway are sensitive to ROS, which are produced in many brain diseases (Duhe, 2013). Likewise, there is a consistent alteration in energy production in ND (Lin and Beal, 2006), which could affect the multiple energy-dependent steps of this cascade (e.g. phosphorylation, nuclear translocation, transcriptional induction). The activity of the JAK–STAT3 pathway is reduced in white matter astrocytes exposed to hypoxia (Raymond et al., 2011) and in the mouse brain after MCAO (Jung et al., 2009), confirming the importance of energy supply for proper STAT3 signaling. Finally, the nucleocytoplasmic transport is altered in some ND, due to the scavenging of key components of this system in toxic protein aggregates (Da Cruz and Cleveland, 2016), and this could directly prevent STAT3 signaling to the nucleus.

Therefore, depending on the disease and its stage of evolution, astrocytes will have variable intrinsic capabilities to trigger a STAT3-dependent response. This probably also contributes to the significant heterogeneity of the functional responses of reactive astrocytes in each disease context.

CONCLUSIONS AND PERSPECTIVES

Over the last decade, it has become clear that the JAK–STAT3 pathway, a signaling cascade initially described in the immune system, is very important for astrocyte development and response to injury. A thorough molecular dissection of the multiple interactors and regulators of this cascade has been performed in cell lines. It is now time to integrate this knowledge in the study of astrocyte response *in vivo*, and this is not a simple task (see Box 2). STAT3 appears to orchestrate numerous molecular and functional changes in reactive astrocytes. Much remains to be done to understand how a central signaling cascade mediates so many functional outcomes in astrocytes.

Deciphering the molecular code of astrocyte reactivity holds promising prospects for basic and medical science. It would make it possible to understand how the brain responds to each disease situation and to develop novel, efficient and, specific therapeutic strategies.

Box 2: Future questions and challenges

- What are the **endogenous activators** of this pathway during brain diseases (e.g. cytokines, growth factors, danger associated molecular patterns)?
- What is the **time course** of activation of the JAK–STAT3 pathway in reactive astrocytes, in relation to microglial activation or neuronal death?
- What are the **effects of PTMs** on STAT3 in reactive astrocytes?
- What are the **non-canonical functions of STAT3 in reactive astrocytes**, unrelated to transcriptional regulation?
- Can we define the networks of signaling cascades that control **each specific functional state** in reactive astrocytes?
- Can this pathway be **targeted for therapeutic purposes**?

Acknowledgments—L.B.H. and K.C. are recipients of a PhD fellowship from the CEA (IRTELIS program). L.A. holds a PhD fellowship from the “Region Ile-de-France” via the “DIM Cerveau et Pensée”.

C.E. was supported by French National Research Agency Grants 2010-JCJC-1402-1 and 2011-BSV4-021-03, CEA and CNRS. The authors wish to thank the LECMA-Vaincre Alzheimer organization (Grant FR-15015) and the Fédération pour la Recherche sur le Cerveau (FRC) for financial support.

We apologize for not being able to cite all original studies relevant to the topic of this review, due to space limitations. We thank Dr. S. Williams for proofreading the manuscript. We thank Dr. C. Atkins for providing the original images for Fig. 2A–C.

REFERENCES

- Acarin L, Gonzalez B, Castellano B (2000) STAT3 and NFkappaB activation precedes glial reactivity in the excitotoxically injured young cortex but not in the corresponding distal thalamic nuclei. *J Neuropathol Exp Neurol* 59:151–163.

- Akira S, Nishio Y, Inoue M, Wang XJ, Wei S, Matsusaka T, Yoshida K, Sudo T, Naruto M, Kishimoto T (1994) Molecular cloning of APRF, a novel IFN-stimulated gene factor 3 p91-related transcription factor involved in the gp130-mediated signaling pathway. *Cell* 77:63–71.
- Anderson MA, Burda JE, Ren Y, Ao Y, O'Shea TM, Kawaguchi R, Coppola G, Khakh BS, Deming TJ, Sofroniew MV (2016) Astrocyte scar formation aids central nervous system axon regeneration. *Nature*.
- Babon JJ, Varghese LN, Nicola NA (2014) Inhibition of IL-6 family cytokines by SOCS3. *Semin Immunol* 26:13–19.
- Bardehle S, Kruger M, Buggenthin F, Schwausch J, Ninkovic J, Clevers H, Snippert HJ, Theis FJ, Meyer-Luehmann M, Bechmann I, Dimou L, Gotz M (2013) Live imaging of astrocyte responses to acute injury reveals selective juxtavascular proliferation. *Nat Neurosci* 16:580–586.
- Ben Haim L, Carrillo-de Sauvage MA, Ceyzeriat K, Escartin C (2015a) Elusive roles for reactive astrocytes in neurodegenerative diseases. *Front Cell Neurosci* 9:278.
- Ben Haim L, Ceyzeriat K, Carrillo-de Sauvage MA, Aubry F, Auregan G, Guillermier M, Ruiz M, Petit F, Houitte D, Faivre E, Vandesquille M, Aron-Badin R, Dhenain M, Deglon N, Hantraye P, Brouillet E, Bonvento G, Escartin C (2015b) The JAK/STAT3 pathway is a common inducer of astrocyte reactivity in Alzheimer's and Huntington's diseases. *J Neurosci* 35:2817–2829.
- Boengler K, Hilfiker-Kleiner D, Heusch G, Schulz R (2010) Inhibition of permeability transition pore opening by mitochondrial STAT3 and its role in myocardial ischemia/reperfusion. *Basic Res Cardiol* 105:771–785.
- Bonni A, Sun Y, Nadal-Vicens M, Bhatt A, Frank DA, Rozovsky I, Stahl N, Yancopoulos GD, Greenberg ME (1997) Regulation of gliogenesis in the central nervous system by the JAK-STAT signaling pathway. *Science* 278:477–483.
- Braun DA, Fribourg M, Sealfon SC (2013) Cytokine response is determined by duration of receptor and signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3) activation. *J Biol Chem* 288:2986–2993.
- Bromberg JF, Wrzeszczynska MH, Devgan G, Zhao Y, Pestell RG, Albanese C, Darnell Jr JE (1999) Stat3 as an oncogene. *Cell* 98:295–303.
- Brooks AJ, Dai W, O'Mara ML, Abankwa D, Chhabra Y, Pelekanos RA, Gardon O, Tunny KA, Blucher KM, Morton CJ, Parker MW, Sierecki E, Gambin Y, Gomez GA, Alexandrov K, Wilson IA, Doxastakis M, Mark AE, Waters MJ (2014) Mechanism of activation of protein kinase JAK2 by the growth hormone receptor. *Science* 344:1249783.
- Buffo A, Rolando C, Ceruti S (2010) Astrocytes in the damaged brain: molecular and cellular insights into their reactive response and healing potential. *Biochem Pharmacol* 79:77–89.
- Burda JE, Sofroniew MV (2014) Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease. *Neuron* 81:229–248.
- Chen Y, Wu R, Chen HZ, Xiao Q, Wang WJ, He JP, Li XX, Yu XW, Li L, Wang P, Wan XC, Tian XH, Li SJ, Yu X, Wu Q (2015) Enhancement of hypothalamic STAT3 acetylation by nuclear receptor Nur77 dictates leptin sensitivity. *Diabetes* 64:2069–2081.
- Chiba T, Yamada M, Sasabe J, Terashita K, Shimoda M, Matsuoka M, Aiso S (2009) Amyloid-beta causes memory impairment by disturbing the JAK2/STAT3 axis in hippocampal neurons. *Mol Psychiatry* 14:206–222.
- Choi AM, Ryter SW, Levine B (2013) Autophagy in human health and disease. *N Engl J Med* 368:1845–1846.
- Choi JS, Kim SY, Cha JH, Choi YS, Sung KW, Oh ST, Kim ON, Chung JW, Chun MH, Lee SB, Lee MY (2003a) Upregulation of gp130 and STAT3 activation in the rat hippocampus following transient forebrain ischemia. *Glia* 41:237–246.
- Choi JS, Kim SY, Park HJ, Cha JH, Choi YS, Kang JE, Chung JW, Chun MH, Lee MY (2003b) Upregulation of gp130 and differential activation of STAT and p42/44 MAPK in the rat hippocampus following kainic acid-induced seizures. *Brain Res Mol Brain Res* 119:10–18.
- Chung CD, Liao J, Liu B, Rao X, Jay P, Berta P, Shuai K (1997) Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science* 278:1803–1805.
- Colodner KJ, Feany MB (2010) Glial fibrillary tangles and JAK/STAT-mediated glial and neuronal cell death in a Drosophila model of glial tauopathy. *J Neurosci* 30:16102–16113.
- Da Cruz S, Cleveland DW (2016) Cell Biology. Disrupted nuclear import–export in neurodegeneration. *Science* 351:125–126.
- Darnell Jr JE (1997) STATs and gene regulation. *Science* 277:1630–1635.
- Darnell Jr JE, Kerr IM, Stark GR (1994) Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 264:1415–1421.
- Dasgupta M, Dermawan JK, Willard B, Stark GR (2015) STAT3-driven transcription depends upon the dimethylation of K49 by EZH2. *Proc Natl Acad Sci USA* 112:3985–3990.
- de la Iglesia N, Puram SV, Bonni A (2009) STAT3 regulation of glioblastoma pathogenesis. *Curr Mol Med* 9:580–590.
- Decker T, Kovarik P (2000) Serine phosphorylation of STATs. *Oncogene* 19:2628–2637.
- Demaria M, Giorgi C, Lebedzinska M, Esposito G, D'Angeli L, Bartoli A, Gough DJ, Turkson J, Levy DE, Watson CJ, Wiecekowski MR, Provero P, Pinton P, Poli V (2010) A STAT3-mediated metabolic switch is involved in tumour transformation and STAT3 addiction. *Aging* 2:823–842.
- Dimou L, Gotz M (2014) Glial cells as progenitors and stem cells: new roles in the healthy and diseased brain. *Physiol Rev* 94:709–737.
- Doherty J, Sheehan AE, Bradshaw R, Fox AN, Lu TY, Freeman MR (2014) PI3K signaling and Stat92E converge to modulate glial responsiveness to axonal injury. *PLoS Biol* 12:e1001985.
- Duhe RJ (2013) Redox regulation of Janus kinase: the elephant in the room. *Jak-Stat* 2:e26141.
- Ernst M, Jenkins BJ (2004) Acquiring signalling specificity from the cytokine receptor gp130. *Trends Genet* 20:23–32.
- Escartin C, Brouillet E, Gubellini P, Trioulier Y, Jacquard C, Smadja C, Knott GW, Kerkerian-Le Goff L, Deglon N, Hantraye P, Bonvento G (2006) Ciliary neurotrophic factor activates astrocytes, redistributes their glutamate transporters GLAST and GLT-1 to raft microdomains, and improves glutamate handling in vivo. *J Neurosci* 26:5978–5989.
- Eufemi M, Cocchiola R, Romaniello D, Correani V, Di Francesco L, Fabrizi C, Maras B, Schinina ME (2015) Acetylation and phosphorylation of STAT3 are involved in the responsiveness of microglia to beta amyloid. *Neurochem Int* 81:48–56.
- Eulenfeld R, Dittrich A, Khouri C, Muller PJ, Mutze B, Wolf A, Schaper F (2012) Interleukin-6 signalling: more than Jaks and STATs. *Eur J Cell Biol* 91:486–495.
- Gabel K, Bednorz NL, Klemmt P, Vafaizadeh V, Borghouts C, Groner B (2010) Visualization of Stat3 and Stat5 transactivation activity with specific response element dependent reporter constructs integrated into lentiviral gene transfer vectors. *Horm Mol Biol Clin Invest* 1:127–137.
- Gao SP, Bromberg JF (2006) Touched and moved by STAT3. *Science's STKE* 2006.
- Gautron L, Lafon P, Chaigniau M, Tramu G, Laye S (2002) Spatiotemporal analysis of signal transducer and activator of transcription 3 activation in rat brain astrocytes and pituitary following peripheral immune challenge. *Neuroscience* 112:717–729.
- Giaume C, Koulakoff A, Roux L, Holcman D, Rouach N (2010) Astroglial networks: a step further in neuroglial and gliovascular interactions. *Nat Rev Neurosci* 11:87–99.
- Gu Y, He M, Zhou X, Liu J, Hou N, Bin T, Zhang Y, Li T, Chen J (2016) Endogenous IL-6 of mesenchymal stem cell improves behavioral outcome of hypoxic-ischemic brain damage neonatal rats by suppressing apoptosis in astrocyte. *Sci Rep* 6:18587.
- Guo Z, Jiang H, Xu X, Duan W, Mattson MP (2008) Leptin-mediated cell survival signaling in hippocampal neurons mediated by JAK/STAT3 and mitochondrial stabilization. *J Biol Chem* 283:1754–1763.

- He F, Ge W, Martinowich K, Becker-Catania S, Coskun V, Zhu W, Wu H, Castro D, Guillemot F, Fan G, de Vellis J, Sun YE (2005) A positive autoregulatory loop of Jak-STAT signaling controls the onset of astroglialogenesis. *Nat Neurosci* 8:616–625.
- Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Müller-Newen G, Schaper F (2003) Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* 374:1–20.
- Herrmann JE, Imura T, Song B, Qi J, Ao Y, Nguyen TK, Korsak RA, Takeda K, Akira S, Sofroniew MV (2008) STAT3 is a critical regulator of astroglial and scar formation after spinal cord injury. *J Neurosci* 28:7231–7243.
- Hol EM, Pekny M (2015) Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system. *Curr Opin Cell Biol* 32:121–130.
- Hristova M, Rocha-Ferreira E, Fontana X, Thei L, Buckle R, Christou M, Hompoonsup S, Gostelow N, Raivich G, Peebles D (2016) Inhibition of Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3) reduces neonatal hypoxic-ischaemic brain damage. *J Neurochem* 136:981–994.
- Hung CC, Lin CH, Chang H, Wang CY, Lin SH, Hsu PC, Sun YY, Lin TN, Shie FS, Kao LS, Chou CM, Lee YH (2016) Astrocytic GAP43 Induced by the TLR4/NF-kappaB/STAT3 Axis Attenuates Astroglial-Mediated Microglial Activation and Neurotoxicity. *J Neurosci* 36:2027–2043.
- Hutchins AP, Diez D, Takahashi Y, Ahmad S, Jauch R, Tremblay ML, Miranda-Saavedra D (2013) Distinct transcriptional regulatory modules underlie STAT3's cell type-independent and cell type-specific functions. *Nucleic Acids Res* 41:2155–2170.
- Icardi L, Mori R, Gesellchen V, Eyckerman S, De Cauwer L, Verhelst J, Vercauteren K, Saelens X, Meuleman P, Leroux-Roels G, De Bosscher K, Boutros M, Tavernier J (2012) The Sin3a repressor complex is a master regulator of STAT transcriptional activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 109:12058–12063.
- Ignarro RS, Vieira AS, Sartori CR, Langone F, Rogerio F, Parada CA (2013) JAK2 inhibition is neuroprotective and reduces astroglialosis after quinolinic acid striatal lesion in adult mice. *J Chem Neuroanat* 48–49:14–22.
- Jha MK, Lee S, Park DH, Kook H, Park KG, Lee IK, Suk K (2015) Diverse functional roles of lipocalin-2 in the central nervous system. *Neurosci Biobehav Rev* 49:135–156.
- Jung JE, Kim GS, Narasimhan P, Song YS, Chan PH (2009) Regulation of Mn-superoxide dismutase activity and neuroprotection by STAT3 in mice after cerebral ischemia. *J Neurosci* 29:7003–7014.
- Justicia C, Gabriel C, Planas AM (2000) Activation of the JAK/STAT pathway following transient focal cerebral ischemia: signaling through Jak1 and Stat3 in astrocytes. *Glia* 30:253–270.
- Kamakura S, Oishi K, Yoshimatsu T, Nakafuku M, Masuyama N, Gotoh Y (2004) Hes binding to STAT3 mediates crosstalk between Notch and JAK-STAT signalling. *Nat Cell Biol* 6:547–554.
- Kang W, Hebert JM (2011) Signaling pathways in reactive astrocytes, a genetic perspective. *Mol Neurobiol* 43:147–154.
- Kanski R, van Strien ME, van Tijn P, Hol EM (2014) A star is born: new insights into the mechanism of astrogenesis. *Cell Mol Life Sci* 71:433–447.
- Kershaw NJ, Murphy JM, Liao NP, Varghese LN, Laktyushin A, Whitlock EL, Lucet IS, Nicola NA, Babon JJ (2013) SOCS3 binds specific receptor-JAK complexes to control cytokine signaling by direct kinase inhibition. *Nat Struct Mol Biol* 20:469–476.
- Kim E, Kim M, Woo DH, Shin Y, Shin J, Chang N, Oh YT, Kim H, Rhee J, Nakano I, Lee C, Joo KM, Rich JN, Nam DH, Lee J (2013) Phosphorylation of EZH2 activates STAT3 signaling via STAT3 methylation and promotes tumorigenicity of glioblastoma stem-like cells. *Cancer Cell* 23:839–852.
- Kim YH, Chung JI, Woo HG, Jung YS, Lee SH, Moon CH, Suh-Kim H, Baik EJ (2010) Differential regulation of proliferation and differentiation in neural precursor cells by the Jak pathway. *Stem Cells* 28:1816–1828.
- Kohro Y, Sakaguchi E, Tashima R, Tozaki-Saitoh H, Okano H, Inoue K, Tsuda M (2015) A new minimally-invasive method for microinjection into the mouse spinal dorsal horn. *Sci Rep* 5:14306.
- Kretschmar AK, Dinger MC, Henze C, Brocke-Heidrich K, Horn F (2004) Analysis of Stat3 (signal transducer and activator of transcription 3) dimerization by fluorescence resonance energy transfer in living cells. *Biochem J* 377:289–297.
- Lapp DW, Zhang SS, Barnstable CJ (2014) Stat3 mediates LIF-induced protection of astrocytes against toxic ROS by upregulating the UPC2 mRNA pool. *Glia* 62:159–170.
- LeComte MD, Shimada IS, Sherwin C, Spees JL (2015) Notch1-STAT3-ETBR signaling axis controls reactive astrocyte proliferation after brain injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 112:8726–8731.
- Lemmon MA, Freed DM, Schlessinger J, Kiyatkin A (2016) The dark side of cell signaling: positive roles for negative regulators. *Cell* 164:1172–1184.
- Levine J, Kwon E, Paez P, Yan W, Czerwieńiec G, Loo JA, Sofroniew MV, Wanner IB (2015) Traumatically injured astrocytes release a proteomic signature modulated by STAT3-dependent cell survival. *Glia*.
- Li L, Shaw PE (2006) Elevated activity of STAT3C due to higher DNA binding affinity of phosphotyrosine dimer rather than covalent dimer formation. *J Biol Chem* 281:33172–33181.
- Li WX (2008) Canonical and non-canonical JAK-STAT signaling. *Trends Cell Biol* 18:545–551.
- Lim CP, Cao X (2006) Structure, function, and regulation of STAT proteins. *Mol Biosyst* 2:536–550.
- Lin MT, Beal MF (2006) Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 443:787–795.
- Linossi EM, Nicholson SE (2015) Kinase inhibition, competitive binding and proteasomal degradation: resolving the molecular function of the suppressor of cytokine signaling (SOCS) proteins. *Immunol Rev* 266:123–133.
- Liu X, Tian Y, Lu N, Gin T, Cheng CH, Chan MT (2013) Stat3 inhibition attenuates mechanical allodynia through transcriptional regulation of chemokine expression in spinal astrocytes. *PLoS One* 8:e75804.
- Lu JQ, Power C, Blevins G, Giuliani F, Yong VW (2013) The regulation of reactive changes around multiple sclerosis lesions by phosphorylated signal transducer and activator of transcription. *J Neuropathol Exp Neurol* 72:1135–1144.
- Matsuda T, Murotomoto R, Sekine Y, Togi S, Kitai Y, Kon S, Oritani K (2015) Signal transducer and activator of transcription 3 regulation by novel binding partners. *World J Biol Chem* 6:324–332.
- Mertens C, Darnell Jr JE (2007) SnapShot: JAK-STAT signaling. *Cell* 131:612.
- Meydan N, Grunberger T, Dadi H, Shahar M, Arpaia E, Lapidot Z, Leeder JS, Freedman M, Cohen A, Gazit A, Levitzki A, Roifman CM (1996) Inhibition of acute lymphoblastic leukaemia by a Jak-2 inhibitor. *Nature* 379:645–648.
- Mohr A, Chatain N, Domoszłai T, Rinis N, Sommerauer M, Vogt M, Müller-Newen G (2012) Dynamics and non-canonical aspects of JAK/STAT signalling. *Eur J Cell Biol* 91:524–532.
- Monteiro de Castro G, Deja NA, Ma D, Zhao C, Franklin RJ (2015) Astrocyte activation via Stat3 signaling determines the balance of oligodendrocyte versus schwann cell remyelination. *Am J Pathol* 185:2431–2440.
- Moore DL, Goldberg JL (2011) Multiple transcription factor families regulate axon growth and regeneration. *Dev Neurobiol* 71:1186–1211.
- Moravcova S, Cervena K, Pacesova D, Bendova Z (2016) Identification of STAT3 and STAT5 proteins in the rat suprachiasmatic nucleus and the day/night difference in astrocytic STAT3 phosphorylation in response to lipopolysaccharide. *J Neurosci Res* 94:99–108.
- Na YJ, Jin JK, Kim JI, Choi EK, Carp RI, Kim YS (2007) JAK-STAT signaling pathway mediates astroglialosis in brains of scrapie-infected mice. *J Neurochem* 103:637–649.
- Nakajima K, Yamanaka Y, Nakae K, Kojima H, Ichiba M, Kiuchi N, Kitaoka T, Fukada T, Hibi M, Hirano T (1996) A central role for

- Stat3 in IL-6-induced regulation of growth and differentiation in M1 leukemia cells. *EMBO J* 15:3651–3658.
- Nakashima K, Yanagisawa M, Arakawa H, Kimura N, Hisatsune T, Kawabata M, Miyazono K, Taga T (1999) Synergistic signaling in fetal brain by STAT3-Smad1 complex bridged by p300. *Science* 284:479–482.
- Negre-Salvayre A, Hirtz C, Carrera G, Cazenave R, Trolly M, Salvayre R, Penicaud L, Casteilla L (1997) A role for uncoupling protein-2 as a regulator of mitochondrial hydrogen peroxide generation. *FASEB J* 11:809–815.
- Ng DC, Lin BH, Lim CP, Huang G, Zhang T, Poli V, Cao X (2006) Stat3 regulates microtubules by antagonizing the depolymerization activity of stathmin. *J Cell Biol* 172:245–257.
- Nicolas CS, Peineau S, Amici M, Csaba Z, Fafouri A, Javalet C, Collett VJ, Hildebrandt L, Seaton G, Choi SL, Sim SE, Bradley C, Lee K, Zhuo M, Kaang BK, Gressens P, Dournaud P, Fitzjohn SM, Bortolotto ZA, Cho K, Collingridge GL (2012) The Jak/STAT pathway is involved in synaptic plasticity. *Neuron* 73:374–390.
- Nobuta H, Ghiani CA, Paez PM, Spreuer V, Dong H, Korsak RA, Manukyan A, Li J, Vinters HV, Huang EJ, Rowitch DH, Sofroniew MV, Campagnoni AT, de Vellis J, Waschek JA (2012) STAT3-mediated astroglialosis protects myelin development in neonatal brain injury. *Ann Neurol* 72:750–765.
- O'Callaghan JP, Kelly KA, VanGilder RL, Sofroniew MV, Miller DB (2014) Early activation of STAT3 regulates reactive astroglialosis induced by diverse forms of neurotoxicity. *PLoS One* 9:e102003.
- O'Callaghan JP, Sriram K (2004) Focused microwave irradiation of the brain preserves in vivo protein phosphorylation: comparison with other methods of sacrifice and analysis of multiple phosphoproteins. *J Neurosci Methods* 135:159–168.
- O'Shea JJ, Holland SM, Staudt LM (2013) JAKs and STATs in immunity, immunodeficiency, and cancer. *N Engl J Med* 368:161–170.
- Oeckinghaus A, Hayden MS, Ghosh S (2011) Crosstalk in NF- κ B signaling pathways. *Nat Immunol* 12:695–708.
- Okada S, Nakamura M, Katoh H, Miyao T, Shimazaki T, Ishii K, Yamane J, Yoshimura A, Iwamoto Y, Toyama Y, Okano H (2006) Conditional ablation of Stat3 or Socs3 discloses a dual role for reactive astrocytes after spinal cord injury. *Nat Med* 12:829–834.
- Oliva Jr AA, Kang Y, Sanchez-Molano J, Furones C, Atkins CM (2012) STAT3 signaling after traumatic brain injury. *J Neurochem* 120:710–720.
- Ozog MA, Bernier SM, Bates DC, Chatterjee B, Lo CW, Naus CC (2004) The complex of ciliary neurotrophic factor-ciliary neurotrophic factor receptor alpha up-regulates connexin43 and intercellular coupling in astrocytes via the Janus tyrosine kinase/signal transducer and activator of transcription pathway. *Mol Biol Cell* 15:4761–4774.
- Parpura V, Heneka MT, Montana V, Oliet SH, Schousboe A, Haydon PG, Stout Jr RF, Spray DC, Reichenbach A, Pannicke T, Pekny M, Pekna M, Zorec R, Verkhratsky A (2012) Glial cells in (patho)physiology. *J Neurochem* 121:4–27.
- Pekny M, Pekna M (2014) Astrocyte reactivity and reactive astroglialosis: costs and benefits. *Physiol Rev* 94:1077–1098.
- Pekny M, Pekna M, Messing A, Steinhauser C, Lee JM, Parpura V, Hol EM, Sofroniew MV, Verkhratsky A (2016) Astrocytes: a central element in neurological diseases. *Acta Neuropathol* 131:323–345.
- Pfrieger FW, Slezak M (2012) Genetic approaches to study glial cells in the rodent brain. *Glia* 60:681–701.
- Raymond M, Li P, Mangin JM, Huntsman M, Gallo V (2011) Chronic perinatal hypoxia reduces glutamate-aspartate transporter function in astrocytes through the Janus kinase/signal transducer and activator of transcription pathway. *J Neurosci* 31:17864–17871.
- Reich NC, Liu L (2006) Tracking STAT nuclear traffic. *Nat Rev Immunol* 6:602–612.
- Sarafian TA, Montes C, Imura T, Qi J, Coppola G, Geschwind DH, Sofroniew MV (2010) Disruption of astrocyte STAT3 signaling decreases mitochondrial function and increases oxidative stress in vitro. *PLoS One* 5:e9532.
- Schubert KO, Naumann T, Schnell O, Zhi Q, Steup A, Hofmann HD, Kirsch M (2005) Activation of STAT3 signaling in axotomized neurons and reactive astrocytes after fimbria-fornix transection. *Exp Brain Res* 165:520–531.
- Schust J, Sperl B, Hollis A, Mayer TU, Berg T (2006) Stattic: a small-molecule inhibitor of STAT3 activation and dimerization. *Chem Biol* 13:1235–1242.
- Selvaraj BT, Frank N, Bender FL, Asan E, Sendtner M (2012) Local axonal function of STAT3 rescues axon degeneration in the pmn model of motoneuron disease. *J Cell Biol* 199:437–451.
- Shen S, Niso-Santano M, Adjemian S, Takehara T, Malik SA, Minoux H, Souquere S, Marino G, Lachkar S, Senovilla L, Galluzzi L, Kepp O, Pierron G, Maiuri MC, Hikita H, Kroemer R, Kroemer G (2012) Cytoplasmic STAT3 represses autophagy by inhibiting PKR activity. *Mol Cell* 48:667–680.
- Shibata N, Kakita A, Takahashi H, Ihara Y, Nobukuni K, Fujimura H, Sakoda S, Sasaki S, Iwata M, Morikawa S, Hirano A, Kobayashi M (2009) Activation of signal transducer and activator of transcription-3 in the spinal cord of sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. *Neuro-degenerat Dis* 6:118–126.
- Shibata N, Yamamoto T, Hiroi A, Omi Y, Kato Y, Kobayashi M (2010) Activation of STAT3 and inhibitory effects of pioglitazone on STAT3 activity in a mouse model of SOD1-mutated amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropathology: official journal of the Japanese Society of Neuropathology* 30:353–360.
- Shiratori-Hayashi M, Koga K, Tozaki-Saitoh H, Kohro Y, Toyonaga H, Yamaguchi C, Hasegawa A, Nakahara T, Hachisuka J, Akira S, Okano H, Furue M, Inoue K, Tsuda M (2015) STAT3-dependent reactive astroglialosis in the spinal dorsal horn underlies chronic itch. *Nat Med* 21:927–931.
- Shuai K, Ziemiecki A, Wilks AF, Harpur AG, Sadowski HB, Gilman MZ, Darnell JE (1993) Polypeptide signalling to the nucleus through tyrosine phosphorylation of Jak and Stat proteins. *Nature* 366:580–583.
- Sirko S, Behrendt G, Johansson PA, Tripathi P, Costa M, Bek S, Heinrich C, Tiedt S, Colak D, Dichgans M, Fischer IR, Plesnila N, Staufenbiel M, Haass C, Snapyan M, Saghatelian A, Tsai LH, Fischer A, Grobe K, Dimou L, Gotz M (2013) Reactive glia in the injured brain acquire stem cell properties in response to sonic hedgehog [corrected]. *Cell Stem Cell* 12:426–439.
- Sofroniew MV (2009) Molecular dissection of reactive astroglialosis and glial scar formation. *Trends Neurosci* 32:638–647.
- Song MR, Ghosh A (2004) FGF2-induced chromatin remodeling regulates CNTF-mediated gene expression and astrocyte differentiation. *Nat Neurosci* 7:229–235.
- Sriram K, Benkovic SA, Hebert MA, Miller DB, O'Callaghan JP (2004) Induction of gp130-related cytokines and activation of JAK2/STAT3 pathway in astrocytes precedes up-regulation of glial fibrillary acidic protein in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model of neurodegeneration: key signaling pathway for astroglialosis in vivo? *J Biol Chem* 279:19936–19947.
- Stark GR, Darnell Jr JE (2012) The JAK-STAT pathway at twenty. *Immunity* 36:503–514.
- Szczepanek K, Lesniewski EJ, Larner AC (2012) Multi-tasking: nuclear transcription factors with novel roles in the mitochondria. *Trends Cell Biol* 22:429–437.
- Takizawa T, Nakashima K, Namihira M, Ochiai W, Uemura A, Yanagisawa M, Fujita N, Nakao M, Taga T (2001) DNA methylation is a critical cell-intrinsic determinant of astrocyte differentiation in the fetal brain. *Dev. Cell* 1:749–758.
- Tsuda M, Kohro Y, Yano T, Tsujikawa T, Kitano J, Tozaki-Saitoh H, Koyanagi S, Ohdo S, Ji RR, Salter MW, Inoue K (2011) JAK-STAT3 pathway regulates spinal astrocyte proliferation and neuropathic pain maintenance in rats. *Brain* 134:1127–1139.
- Tyzack GE, Sitnikov S, Barson D, Adams-Carr KL, Lau NK, Kwok JC, Zhao C, Franklin RJ, Karadottir RT, Fawcett JW, Lakatos A (2014) Astrocyte response to motor neuron injury promotes structural synaptic plasticity via STAT3-regulated TSP-1 expression. *Nat Commun* 5:4294.
- Verkhratsky A, Steardo L, Parpura V, Montana V (2015) Translational potential of astrocytes in brain disorders. *Progr Neurobiol*.

- Wang J, Li G, Wang Z, Zhang X, Yao L, Wang F, Liu S, Yin J, Ling EA, Wang L, Hao A (2012) High glucose-induced expression of inflammatory cytokines and reactive oxygen species in cultured astrocytes. *Neuroscience* 202:58–68.
- Wang R, Cherukuri P, Luo J (2005) Activation of Stat3 sequence-specific DNA binding and transcription by p300/CREB-binding protein-mediated acetylation. *J Biol Chem* 280:11528–11534.
- Wanner IB, Anderson MA, Song B, Levine J, Fernandez A, Gray-Thompson Z, Ao Y, Sofroniew MV (2013) Glial scar borders are formed by newly proliferated, elongated astrocytes that interact to corral inflammatory and fibrotic cells via STAT3-dependent mechanisms after spinal cord injury. *J Neurosci* 33:12870–12886.
- Washburn KB, Neary JT (2006) P2 purinergic receptors signal to STAT3 in astrocytes: Difference in STAT3 responses to P2Y and P2X receptor activation. *Neuroscience* 142:411–423.
- Wegrzyn J, Potla R, Chwae YJ, Sepuri NB, Zhang Q, Koeck T, Derecka M, Szczepanek K, Szeląg M, Gornicka A, Moh A, Moghaddas S, Chen Q, Bobbili S, Cichy J, Dulak J, Baker DP, Wolfman A, Stuehr D, Hassan MO, Fu XY, Avadhani N, Drake JI, Fawcett P, Lesnefsky EJ, Larner AC (2009) Function of mitochondrial Stat3 in cellular respiration. *Science* 323:793–797.
- Wen Z, Zhong Z, Darnell Jr JE (1995) Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. *Cell* 82:241–250.
- Xia XG, Hofmann HD, Deller T, Kirsch M (2002) Induction of STAT3 signaling in activated astrocytes and sprouting septal neurons following entorhinal cortex lesion in adult rats. *Mol Cell Neurosci* 21:379–392.
- Xu Z, Xue T, Zhang Z, Wang X, Xu P, Zhang J, Lei X, Li Y, Xie Y, Wang L, Fang M, Chen Y (2011) Role of signal transducer and activator of transcription-3 in up-regulation of GFAP after epilepsy. *Neurochem Res* 36:2208–2215.
- Yang J, Huang J, Dasgupta M, Sears N, Miyagi M, Wang B, Chance MR, Chen X, Du Y, Wang Y, An L, Wang Q, Lu T, Zhang X, Wang Z, Stark GR (2010) Reversible methylation of promoter-bound STAT3 by histone-modifying enzymes. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:21499–21504.
- Yang J, Stark GR (2008) Roles of unphosphorylated STATs in signaling. *Cell Res* 18:443–451.
- Yang R, Rincon M (2016) Mitochondrial Stat3, the Need for Design Thinking. *Int J Biol Sci* 12:532–544.
- Yeo S, Bandyopadhyay S, Messing A, Brenner M (2013) Transgenic analysis of GFAP promoter elements. *Glia* 61:1488–1499.
- You L, Wang Z, Li H, Shou J, Jing Z, Xie J, Sui X, Pan H, Han W (2015) The role of STAT3 in autophagy. *Autophagy* 11:729–739.
- Yu H, Pardoll D, Jove R (2009) STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat Rev Cancer* 9:798–809.
- Yuan ZL, Guan YJ, Chatterjee D, Chin YE (2005) Stat3 dimerization regulated by reversible acetylation of a single lysine residue. *Science* 307:269–273.
- Zamanian JL, Xu L, Foo LC, Nouri N, Zhou L, Giffard RG, Barres BA (2012) Genomic analysis of reactive astrogliosis. *J Neurosci* 32:6391–6410.
- Zhang S, Li W, Wang W, Zhang SS, Huang P, Zhang C (2013) Expression and activation of STAT3 in the astrocytes of optic nerve in a rat model of transient intraocular hypertension. *PLoS One* 8:e55683.
- Zhang Y, Ni S, Huang B, Wang L, Zhang X, Li X, Wang H, Liu S, Hao A, Li X (2015) Overexpression of SCLIP promotes growth and motility in glioblastoma cells. *Cancer Biol Ther* 16:97–105.
- Zhong Z, Wen Z, Darnell Jr JE (1994a) Stat3 and Stat4: members of the family of signal transducers and activators of transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:4806–4810.
- Zhong Z, Wen Z, Darnell Jr JE (1994b) Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. *Science* 264:95–98.
- Zhuang S (2013) Regulation of STAT signaling by acetylation. *Cell Signal* 25:1924–1931.

(Accepted 19 May 2016)
(Available online 27 May 2016)

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbott, N.J., Ronnback, L., and Hansson, E. (2006). Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nature Reviews. Neuroscience* 7, 41–53.
- Aboutit, S., and Zurzolo, C. (2012). Wiring through tunneling nanotubes--from electrical signals to organelle transfer. *J. Cell. Sci.* 125, 1089–1098.
- Acarin, L., Paris, J., González, B., and Castellano, B. (2002). Glial expression of small heat shock proteins following an excitotoxic lesion in the immature rat brain. *Glia* 38, 1–14.
- Acuna, A.I., Esparza, M., Kramm, C., Beltran, F.A., Parra, A.V., Cepeda, C., Toro, C.A., Vidal, R.L., Hetz, C., Concha, I., et al. (2013). A failure in energy metabolism and antioxidant uptake precede symptoms of Huntington's disease in mice. *Nature Communications* 4, 2917.
- Adamsky, A., Kol, A., Kreisel, T., Doron, A., Ozeri-Engelhard, N., Melcer, T., Refaeli, R., Horn, H., Regev, L., Groysman, M., et al. (2018). Astrocytic Activation Generates De Novo Neuronal Potentiation and Memory Enhancement. *Cell* 174, 59-71.e14.
- Allaman, I., Belanger, M., and Magistretti, P.J. (2011). Astrocyte-neuron metabolic relationships: for better and for worse. *Trends in Neurosciences* 34, 76–87.
- Allen, N.J. (2014). Astrocyte regulation of synaptic behavior. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 30, 439–463.
- de Almeida, L.P., Ross, C.A., Zala, D., Aebischer, P., and Deglon, N. (2002). Lentiviral-mediated delivery of mutant huntingtin in the striatum of rats induces a selective neuropathology modulated by polyglutamine repeat size, huntingtin expression levels, and protein length. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 22, 3473–3483.
- Alvarez, J.I., Katayama, T., and Prat, A. (2013). Glial influence on the blood brain barrier. *Glia* 61, 1939–1958.
- Anderson, M.A., Ao, Y., and Sofroniew, M.V. (2014). Heterogeneity of reactive astrocytes. *Neuroscience Letters* 565, 23–29.
- Anderson, M.A., Burda, J.E., Ren, Y., Ao, Y., O'Shea, T.M., Kawaguchi, R., Coppola, G., Khakh, B.S., Deming, T.J., and Sofroniew, M.V. (2016). Astrocyte scar formation aids central nervous system axon regeneration. *Nature*.
- Andrew, S.E., Goldberg, Y.P., Kremer, B., Telenius, H., Theilmann, J., Adam, S., Starr, E., Squitieri, F., Lin, B., and Kalchman, M.A. (1993). The relationship between trinucleotide (CAG) repeat length and clinical features of Huntington's disease. *Nat. Genet.* 4, 398–403.
- Andrews, N.W. (2000). Regulated secretion of conventional lysosomes. *Trends Cell Biol.* 10, 316–321.
- Andriezen, W.L. (1893). The Neuroglia Elements in the Human Brain. *Br Med J* 2, 227–230.
- Araque, A., Carmignoto, G., Haydon, P.G., Oliet, S.H., Robitaille, R., and Volterra, A. (2014). Gliotransmitters travel in time and space. *Neuron* 81, 728–739.
- Arndt, J.R., Chaibva, M., and Legleiter, J. (2015). The emerging role of the first 17 amino acids of huntingtin in Huntington's disease. *Biomol Concepts* 6, 33–46.
- Arrasate, M., and Finkbeiner, S. (2012). Protein aggregates in Huntington's disease. *Experimental Neurology* 238, 1–11.

- Arrasate, M., Mitra, S., Schweitzer, E.S., Segal, M.R., and Finkbeiner, S. (2004). Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death. *Nature* *431*, 805–810.
- Arregui, L., Benitez, J.A., Razgado, L.F., Vergara, P., and Segovia, J. (2011). Adenoviral astrocyte-specific expression of BDNF in the striata of mice transgenic for Huntington's disease delays the onset of the motor phenotype. *Cellular and Molecular Neurobiology* *31*, 1229–1243.
- Arzberger, T., Krampfl, K., Leimgruber, S., and Weindl, A. (1997). Changes of NMDA receptor subunit (NR1, NR2B) and glutamate transporter (GLT1) mRNA expression in Huntington's disease--an in situ hybridization study. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* *56*, 440–454.
- Ast, A., Buntru, A., Schindler, F., Hasenkopf, R., Schulz, A., Brusendorf, L., Klockmeier, K., Grelle, G., McMahon, B., Niederlechner, H., et al. (2018). mHTT Seeding Activity: A Marker of Disease Progression and Neurotoxicity in Models of Huntington's Disease. *Mol. Cell* *71*, 675-688.e6.
- Atkin, G., and Paulson, H. (2014). Ubiquitin pathways in neurodegenerative disease. *Front. Mol. Neurosci.* *7*.
- Azzouz, M., Kingsman, S.M., and Mazarakis, N.D. (2004). Lentiviral vectors for treating and modeling human CNS disorders. *J Gene Med* *6*, 951–962.
- Babcock, D.T., and Ganetzky, B. (2015). Non-cell autonomous cell death caused by transmission of Huntingtin aggregates in *Drosophila*. *Fly (Austin)* *9*, 107–109.
- Bachoo, R.M., Kim, R.S., Ligon, K.L., Maher, E.A., Brennan, C., Billings, N., Chan, S., Li, C., Rowitch, D.H., Wong, W.H., et al. (2004). Molecular diversity of astrocytes with implications for neurological disorders. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *101*, 8384–8389.
- Bachoud-Lévi, A.C., Déglon, N., Nguyen, J.P., Bloch, J., Bourdet, C., Winkel, L., Rémy, P., Goddard, M., Lefaucheur, J.P., Brugières, P., et al. (2000). Neuroprotective gene therapy for Huntington's disease using a polymer encapsulated BHK cell line engineered to secrete human CNTF. *Hum. Gene Ther.* *11*, 1723–1729.
- Bajramović, J.J., Bsibsi, M., Geutskens, S.B., Hassankhan, R., Verhulst, K.C., Stege, G.J., de Groot, C.J., and van Noort, J.M. (2000). Differential expression of stress proteins in human adult astrocytes in response to cytokines. *J. Neuroimmunol.* *106*, 14–22.
- Baker, D.J., Blackburn, D.J., Keatinge, M., Sokhi, D., Viskaitis, P., Heath, P.R., Ferraiuolo, L., Kirby, J., and Shaw, P.J. (2015). Lysosomal and phagocytic activity is increased in astrocytes during disease progression in the SOD1 (G93A) mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Front Cell Neurosci* *9*, 410.
- Balchin, D., Hayer-Hartl, M., and Hartl, F.U. (2016). In vivo aspects of protein folding and quality control. *Science* *353*, aac4354.
- Baldo, B., Weiss, A., Parker, C.N., Bibel, M., Paganetti, P., and Kaupmann, K. (2012). A screen for enhancers of clearance identifies huntingtin as a heat shock protein 90 (Hsp90) client protein. *J. Biol. Chem.* *287*, 1406–1414.
- Balleine, B.W., Liljeholm, M., and Ostlund, S.B. (2009). The integrative function of the basal ganglia in instrumental conditioning. *Behav. Brain Res.* *199*, 43–52.

- Ballinger, C.A., Connell, P., Wu, Y., Hu, Z., Thompson, L.J., Yin, L.Y., and Patterson, C. (1999). Identification of CHIP, a novel tetratricopeptide repeat-containing protein that interacts with heat shock proteins and negatively regulates chaperone functions. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 4535–4545.
- Bandyopadhyay, U., Kaushik, S., Varticovski, L., and Cuervo, A.M. (2008). The chaperone-mediated autophagy receptor organizes in dynamic protein complexes at the lysosomal membrane. *Mol. Cell. Biol.* *28*, 5747–5763.
- Bañez-Coronel, M., Porta, S., Kagerbauer, B., Mateu-Huertas, E., Pantano, L., Ferrer, I., Guzmán, M., Estivill, X., and Martí, E. (2012). A pathogenic mechanism in Huntington’s disease involves small CAG-repeated RNAs with neurotoxic activity. *PLoS Genet.* *8*, e1002481.
- Bardehle, S., Kruger, M., Buggenthin, F., Schwausch, J., Ninkovic, J., Clevers, H., Snippert, H.J., Theis, F.J., Meyer-Luehmann, M., Bechmann, I., et al. (2013). Live imaging of astrocyte responses to acute injury reveals selective juxtavascular proliferation. *Nature Neuroscience* *16*, 580–586.
- Barres, B.A. (2008). The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. *Neuron* *60*, 430–440.
- Barrett, A.J., and Rawlings, N.D. (2007). “Species” of peptidases. *Biol. Chem.* *388*, 1151–1157.
- von Bartheld, C.S., Bahney, J., and Herculano-Houzel, S. (2016). The search for true numbers of neurons and glial cells in the human brain: A review of 150 years of cell counting. *J. Comp. Neurol.* *524*, 3865–3895.
- Bason, M., Meister-Broekema, M., Alberts, N., Dijkers, P., Bergink, S., Sibon, O.C.M., and Kampinga, H.H. (2019). Astrocytic expression of the chaperone DNAJB6 results in non-cell autonomous protection in Huntington’s disease. *Neurobiol. Dis.* *124*, 108–117.
- 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.
- Bauer, P.O., Goswami, A., Wong, H.K., Okuno, M., Kurosawa, M., Yamada, M., Miyazaki, H., Matsumoto, G., Kino, Y., Nagai, Y., et al. (2010). Harnessing chaperone-mediated autophagy for the selective degradation of mutant huntingtin protein. *Nat. Biotechnol.* *28*, 256–263.
- Bay, V., and Butt, A.M. (2012). Relationship between glial potassium regulation and axon excitability: a role for glial Kir4.1 channels. *Glia* *60*, 651–660.
- Beal, M.F., Kowall, N.W., Ellison, D.W., Mazurek, M.F., Swartz, K.J., and Martin, J.B. (1986). Replication of the neurochemical characteristics of Huntington’s disease by quinolinic acid. *Nature* *321*, 168–171.
- Bedford, L., Hay, D., Devoy, A., Paine, S., Powe, D.G., Seth, R., Gray, T., Topham, I., Fone, K., Rezvani, N., et al. (2008). Depletion of 26S proteasomes in mouse brain neurons causes neurodegeneration and Lewy-like inclusions resembling human pale bodies. *J. Neurosci.* *28*, 8189–8198.
- Beenhakker, M.P., and Huguenard, J.R. (2010). Astrocytes as gatekeepers of GABAB receptor function. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* *30*, 15262–15276.

- Behrens, P.F., Franz, P., Woodman, B., Lindenberg, K.S., and Landwehrmeyer, G.B. (2002). Impaired glutamate transport and glutamate-glutamine cycling: downstream effects of the Huntington mutation. *Brain : A Journal of Neurology* 125, 1908–1922.
- Belanger, M., Allaman, I., and Magistretti, P.J. (2011). Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation. *Cell Metabolism* 14, 724–738.
- Bellot-Saez, A., Kékesi, O., Morley, J.W., and Buskila, Y. (2017). Astrocytic modulation of neuronal excitability through K⁺ spatial buffering. *Neurosci Biobehav Rev* 77, 87–97.
- Ben Achour, S., and Pascual, O. (2012). Astrocyte-neuron communication: functional consequences. *Neurochem. Res.* 37, 2464–2473.
- Ben Haim, L., and Rowitch, D.H. (2017). Functional diversity of astrocytes in neural circuit regulation. *Nat. Rev. Neurosci.* 18, 31–41.
- Ben Haim, L., Ceyzeriat, K., Carrillo-de Sauvage, M.A., Aubry, F., Auregan, G., Guillermier, M., Ruiz, M., Petit, F., Houitte, D., Faivre, E., et al. (2015a). The JAK/STAT3 Pathway Is a Common Inducer of Astrocyte Reactivity in Alzheimer's and Huntington's Diseases. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 35, 2817–2829.
- Ben Haim, L., Carrillo-de Sauvage, M.-A., Ceyzériat, K., and Escartin, C. (2015b). Elusive roles for reactive astrocytes in neurodegenerative diseases. *Front Cell Neurosci* 9, 278.
- Bennett, E.J., Shaler, T.A., Woodman, B., Ryu, K.Y., Zaitseva, T.S., Becker, C.H., Bates, G.P., Schulman, H., and Kopito, R.R. (2007). Global changes to the ubiquitin system in Huntington's disease. *Nature* 448, 704–708.
- Benraiss, A., Wang, S., Herrlinger, S., Li, X., Chandler-Militello, D., Mauceri, J., Burm, H.B., Toner, M., Osipovitch, M., Jim Xu, Q., et al. (2016). Human glia can both induce and rescue aspects of disease phenotype in Huntington disease. *Nat Commun* 7, 11758.
- Bercovich, B., Stancovski, I., Mayer, A., Blumenfeld, N., Laszlo, A., Schwartz, A.L., and Ciechanover, A. (1997). Ubiquitin-dependent degradation of certain protein substrates in vitro requires the molecular chaperone Hsc70. *J. Biol. Chem.* 272, 9002–9010.
- Bersuker, K., Brandeis, M., and Kopito, R.R. (2016). Protein misfolding specifies recruitment to cytoplasmic inclusion bodies. *J. Cell Biol.* 213, 229–241.
- Beurrier, C., Faideau, M., Bennouar, K.E., Escartin, C., Kerkerian-Le Goff, L., Bonvento, G., and Gubellini, P. (2010). Ciliary neurotrophic factor protects striatal neurons against excitotoxicity by enhancing glial glutamate uptake. *PLoS One* 5, e8550.
- Bhutani, N., Piccirillo, R., Hourez, R., Venkatraman, P., and Goldberg, A.L. (2012). Cathepsins L and Z are critical in degrading polyglutamine-containing proteins within lysosomes. *The Journal of Biological Chemistry* 287, 17471–17482.
- Bidmon, H.-J., Görg, B., Palomero-Gallagher, N., Behne, F., Lahl, R., Pannek, H.W., Speckmann, E.-J., and Zilles, K. (2004). Heat shock protein-27 is upregulated in the temporal cortex of patients with epilepsy. *Epilepsia* 45, 1549–1559.

Bignami, A., and Dahl, D. (1976). The astroglial response to stabbing. Immunofluorescence studies with antibodies to astrocyte-specific protein (GFA) in mammalian and submammalian vertebrates. *Neuropathol. Appl. Neuro* 2, 99-110.

Björkhem, I., and Meaney, S. (2004). Brain cholesterol: long secret life behind a barrier. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24, 806–815.

Bjorkqvist, M., Wild, E.J., Thiele, J., Silvestroni, A., Andre, R., Lahiri, N., Raibon, E., Lee, R.V., Benn, C.L., Soulet, D., et al. (2008). A novel pathogenic pathway of immune activation detectable before clinical onset in Huntington's disease. *The Journal of Experimental Medicine* 205, 1869–1877.

Bloch, J., Bachoud-Levi, A.C., Deglon, N., Lefaucheur, J.P., Winkel, L., Palfi, S., Nguyen, J.P., Bourdet, C., Gaura, V., Remy, P., et al. (2004). Neuroprotective gene therapy for Huntington's disease, using polymer-encapsulated cells engineered to secrete human ciliary neurotrophic factor: results of a phase I study. *Human Gene Therapy* 15, 968–975.

Blommaert, E.F., Krause, U., Schellens, J.P., Vreeling-Sindelárová, H., and Meijer, A.J. (1997). The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 inhibit autophagy in isolated rat hepatocytes. *Eur. J. Biochem.* 243, 240–246.

Blondel, O., Collin, C., McCarran, W.J., Zhu, S., Zamostiano, R., Gozes, I., Brenneman, D.E., and McKay, R.D. (2000). A glia-derived signal regulating neuronal differentiation. *J. Neurosci.* 20, 8012–8020.

Boland, B., Yu, W.H., Corti, O., Mollereau, B., Henriques, A., Bezard, E., Pastores, G.M., Rubinsztein, D.C., Nixon, R.A., Duchen, M.R., et al. (2018). Promoting the clearance of neurotoxic proteins in neurodegenerative disorders of ageing. *Nat Rev Drug Discov* 17, 660–688.

Borrell-Pagès, M., Zala, D., Humbert, S., and Saudou, F. (2006). Huntington's disease: from huntingtin function and dysfunction to therapeutic strategies. *Cell. Mol. Life Sci.* 63, 2642–2660.

Bose, S., and Cho, J. (2017). Targeting chaperones, heat shock factor-1, and unfolded protein response: Promising therapeutic approaches for neurodegenerative disorders. *Ageing Res. Rev.* 35, 155–175.

Bose, S., Stratford, F.L.L., Broadfoot, K.I., Mason, G.G.F., and Rivett, A.J. (2004). Phosphorylation of 20S proteasome alpha subunit C8 (alpha7) stabilizes the 26S proteasome and plays a role in the regulation of proteasome complexes by gamma-interferon. *Biochem J* 378, 177–184.

Boussicault, L., Hérard, A.-S., Calingasan, N., Petit, F., Malgorn, C., Merienne, N., Jan, C., Gaillard, M.-C., Lerchundi, R., Barros, L.F., et al. (2014). Impaired brain energy metabolism in the BACHD mouse model of Huntington's disease: critical role of astrocyte-neuron interactions. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 34, 1500–1510.

Boussicault, L., Alves, S., Lamazière, A., Planques, A., Heck, N., Mourné, L., Despres, G., Bolte, S., Hu, A., Pagès, C., et al. (2016). CYP46A1, the rate-limiting enzyme for cholesterol degradation, is neuroprotective in Huntington's disease. *Brain* 139, 953–970.

Bradford, J., Shin, J.Y., Roberts, M., Wang, C.E., Li, X.J., and Li, S. (2009). Expression of mutant huntingtin in mouse brain astrocytes causes age-dependent neurological symptoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 22480–22485.

Bradford, J., Shin, J.Y., Roberts, M., Wang, C.E., Sheng, G., Li, S., and Li, X.J. (2010). Mutant huntingtin in glial cells exacerbates neurological symptoms of Huntington disease mice. *The Journal of Biological Chemistry* 285, 10653–10661.

Brehme, M., Voisine, C., Rolland, T., Wachi, S., Soper, J.H., Zhu, Y., Orton, K., Vilella, A., Garza, D., Vidal, M., et al. (2014). A chaperome subnetwork safeguards proteostasis in aging and neurodegenerative disease. *Cell Rep* 9, 1135–1150.

Brouillet, E., Hantraye, P., Ferrante, R.J., Dolan, R., Leroy-Willig, A., Kowall, N.W., and Beal, M.F. (1995). Chronic mitochondrial energy impairment produces selective striatal degeneration and abnormal choreiform movements in primates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 7105–7109.

Brouillet, E., Condé, F., Beal, M.F., and Hantraye, P. (1999). Replicating Huntington's disease phenotype in experimental animals. *Prog. Neurobiol.* 59, 427–468.

Brück, W., Pförtner, R., Pham, T., Zhang, J., Hayardeny, L., Piryatinsky, V., Hanisch, U.-K., Regen, T., van Rossum, D., Brakelmann, L., et al. (2012). Reduced astrocytic NF- κ B activation by laquinimod protects from cuprizone-induced demyelination. *Acta Neuropathol.* 124, 411–424.

Bugg, C.W., Isas, J.M., Fischer, T., Patterson, P.H., and Langen, R. (2012). Structural features and domain organization of huntingtin fibrils. *J. Biol. Chem.* 287, 31739–31746.

Burda, J.E., Bernstein, A.M., and Sofroniew, M.V. (2016). Astrocyte roles in traumatic brain injury. *Experimental Neurology* 275 Pt 3, 305–315.

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.

Busch, A., Engemann, S., Lurz, R., Okazawa, H., Lehrach, H., and Wanker, E.E. (2003). Mutant huntingtin promotes the fibrillogenesis of wild-type huntingtin: a potential mechanism for loss of huntingtin function in Huntington's disease. *J. Biol. Chem.* 278, 41452–41461.

Bush, T.G., Puvanachandra, N., Horner, C.H., Polito, A., Ostensfeld, T., Svendsen, C.N., Mucke, L., Johnson, M.H., and Sofroniew, M.V. (1999). Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice. *Neuron* 23, 297–308.

Bushong, E.A., Martone, M.E., Jones, Y.Z., and Ellisman, M.H. (2002). Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 22, 183–192.

Byrne, L.M., Rodrigues, F.B., Blennow, K., Durr, A., Leavitt, B.R., Roos, R.A.C., Scahill, R.I., Tabrizi, S.J., Zetterberg, H., Langbehn, D., et al. (2017). Neurofilament light protein in blood as a potential biomarker of neurodegeneration in Huntington's disease: a retrospective cohort analysis. *Lancet Neurol* 16, 601–609.

Cahoy, J.D., Emery, B., Kaushal, A., Foo, L.C., Zamanian, J.L., Christopherson, K.S., Xing, Y., Lubischer, J.L., Krieg, P.A., Krupenko, S.A., et al. (2008). A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 28, 264–278.

- Cai, Z., Zeng, W., Tao, K., E, Z., Wang, B., and Yang, Q. (2015). Chaperone-mediated autophagy: roles in neuroprotection. *Neurosci Bull* 31, 452–458.
- Camandola, S. (2018). Astrocytes, emerging stars of energy homeostasis. *Cell Stress* 2, 246–252.
- Cambon, K., Zimmer, V., Martineau, S., Gaillard, M.-C., Jarrige, M., Bugi, A., Miniarikova, J., Rey, M., Hassig, R., Dufour, N., et al. (2017). Preclinical Evaluation of a Lentiviral Vector for Huntingtin Silencing. *Mol Ther Methods Clin Dev* 5, 259–276.
- Caron, N.S., Dorsey, E.R., and Hayden, M.R. (2018). Therapeutic approaches to Huntington disease: from the bench to the clinic. *Nat Rev Drug Discov* 17, 729–750.
- Cattaneo, E., Zuccato, C., and Tartari, M. (2005). Normal huntingtin function: an alternative approach to Huntington’s disease. *Nature Reviews. Neuroscience* 6, 919–930.
- Caughey, B., and Lansbury, P.T. (2003). Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders. *Annu. Rev. Neurosci.* 26, 267–298.
- Caviston, J.P., and Holzbaur, E.L.F. (2009). Huntingtin as an essential integrator of intracellular vesicular trafficking. *Trends Cell Biol.* 19, 147–155.
- Caviston, J.P., Ross, J.L., Antony, S.M., Tokito, M., and Holzbaur, E.L.F. (2007). Huntingtin facilitates dynein/dynactin-mediated vesicle transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 10045–10050.
- 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., Ariano, M.A., Calvert, C.R., Flores-Hernandez, J., Chandler, S.H., Leavitt, B.R., Hayden, M.R., and Levine, M.S. (2001). NMDA receptor function in mouse models of Huntington disease. *Journal of Neuroscience Research* 66, 525–539.
- Cepeda, C., Cummings, D.M., Andre, V.M., Holley, S.M., and Levine, M.S. (2010). Genetic mouse models of Huntington’s disease: focus on electrophysiological mechanisms. *ASN Neuro* 2, e00033.
- Ceyzeriat, K., Abjean, L., Carrillo-de Sauvage, M.A., Ben Haim, L., and Escartin, C. (2016). The complex STATES of astrocyte reactivity: How are they controlled by the JAK-STAT3 pathway? *Neuroscience* 330, 205–218.
- Ceyzériat, K., Ben Haim, L., Denizot, A., Pommier, D., Matos, M., Guillemaud, O., Palomares, M.-A., Abjean, L., Petit, F., Gipchtein, P., et al. (2018). Modulation of astrocyte reactivity improves functional deficits in mouse models of Alzheimer’s disease. *Acta Neuropathol Commun* 6, 104.
- Cha, J.-H.J. (2007). Transcriptional signatures in Huntington’s disease. *Prog. Neurobiol.* 83, 228–248.
- Chai, H., Diaz-Castro, B., Shigetomi, E., Monte, E., Oceau, J.C., Yu, X., Cohn, W., Rajendran, P.S., Vondriska, T.M., Whitelegge, J.P., et al. (2017). Neural Circuit-Specialized Astrocytes: Transcriptomic, Proteomic, Morphological, and Functional Evidence. *Neuron* 95, 531-549.e9.
- Chai, Y., Shao, J., Miller, V.M., Williams, A., and Paulson, H.L. (2002). Live-cell imaging reveals divergent intracellular dynamics of polyglutamine disease proteins and supports a sequestration model of pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 9310–9315.

- Chan, C.S., and Surmeier, D.J. (2014). Astrocytes go awry in Huntington's disease. *Nat. Neurosci.* *17*, 641–642.
- Charles, A.C., Merrill, J.E., Dirksen, E.R., and Sanderson, M.J. (1991). Intercellular signaling in glial cells: calcium waves and oscillations in response to mechanical stimulation and glutamate. *Neuron* *6*, 983–992.
- Cheetham, M.E., and Caplan, A.J. (1998). Structure, function and evolution of DnaJ: conservation and adaptation of chaperone function. *Cell Stress Chaperones* *3*, 28–36.
- Chen, M., and Wolynes, P.G. (2017). Aggregation landscapes of Huntingtin exon 1 protein fragments and the critical repeat length for the onset of Huntington's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *114*, 4406–4411.
- Choi, A.M., Ryter, S.W., and Levine, B. (2013). Autophagy in human health and disease. *The New England Journal of Medicine* *368*, 1845–1846.
- Choo, Y.S., Johnson, G.V.W., MacDonald, M., Detloff, P.J., and Lesort, M. (2004). Mutant huntingtin directly increases susceptibility of mitochondria to the calcium-induced permeability transition and cytochrome c release. *Hum. Mol. Genet.* *13*, 1407–1420.
- Chou, S.Y., Weng, J.Y., Lai, H.L., Liao, F., Sun, S.H., Tu, P.H., Dickson, D.W., and Chern, Y. (2008). Expanded-polyglutamine huntingtin protein suppresses the secretion and production of a chemokine (CCL5/RANTES) by astrocytes. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* *28*, 3277–3290.
- Christopherson, K.S., Ullian, E.M., Stokes, C.C., Mallowney, C.E., Hell, J.W., Agah, A., Lawler, J., Mosher, D.F., Bornstein, P., and Barres, B.A. (2005). Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis. *Cell* *120*, 421–433.
- Chung, W.S., Clarke, L.E., Wang, G.X., Stafford, B.K., Sher, A., Chakraborty, C., Joung, J., Foo, L.C., Thompson, A., Chen, C., et al. (2013). Astrocytes mediate synapse elimination through MEGF10 and MERTK pathways. *Nature* *504*, 394–400.
- Chung, W.-S., Allen, N.J., and Eroglu, C. (2015). Astrocytes Control Synapse Formation, Function, and Elimination. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *7*, a020370.
- Cicchetti, F., Lacroix, S., Cisbani, G., Vallieres, N., Saint-Pierre, M., St-Amour, I., Tolouei, R., Skepper, J.N., Hauser, R.A., Mantovani, D., et al. (2014). Mutant huntingtin is present in neuronal grafts in Huntington disease patients. *Annals of Neurology* *76*, 31–42.
- Ciechanover, A., and Kwon, Y.T. (2015). Degradation of misfolded proteins in neurodegenerative diseases: therapeutic targets and strategies. *Exp. Mol. Med.* *47*, e147.
- Ciechanover, A., and Kwon, Y.T. (2017). Protein Quality Control by Molecular Chaperones in Neurodegeneration. *Front Neurosci* *11*, 185.
- Cirillo, G., Maggio, N., Bianco, M.R., Vollono, C., Sellitti, S., and Papa, M. (2010). Discriminative behavioral assessment unveils remarkable reactive astrocytosis and early molecular correlates in basal ganglia of 3-nitropropionic acid subchronic treated rats. *Neurochem. Int.* *56*, 152–160.
- Clarke, L.E., Liddelow, S.A., Chakraborty, C., Münch, A.E., Heiman, M., and Barres, B.A. (2018). Normal aging induces A1-like astrocyte reactivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *115*, E1896–E1905.

- Colin, A., Faideau, M., Dufour, N., Auregan, G., Hassig, R., Andrieu, T., Brouillet, E., Hantraye, P., Bonvento, G., and Deglon, N. (2009). Engineered lentiviral vector targeting astrocytes in vivo. *Glia* 57, 667–679.
- 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.
- Connell, P., Ballinger, C.A., Jiang, J., Wu, Y., Thompson, L.J., Höhfeld, J., and Patterson, C. (2001). The co-chaperone CHIP regulates protein triage decisions mediated by heat-shock proteins. *Nat. Cell Biol.* 3, 93–96.
- Coppen, E.M., and Roos, R.A.C. (2017). Current Pharmacological Approaches to Reduce Chorea in Huntington’s Disease. *Drugs* 77, 29–46.
- Cortes, C.J., and La Spada, A.R. (2014). The many faces of autophagy dysfunction in Huntington’s disease: from mechanism to therapy. *Drug Discovery Today* 19, 963–971.
- Costa, V., and Scorrano, L. (2012). Shaping the role of mitochondria in the pathogenesis of Huntington’s disease. *EMBO J.* 31, 1853–1864.
- Costanzo, M., Abounit, S., Marzo, L., Danckaert, A., Chamoun, Z., Roux, P., and Zurzolo, C. (2013). Transfer of polyglutamine aggregates in neuronal cells occurs in tunneling nanotubes. *J. Cell. Sci.* 126, 3678–3685.
- Cowan, C.M., and Raymond, L.A. (2006). Selective neuronal degeneration in Huntington’s disease. *Curr. Top. Dev. Biol.* 75, 25–71.
- Cox, D., Raeburn, C., Sui, X., and Hatters, D.M. (2018). Protein aggregation in cell biology: An aggregomics perspective of health and disease. *Semin. Cell Dev. Biol.*
- Coyle, J.T., and Schwarcz, R. (1976). Lesion of striatal neurones with kainic acid provides a model for Huntington’s chorea. *Nature* 263, 244–246.
- Craufurd, D., Thompson, J.C., and Snowden, J.S. (2001). Behavioral changes in Huntington Disease. *Neuropsychiatry Neuropsychol Behav Neurol* 14, 219–226.
- Crotti, A., and Glass, C.K. (2015). The choreography of neuroinflammation in Huntington’s disease. *Trends Immunol.* 36, 364–373.
- Crotti, A., Benner, C., Kerman, B.E., Gosselin, D., Lagier-Tourenne, C., Zuccato, C., Cattaneo, E., Gage, F.H., Cleveland, D.W., and Glass, C.K. (2014). Mutant Huntingtin promotes autonomous microglia activation via myeloid lineage-determining factors. *Nature Neuroscience* 17, 513–521.
- Cuervo, A.M. (2004). Autophagy: many paths to the same end. *Mol. Cell. Biochem.* 263, 55–72.
- Cuervo, A.M., and Dice, J.F. (1996). A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. *Science* 273, 501–503.
- Cuervo, A.M., and Dice, J.F. (2000a). When lysosomes get old. *Exp. Gerontol.* 35, 119–131.
- Cuervo, A.M., and Dice, J.F. (2000b). Age-related decline in chaperone-mediated autophagy. *J. Biol. Chem.* 275, 31505–31513.

- Cuervo, A.M., and Wong, E. (2014). Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging. *Cell Res.* 24, 92–104.
- Cui, L., Jeong, H., Borovecki, F., Parkhurst, C.N., Tanese, N., and Krainc, D. (2006). Transcriptional repression of PGC-1alpha by mutant huntingtin leads to mitochondrial dysfunction and neurodegeneration. *Cell* 127, 59–69.
- Culver, B.P., Savas, J.N., Park, S.K., Choi, J.H., Zheng, S., Zeitlin, S.O., Yates, J.R., and Tanese, N. (2012). Proteomic analysis of wild-type and mutant huntingtin-associated proteins in mouse brains identifies unique interactions and involvement in protein synthesis. *J. Biol. Chem.* 287, 21599–21614.
- Cummings, D.M., Cepeda, C., and Levine, M.S. (2010). Alterations in striatal synaptic transmission are consistent across genetic mouse models of Huntington’s disease. *ASN Neuro* 2, e00036.
- Cunningham, C., Dunne, A., and Lopez-Rodriguez, A.B. (2018). Astrocytes: Heterogeneous and Dynamic Phenotypes in Neurodegeneration and Innate Immunity. *Neuroscientist* 1073858418809941.
- Dabir, D.V., Trojanowski, J.Q., Richter-Landsberg, C., Lee, V.M.-Y., and Forman, M.S. (2004). Expression of the small heat-shock protein alphaB-crystallin in tauopathies with glial pathology. *Am. J. Pathol.* 164, 155–166.
- Damiano, M., Galvan, L., Déglon, N., and Brouillet, E. (2010). Mitochondria in Huntington’s disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1802, 52–61.
- Damiano, M., Diguët, E., Malgorn, C., D’Aurelio, M., Galvan, L., Petit, F., Benhaim, L., Guillermier, M., Houitte, D., Dufour, N., et al. (2013). A role of mitochondrial complex II defects in genetic models of Huntington’s disease expressing N-terminal fragments of mutant huntingtin. *Hum. Mol. Genet.* 22, 3869–3882.
- Danbolt, N.C. (2001). Glutamate uptake. *Progress in Neurobiology* 65, 1–105.
- Daneman, R., and Prat, A. (2015). The blood-brain barrier. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7, a020412.
- Davies, S.W., Turmaine, M., Cozens, B.A., DiFiglia, M., Sharp, A.H., Ross, C.A., Scherzinger, E., Wanker, E.E., Mangiarini, L., and Bates, G.P. (1997). Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. *Cell* 90, 537–548.
- Davis, M.B., Bateman, D., Quinn, N.P., Marsden, C.D., and Harding, A.E. (1994). Mutation analysis in patients with possible but apparently sporadic Huntington’s disease. *Lancet* 344, 714–717.
- Déglon, N., and Hantraye, P. (2005). Viral vectors as tools to model and treat neurodegenerative disorders. *J Gene Med* 7, 530–539.
- Desplats, P.A., Kass, K.E., Gilmartin, T., Stanwood, G.D., Woodward, E.L., Head, S.R., Sutcliffe, J.G., and Thomas, E.A. (2006). Selective deficits in the expression of striatal-enriched mRNAs in Huntington’s disease. *J. Neurochem.* 96, 743–757.
- Di Pardo, A., Amico, E., Scalabri, F., Pepe, G., Castaldo, S., Elifani, F., Capocci, L., De Sanctis, C., Comerci, L., Pompeo, F., et al. (2017). Impairment of blood-brain barrier is an early event in R6/2 mouse model of Huntington Disease. *Sci Rep* 7, 41316.

Díaz-Hernández, M., Hernández, F., Martín-Aparicio, E., Gómez-Ramos, P., Morán, M.A., Castaño, J.G., Ferrer, I., Avila, J., and Lucas, J.J. (2003). Neuronal Induction of the Immunoproteasome in Huntington's Disease. *J. Neurosci.* *23*, 11653–11661.

Diaz-Hernandez, M., Hernandez, F., Martin-Aparicio, E., Gomez-Ramos, P., Moran, M.A., Castano, J.G., Ferrer, I., Avila, J., and Lucas, J.J. (2003). Neuronal induction of the immunoproteasome in Huntington's disease. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* *23*, 11653–11661.

Díaz-Hernández, M., Valera, A.G., Morán, M.A., Gómez-Ramos, P., Alvarez-Castelao, B., Castaño, J.G., Hernández, F., and Lucas, J.J. (2006). Inhibition of 26S proteasome activity by huntingtin filaments but not inclusion bodies isolated from mouse and human brain. *Journal of Neurochemistry* *98*, 1585–1596.

DiFiglia, M., Sapp, E., Chase, K., Schwarz, C., Meloni, A., Young, C., Martin, E., Vonsattel, J.P., Carraway, R., and Reeves, S.A. (1995). Huntingtin is a cytoplasmic protein associated with vesicles in human and rat brain neurons. *Neuron* *14*, 1075–1081.

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.

DiFiglia, M., Sena-Esteves, M., Chase, K., Sapp, E., Pfister, E., Sass, M., Yoder, J., Reeves, P., Pandey, R.K., Rajeev, K.G., et al. (2007). Therapeutic silencing of mutant huntingtin with siRNA attenuates striatal and cortical neuropathology and behavioral deficits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *104*, 17204–17209.

Dikic, I. (2017). Proteasomal and Autophagic Degradation Systems. *Annu. Rev. Biochem.* *86*, 193–224.

Ding, W.-X., and Yin, X.-M. (2008). Sorting, recognition and activation of the misfolded protein degradation pathways through macroautophagy and the proteasome. *Autophagy* *4*, 141–150.

Dobson, C.M. (2003). Protein folding and misfolding. *Nature* *426*, 884–890.

Douglass, J.D., Dorfman, M.D., and Thaler, J.P. (2017). Glia: silent partners in energy homeostasis and obesity pathogenesis. *Diabetologia* *60*, 226–236.

Dowie, M.J., Bradshaw, H.B., Howard, M.L., Nicholson, L.F.B., Faull, R.L.M., Hannan, A.J., and Glass, M. (2009). Altered CB1 receptor and endocannabinoid levels precede motor symptom onset in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Neuroscience* *163*, 456–465.

Dragatsis, I., Levine, M.S., and Zeitlin, S. (2000). Inactivation of Hdh in the brain and testis results in progressive neurodegeneration and sterility in mice. *Nature Genetics* *26*, 300–306.

Drouet, V., Perrin, V., Hassig, R., Dufour, N., Auregan, G., Alves, S., Bonvento, G., Brouillet, E., Luthi-Carter, R., Hantraye, P., et al. (2009). Sustained effects of nonallele-specific Huntingtin silencing. *Ann. Neurol.* *65*, 276–285.

Drouin-Ouellet, J., Sawiak, S.J., Cisbani, G., Lagacé, M., Kuan, W.-L., Saint-Pierre, M., Dury, R.J., Alata, W., St-Amour, I., Mason, S.L., et al. (2015). Cerebrovascular and blood-brain barrier impairments in Huntington's disease: Potential implications for its pathophysiology. *Ann. Neurol.* *78*, 160–177.

- Dunah, A.W., Jeong, H., Griffin, A., Kim, Y.-M., Standaert, D.G., Hersch, S.M., Mouradian, M.M., Young, A.B., Tanese, N., and Krainc, D. (2002). Sp1 and TAFII130 transcriptional activity disrupted in early Huntington's disease. *Science* 296, 2238–2243.
- Durrenberger, P.F., Filiou, M.D., Moran, L.B., Michael, G.J., Novoselov, S., Cheetham, M.E., Clark, P., Pearce, R.K.B., and Graeber, M.B. (2009). DnaJB6 is present in the core of Lewy bodies and is highly up-regulated in parkinsonian astrocytes. *J. Neurosci. Res.* 87, 238–245.
- Dvorzhak, A., Semtner, M., Faber, D.S., and Grantyn, R. (2013). Tonic mGluR5/CB1-dependent suppression of inhibition as a pathophysiological hallmark in the striatum of mice carrying a mutant form of huntingtin. *J. Physiol. (Lond.)* 591, 1145–1166.
- Dvorzhak, A., Vagner, T., Kirmse, K., and Grantyn, R. (2016). Functional Indicators of Glutamate Transport in Single Striatal Astrocytes and the Influence of Kir4.1 in Normal and Huntington Mice. *J. Neurosci.* 36, 4959–4975.
- Ehrlich, M.E. (2012). Huntington's disease and the striatal medium spiny neuron: cell-autonomous and non-cell-autonomous mechanisms of disease. *Neurotherapeutics* 9, 270–284.
- Eidelberg, D., and Surmeier, D.J. (2011). Brain networks in Huntington disease. *J. Clin. Invest.* 121, 484–492.
- 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.
- Elkharaz, J., Ugun-Klusek, A., Constantin-Teodosiu, D., Lawler, K., Mayer, R.J., Billett, E., Lowe, J., and Bedford, L. (2013). Implications for oxidative stress and astrocytes following 26S proteasomal depletion in mouse forebrain neurones. *Biochim. Biophys. Acta* 1832, 1930–1938.
- Emsley, J.G., and Macklis, J.D. (2006). Astroglial heterogeneity closely reflects the neuronal-defined anatomy of the adult murine CNS. *Neuron Glia Biology* 2, 175–186.
- Eng, L.F., Vanderhaeghen, J.J., Bignami, A., and Gerstl, B. (1971). An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. *Brain Research* 28, 351–354.
- Engelender, S., Sharp, A.H., Colomer, V., Tokito, M.K., Lanahan, A., Worley, P., Holzbaur, E.L., and Ross, C.A. (1997). Huntingtin-associated protein 1 (HAP1) interacts with the p150Glued subunit of dynactin. *Hum. Mol. Genet.* 6, 2205–2212.
- Eroglu, C., and Barres, B.A. (2010). Regulation of synaptic connectivity by glia. *Nature* 468, 223–231.
- Escartin, C., and Rouach, N. (2013). Astroglial networking contributes to neurometabolic coupling. *Frontiers in Neuroenergetics* 5, 4.
- Escartin, C., Brouillet, E., Gubellini, P., Trioulier, Y., Jacquard, C., Smadja, C., Knott, G.W., Kerkerian-Le Goff, L., Deglon, N., Hantraye, P., et al. (2006). Ciliary neurotrophic factor activates astrocytes, redistributes their glutamate transporters GLAST and GLT-1 to raft microdomains, and improves glutamate handling in vivo. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 26, 5978–5989.
- Escartin, C., Pierre, K., Colin, A., Brouillet, E., Delzescaux, T., Guillemier, M., Dhenain, M., Deglon, N., Hantraye, P., Pellerin, L., et al. (2007). Activation of astrocytes by CNTF induces metabolic plasticity

and increases resistance to metabolic insults. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 27, 7094–7104.

Estrada-Sánchez, A.M., Montiel, T., Segovia, J., and Massieu, L. (2009). Glutamate toxicity in the striatum of the R6/2 Huntington's disease transgenic mice is age-dependent and correlates with decreased levels of glutamate transporters. *Neurobiol. Dis.* 34, 78–86.

Faideau, M., Kim, J., Cormier, K., Gilmore, R., Welch, M., Auregan, G., Dufour, N., Guillemier, M., Brouillet, E., Hantraye, P., et al. (2010). In vivo expression of polyglutamine-expanded huntingtin by mouse striatal astrocytes impairs glutamate transport: a correlation with Huntington's disease subjects. *Human Molecular Genetics* 19, 3053–3067.

Fan, M.M.Y., Fernandes, H.B., Zhang, L.Y.J., Hayden, M.R., and Raymond, L.A. (2007). Altered NMDA receptor trafficking in a yeast artificial chromosome transgenic mouse model of Huntington's disease. *J. Neurosci.* 27, 3768–3779.

Faulkner, J.R., Herrmann, J.E., Woo, M.J., Tansey, K.E., Doan, N.B., and Sofroniew, M.V. (2004). Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 24, 2143–2155.

Ferrante, R.J. (2009). Mouse models of Huntington's disease and methodological considerations for therapeutic trials. *Biochim. Biophys. Acta* 1792, 506–520.

Finley, D. (2009). Recognition and Processing of Ubiquitin-Protein Conjugates by the Proteasome. *Annu Rev Biochem* 78, 477–513.

Forsberg, D., and Herlenius, E. (2018). Astrocyte networks modulate respiration - sniffing glue. *Respir Physiol Neurobiol.*

Furman, J.L., and Norris, C.M. (2014). Calcineurin and glial signaling: neuroinflammation and beyond. *Journal of Neuroinflammation* 11, 158.

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.

Galvan, L., André, V.M., Wang, E.A., Cepeda, C., and Levine, M.S. (2012). Functional Differences Between Direct and Indirect Striatal Output Pathways in Huntington's Disease. *J Huntingtons Dis* 1, 17–25.

Gamerding, M., Carra, S., and Behl, C. (2011). Emerging roles of molecular chaperones and co-chaperones in selective autophagy: focus on BAG proteins. *J. Mol. Med.* 89, 1175–1182.

Gao, Q., Wolfgang, M.J., Neschen, S., Morino, K., Horvath, T.L., Shulman, G.I., and Fu, X.Y. (2004). Disruption of neural signal transducer and activator of transcription 3 causes obesity, diabetes, infertility, and thermal dysregulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 4661–4666.

García-Cáceres, C., Quarta, C., Varela, L., Gao, Y., Gruber, T., Legutko, B., Jastroch, M., Johansson, P., Ninkovic, J., Yi, C.-X., et al. (2016). Astrocytic Insulin Signaling Couples Brain Glucose Uptake with Nutrient Availability. *Cell* *166*, 867–880.

Garcia-Marin, V., Garcia-Lopez, P., and Freire, M. (2007). Cajal's contributions to glia research. *Trends in Neurosciences* *30*, 479–487.

Garcia-Miralles, M., Hong, X., Tan, L.J., Caron, N.S., Huang, Y., To, X.V., Lin, R.Y., Franciosi, S., Papapetropoulos, S., Hayardeny, L., et al. (2016). Laquinimod rescues striatal, cortical and white matter pathology and results in modest behavioural improvements in the YAC128 model of Huntington disease. *Sci Rep* *6*, 31652.

Garcia-Segura, L.M., and Melcangi, R.C. (2006). Steroids and glial cell function. *Glia* *54*, 485–498.

Garwood, C.J., Ratcliffe, L.E., Simpson, J.E., Heath, P.R., Ince, P.G., and Wharton, S.B. (2017). Review: Astrocytes in Alzheimer's disease and other age-associated dementias: a supporting player with a central role. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* *43*, 281–298.

Gauthier, L.R., Charrin, B.C., Borrell-Pages, M., Dompierre, J.P., Rangone, H., Cordelieres, F.P., De Mey, J., MacDonald, M.E., Lessmann, V., Humbert, S., et al. (2004). Huntingtin controls neurotrophic support and survival of neurons by enhancing BDNF vesicular transport along microtubules. *Cell* *118*, 127–138.

Geary, R.S., Norris, D., Yu, R., and Bennett, C.F. (2015). Pharmacokinetics, biodistribution and cell uptake of antisense oligonucleotides. *Adv. Drug Deliv. Rev.* *87*, 46–51.

Gharami, K., Xie, Y., An, J.J., Tonegawa, S., and Xu, B. (2008). Brain-derived neurotrophic factor over-expression in the forebrain ameliorates Huntington's disease phenotypes in mice. *J. Neurochem.* *105*, 369–379.

Giacomello, M., Hudec, R., and Lopreiato, R. (2011). Huntington's disease, calcium, and mitochondria. *Biofactors* *37*, 206–218.

Giaume, C., Koulakoff, A., Roux, L., Holcman, D., and Rouach, N. (2010). Astroglial networks: a step further in neuroglial and gliovascular interactions. *Nature Reviews. Neuroscience* *11*, 87–99.

Gibbs, M.E., Hutchinson, D., and Hertz, L. (2008). Astrocytic involvement in learning and memory consolidation. *Neurosci Biobehav Rev* *32*, 927–944.

Gillis, J., Schipper-Krom, S., Juenemann, K., Gruber, A., Coolen, S., van den Nieuwendijk, R., van Veen, H., Overkleeft, H., Goedhart, J., Kampinga, H.H., et al. (2013). The DNAJB6 and DNAJB8 protein chaperones prevent intracellular aggregation of polyglutamine peptides. *J. Biol. Chem.* *288*, 17225–17237.

Ginés, S., Bosch, M., Marco, S., Gavaldà, N., Díaz-Hernández, M., Lucas, J.J., Canals, J.M., and Alberch, J. (2006). Reduced expression of the TrkB receptor in Huntington's disease mouse models and in human brain. *Eur. J. Neurosci.* *23*, 649–658.

Giralt, A., Friedman, H.C., Caneda-Ferron, B., Urban, N., Moreno, E., Rubio, N., Blanco, J., Peterson, A., Canals, J.M., and Alberch, J. (2010). BDNF regulation under GFAP promoter provides engineered astrocytes as a new approach for long-term protection in Huntington's disease. *Gene Therapy* *17*, 1294–1308.

- Glass, M., Dragunow, M., and Faull, R.L. (2000). The pattern of neurodegeneration in Huntington's disease: a comparative study of cannabinoid, dopamine, adenosine and GABA(A) receptor alterations in the human basal ganglia in Huntington's disease. *Neuroscience* 97, 505–519.
- Glick, D., Barth, S., and Macleod, K.F. (2010). Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J. Pathol.* 221, 3–12.
- Glickman, M.H., and Ciechanover, A. (2002). The Ubiquitin-Proteasome Proteolytic Pathway: Destruction for the Sake of Construction. *Physiological Reviews* 82, 373–428.
- Goedert, M., Falcon, B., Clavaguera, F., and Tolnay, M. (2014). Prion-like mechanisms in the pathogenesis of tauopathies and synucleinopathies. *Curr Neurol Neurosci Rep* 14, 495.
- Goldberg, Y.P., Kremer, B., Andrew, S.E., Theilmann, J., Graham, R.K., Squitieri, F., Telenius, H., Adam, S., Sajoo, A., and Starr, E. (1993). Molecular analysis of new mutations for Huntington's disease: intermediate alleles and sex of origin effects. *Nat. Genet.* 5, 174–179.
- Gong, B., Lim, M.C., Wanderer, J., Wyttenbach, A., and Morton, A.J. (2008). Time-lapse analysis of aggregate formation in an inducible PC12 cell model of Huntington's disease reveals time-dependent aggregate formation that transiently delays cell death. *Brain Research Bulletin* 75, 146–157.
- Gong, B., Kielar, C., and Morton, A.J. (2012). Temporal separation of aggregation and ubiquitination during early inclusion formation in transgenic mice carrying the Huntington's disease mutation. *PLoS ONE* 7, e41450.
- Gordon, G.R.J., Mulligan, S.J., and MacVicar, B.A. (2007). Astrocyte control of the cerebrovasculature. *Glia* 55, 1214–1221.
- Gorshkov, K., Aguisanda, F., Thorne, N., and Zheng, W. (2018). Astrocytes as targets for drug discovery. *Drug Discov. Today* 23, 673–680.
- Gourine, A.V., Kasymov, V., Marina, N., Tang, F., Figueiredo, M.F., Lane, S., Teschemacher, A.G., Spyer, K.M., Deisseroth, K., and Kasparov, S. (2010). Astrocytes control breathing through pH-dependent release of ATP. *Science* 329, 571–575.
- Grafton, S.T., Mazziotta, J.C., Pahl, J.J., St George-Hyslop, P., Haines, J.L., Gusella, J., Hoffman, J.M., Baxter, L.R., and Phelps, M.E. (1992). Serial changes of cerebral glucose metabolism and caudate size in persons at risk for Huntington's disease. *Archives of Neurology* 49, 1161–1167.
- Graham, R.K., Deng, Y., Slow, E.J., Haigh, B., Bissada, N., Lu, G., Pearson, J., Shehadeh, J., Bertram, L., Murphy, Z., et al. (2006). Cleavage at the caspase-6 site is required for neuronal dysfunction and degeneration due to mutant huntingtin. *Cell* 125, 1179–1191.
- Gray, M., Shirasaki, D.I., Cepeda, C., André, V.M., Wilburn, B., Lu, X.-H., Tao, J., Yamazaki, I., Li, S.-H., Sun, Y.E., et al. (2008). Full-length human mutant huntingtin with a stable polyglutamine repeat can elicit progressive and selective neuropathogenesis in BACHD mice. *J. Neurosci.* 28, 6182–6195.
- Griffin, T.A., Nandi, D., Cruz, M., Fehling, H.J., Kaer, L.V., Monaco, J.J., and Colbert, R.A. (1998). Immunoproteasome Assembly: Cooperative Incorporation of Interferon γ (IFN- γ)–inducible Subunits. *The Journal of Experimental Medicine* 187, 97–104.
- Groll, M., Ditzel, L., Löwe, J., Stock, D., Bochtler, M., Bartunik, H.D., and Huber, R. (1997). Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4Å resolution. *Nature* 386, 463–471.

- Groll, M., Bajorek, M., Köhler, A., Moroder, L., Rubin, D.M., Huber, R., Glickman, M.H., and Finley, D. (2000). A gated channel into the proteasome core particle. *Nature Structural & Molecular Biology* 7, 1062–1067.
- Guitart, K., Loers, G., Buck, F., Bork, U., Schachner, M., and Kleene, R. (2016). Improvement of neuronal cell survival by astrocyte-derived exosomes under hypoxic and ischemic conditions depends on prion protein. *Glia* 64, 896–910.
- Gunawardena, S., Her, L.-S., Bruschi, R.G., Laymon, R.A., Niesman, I.R., Gordesky-Gold, B., Sintasath, L., Bonini, N.M., and Goldstein, L.S.B. (2003). Disruption of axonal transport by loss of huntingtin or expression of pathogenic polyQ proteins in *Drosophila*. *Neuron* 40, 25–40.
- Guo, F., Liu, X., Cai, H., and Le, W. (2018a). Autophagy in neurodegenerative diseases: pathogenesis and therapy. *Brain Pathol.* 28, 3–13.
- Guo, Q., Bin Huang, null, Cheng, J., Seefelder, M., Engler, T., Pfeifer, G., Oeckl, P., Otto, M., Moser, F., Maurer, M., et al. (2018b). The cryo-electron microscopy structure of huntingtin. *Nature* 555, 117–120.
- Gutkunst, C.A., Levey, A.I., Heilman, C.J., Whaley, W.L., Yi, H., Nash, N.R., Rees, H.D., Madden, J.J., and Hersch, S.M. (1995). Identification and localization of huntingtin in brain and human lymphoblastoid cell lines with anti-fusion protein antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 8710–8714.
- Gutkunst, C.A., Li, S.H., Yi, H., Mulroy, J.S., Kuemmerle, S., Jones, R., Rye, D., Ferrante, R.J., Hersch, S.M., and Li, X.J. (1999). Nuclear and neuropil aggregates in Huntington's disease: relationship to neuropathology. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 19, 2522–2534.
- Guttenplan, K.A., and Liddel, S.A. (2019). Astrocytes and microglia: Models and tools. *J. Exp. Med.* 216, 71–83.
- Halassa, M.M., Fellin, T., Takano, H., Dong, J.-H., and Haydon, P.G. (2007). Synaptic islands defined by the territory of a single astrocyte. *J. Neurosci.* 27, 6473–6477.
- Halassa, M.M., Florian, C., Fellin, T., Munoz, J.R., Lee, S.Y., Abel, T., Haydon, P.G., and Frank, M.G. (2009). Astrocytic modulation of sleep homeostasis and cognitive consequences of sleep loss. *Neuron* 61, 213–219.
- Hamilton, J., Pellman, J.J., Brustovetsky, T., Harris, R.A., and Brustovetsky, N. (2015). Oxidative metabolism in YAC128 mouse model of Huntington's disease. *Hum. Mol. Genet.* 24, 4862–4878.
- Hanisch, U.-K., and Kettenmann, H. (2007). Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat. Neurosci.* 10, 1387–1394.
- Hara, T., Nakamura, K., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakahara, Y., Suzuki-Migishima, R., Yokoyama, M., Mishima, K., Saito, I., Okano, H., et al. (2006). Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* 441, 885–889.
- Harding, R.J., and Tong, Y.-F. (2018). Proteostasis in Huntington's disease: disease mechanisms and therapeutic opportunities. *Acta Pharmacol. Sin.* 39, 754–769.

- Hardingham, G.E., and Bading, H. (2010). Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* *11*, 682–696.
- Harjes, P., and Wanker, E.E. (2003). The hunt for huntingtin function: interaction partners tell many different stories. *Trends Biochem. Sci.* *28*, 425–433.
- Hartl, F.U., and Hayer-Hartl, M. (2009). Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *16*, 574–581.
- Hartl, F.U., Bracher, A., and Hayer-Hartl, M. (2011). Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature* *475*, 324–332.
- Hassel, B., Tessler, S., Faull, R.L., and Emson, P.C. (2008). Glutamate uptake is reduced in prefrontal cortex in Huntington's disease. *Neurochemical Research* *33*, 232–237.
- Hay, D.G., Sathasivam, K., Tobaben, S., Stahl, B., Marber, M., Mestrl, R., Mahal, A., Smith, D.L., Woodman, B., and Bates, G.P. (2004). Progressive decrease in chaperone protein levels in a mouse model of Huntington's disease and induction of stress proteins as a therapeutic approach. *Hum. Mol. Genet.* *13*, 1389–1405.
- Hayashi-Nishino, M., Fujita, N., Noda, T., Yamaguchi, A., Yoshimori, T., and Yamamoto, A. (2009). A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation. *Nat. Cell Biol.* *11*, 1433–1437.
- Haydon, P.G. (2001). GLIA: listening and talking to the synapse. *Nat. Rev. Neurosci.* *2*, 185–193.
- Haydon, P.G. (2017). Astrocytes and the modulation of sleep. *Curr. Opin. Neurobiol.* *44*, 28–33.
- Hebb, M.O., Denovan-Wright, E.M., and Robertson, H.A. (1999). Expression of the Huntington's disease gene is regulated in astrocytes in the arcuate nucleus of the hypothalamus of postpartum rats. *FASEB J.* *13*, 1099–1106.
- Hedreen, J.C., Peyser, C.E., Folstein, S.E., and Ross, C.A. (1991). Neuronal loss in layers V and VI of cerebral cortex in Huntington's disease. *Neurosci. Lett.* *133*, 257–261.
- Heinsen, H., Rüb, U., Bauer, M., Ulmar, G., Bethke, B., Schüler, M., Böcker, F., Eisenmenger, W., Götz, M., Korr, H., et al. (1999). Nerve cell loss in the thalamic mediodorsal nucleus in Huntington's disease. *Acta Neuropathol.* *97*, 613–622.
- Heneka, M.T., Kummer, M.P., and Latz, E. (2014). Innate immune activation in neurodegenerative disease. *Nature Reviews. Immunology* *14*, 463–477.
- Heng, M.Y., Detloff, P.J., and Albin, R.L. (2008). Rodent genetic models of Huntington disease. *Neurobiol. Dis.* *32*, 1–9.
- Hersch, S.M., Schifitto, G., Oakes, D., Bredlau, A.-L., Meyers, C.M., Nahin, R., Rosas, H.D., and Huntington Study Group CREST-E Investigators and Coordinators (2017). The CREST-E study of creatine for Huntington disease: A randomized controlled trial. *Neurology* *89*, 594–601.
- Hewings, D.S., Flygare, J.A., Bogyo, M., and Wertz, I.E. (2017). Activity-based probes for the ubiquitin conjugation-deconjugation machinery: new chemistries, new tools, and new insights. *FEBS J.* *284*, 1555–1576.

Hickey, M.A., Kosmalska, A., Enayati, J., Cohen, R., Zeitlin, S., Levine, M.S., and Chesselet, M.-F. (2008). Extensive early motor and non-motor behavioral deficits are followed by striatal neuronal loss in knock-in Huntington's disease mice. *Neuroscience* 157, 280–295.

Higashi, K., Fujita, A., Inanobe, A., Tanemoto, M., Doi, K., Kubo, T., and Kurachi, Y. (2001). An inwardly rectifying K(+) channel, Kir4.1, expressed in astrocytes surrounds synapses and blood vessels in brain. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 281, C922-931.

Hipp, M.S., Patel, C.N., Bersuker, K., Riley, B.E., Kaiser, S.E., Shaler, T.A., Brandeis, M., and Kopito, R.R. (2012). Indirect inhibition of 26S proteasome activity in a cellular model of Huntington's disease. *J Cell Biol* 196, 573–587.

Hochfeld, W.E., Lee, S., and Rubinsztein, D.C. (2013). Therapeutic induction of autophagy to modulate neurodegenerative disease progression. *Acta Pharmacol. Sin.* 34, 600–604.

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.

Holmans, P.A., Massey, T.H., and Jones, L. (2017). Genetic modifiers of Mendelian disease: Huntington's disease and the trinucleotide repeat disorders. *Hum. Mol. Genet.* 26, R83–R90.

Holmberg, C.I., Staniszewski, K.E., Mensah, K.N., Matouschek, A., and Morimoto, R.I. (2004). Inefficient degradation of truncated polyglutamine proteins by the proteasome. *The EMBO Journal* 23, 4307–4318.

Hong, Y., Zhao, T., Li, X.-J., and Li, S. (2016). Mutant Huntingtin Impairs BDNF Release from Astrocytes by Disrupting Conversion of Rab3a-GTP into Rab3a-GDP. *J. Neurosci.* 36, 8790–8801.

Hong, Y., Zhao, T., Li, X.-J., and Li, S. (2017). Mutant Huntingtin Inhibits α B-Crystallin Expression and Impairs Exosome Secretion from Astrocytes. *J. Neurosci.* 37, 9550–9563.

Hoogeveen, A.T., Willemsen, R., Meyer, N., de Rooij, K.E., Roos, R.A., van Ommen, G.J., and Galjaard, H. (1993). Characterization and localization of the Huntington disease gene product. *Hum. Mol. Genet.* 2, 2069–2073.

Hosp, F., Gutiérrez-Ángel, S., Schaefer, M.H., Cox, J., Meissner, F., Hipp, M.S., Hartl, F.-U., Klein, R., Dudanova, I., and Mann, M. (2017). Spatiotemporal Proteomic Profiling of Huntington's Disease Inclusions Reveals Widespread Loss of Protein Function. *Cell Rep* 21, 2291–2303.

Hsiao, H.Y., Chen, Y.C., Chen, H.M., Tu, P.H., and Chern, Y. (2013). A critical role of astrocyte-mediated nuclear factor- κ B-dependent inflammation in Huntington's disease. *Human Molecular Genetics* 22, 1826–1842.

Hsiao, H.-Y., Chiu, F.-L., Chen, C.-M., Wu, Y.-R., Chen, H.-M., Chen, Y.-C., Kuo, H.-C., and Chern, Y. (2014). Inhibition of soluble tumor necrosis factor is therapeutic in Huntington's disease. *Hum. Mol. Genet.* 23, 4328–4344.

Hsiao, H.-Y., Chen, Y.-C., Huang, C.-H., Chen, C.-C., Hsu, Y.-H., Chen, H.-M., Chiu, F.-L., Kuo, H.-C., Chang, C., and Chern, Y. (2015). Aberrant astrocytes impair vascular reactivity in Huntington disease. *Ann. Neurol.* 78, 178–192.

- Huang, B., Wei, W., Wang, G., Gaertig, M.A., Feng, Y., Wang, W., Li, X.-J., and Li, S. (2015). Mutant Huntingtin Downregulates Myelin Regulatory Factor-Mediated Myelin Gene Expression and Affects Mature Oligodendrocytes. *Neuron* 85, 1212–1226.
- Hughes, A.C., Mort, M., Elliston, L., Thomas, R.M., Brooks, S.P., Dunnett, S.B., and Jones, L. (2014). Identification of novel alternative splicing events in the huntingtin gene and assessment of the functional consequences using structural protein homology modelling. *J. Mol. Biol.* 426, 1428–1438.
- Hunter, J.M., Lesort, M., and Johnson, G.V. (2007). Ubiquitin-proteasome system alterations in a striatal cell model of Huntington's disease. *Journal of Neuroscience Research* 85, 1774–1788.
- Huntington Study Group (1996). Unified Huntington's Disease Rating Scale: reliability and consistency. *Huntington Study Group. Mov. Disord.* 11, 136–142.
- Iadecola, C., and Nedergaard, M. (2007). Glial regulation of the cerebral microvasculature. *Nat. Neurosci.* 10, 1369–1376.
- Ignarro, R.S., Vieira, A.S., Sartori, C.R., Langone, F., Rogerio, F., and Parada, C.A. (2013). JAK2 inhibition is neuroprotective and reduces astrogliosis after quinolinic acid striatal lesion in adult mice. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 48–49, 14–22.
- Iliff, J.J., Wang, M., Liao, Y., Plogg, B.A., Peng, W., Gundersen, G.A., Benveniste, H., Vates, G.E., Deane, R., Goldman, S.A., et al. (2012). A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid β . *Sci Transl Med* 4, 147ra111.
- Ishidoh, K., and Kominami, E. (2002). Processing and activation of lysosomal proteinases. *Biol. Chem.* 383, 1827–1831.
- Jana, N.R., and Nukina, N. (2005). BAG-1 associates with the polyglutamine-expanded huntingtin aggregates. *Neurosci. Lett.* 378, 171–175.
- Jana, N.R., Tanaka, M., Wang, G. h, and Nukina, N. (2000). Polyglutamine length-dependent interaction of Hsp40 and Hsp70 family chaperones with truncated N-terminal huntingtin: their role in suppression of aggregation and cellular toxicity. *Hum. Mol. Genet.* 9, 2009–2018.
- Jana, N.R., Dikshit, P., Goswami, A., Kotliarova, S., Murata, S., Tanaka, K., and Nukina, N. (2005). Co-chaperone CHIP Associates with Expanded Polyglutamine Protein and Promotes Their Degradation by Proteasomes. *J. Biol. Chem.* 280, 11635–11640.
- Jänen, S.B., Chaachouay, H., and Richter-Landsberg, C. (2010). Autophagy is activated by proteasomal inhibition and involved in aggregates clearance in cultured astrocytes. *Glia* 58, 1766–1774.
- Jang, M., Lee, S.E., and Cho, I.-H. (2018). Adeno-Associated Viral Vector Serotype DJ-Mediated Overexpression of N171-82Q-Mutant Huntingtin in the Striatum of Juvenile Mice Is a New Model for Huntington's Disease. *Front Cell Neurosci* 12, 157.
- Jansen, A.H., Reits, E.A., and Hol, E.M. (2014). The ubiquitin proteasome system in glia and its role in neurodegenerative diseases. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 7, 73.
- Jansen, A.H.P., van Hal, M., Op den Kelder, I.C., Meier, R.T., de Ruiter, A.-A., Schut, M.H., Smith, D.L., Grit, C., Brouwer, N., Kamphuis, W., et al. (2017). Frequency of nuclear mutant huntingtin inclusion formation in neurons and glia is cell-type-specific. *Glia* 65, 50–61.

- Jenkins, B.G., Koroshetz, W.J., Beal, M.F., and Rosen, B.R. (1993). Evidence for impairment of energy metabolism in vivo in Huntington's disease using localized ¹H NMR spectroscopy. *Neurology* 43, 2689–2695.
- Jeon, I., Cicchetti, F., Cisbani, G., Lee, S., Li, E., Bae, J., Lee, N., Li, L., Im, W., Kim, M., et al. (2016). Human-to-mouse prion-like propagation of mutant huntingtin protein. *Acta Neuropathol.* 132, 577–592.
- Jessen, N.A., Munk, A.S.F., Lundgaard, I., and Nedergaard, M. (2015). The Glymphatic System: A Beginner's Guide. *Neurochem. Res.* 40, 2583–2599.
- Jiang, J., Ballinger, C.A., Wu, Y., Dai, Q., Cyr, D.M., Höhfeld, J., and Patterson, C. (2001). CHIP is a U-box-dependent E3 ubiquitin ligase: identification of Hsc70 as a target for ubiquitylation. *J. Biol. Chem.* 276, 42938–42944.
- Jiang, R., Diaz-Castro, B., Looger, L.L., and Khakh, B.S. (2016). Dysfunctional Calcium and Glutamate Signaling in Striatal Astrocytes from Huntington's Disease Model Mice. *J. Neurosci.* 36, 3453–3470.
- Jimenez-Sanchez, M., Licitra, F., Underwood, B.R., and Rubinsztein, D.C. (2017). Huntington's Disease: Mechanisms of Pathogenesis and Therapeutic Strategies. *Cold Spring Harb Perspect Med* 7.
- Jocoy, E.L., André, V.M., Cummings, D.M., Rao, S.P., Wu, N., Ramsey, A.J., Caron, M.G., Cepeda, C., and Levine, M.S. (2011). Dissecting the contribution of individual receptor subunits to the enhancement of N-methyl-d-aspartate currents by dopamine D1 receptor activation in striatum. *Front Syst Neurosci* 5, 28.
- John Lin, C.C., Yu, K., Hatcher, A., Huang, T.W., Lee, H.K., Carlson, J., Weston, M.C., Chen, F., Zhang, Y., Zhu, W., et al. (2017). Identification of diverse astrocyte populations and their malignant analogs. *Nature Neuroscience*.
- Jones, B.E. (2009). Glia, adenosine, and sleep. *Neuron* 61, 156–157.
- Juenemann, K., Weisse, C., Reichmann, D., Kaether, C., Calkhoven, C.F., and Schilling, G. (2011). Modulation of mutant huntingtin N-terminal cleavage and its effect on aggregation and cell death. *Neurotox Res* 20, 120–133.
- Juenemann, K., Schipper-Krom, S., Wiemhoefer, A., Kloss, A., Sanz Sanz, A., and Reits, E.A. (2013). Expanded polyglutamine-containing N-terminal huntingtin fragments are entirely degraded by mammalian proteasomes. *The Journal of Biological Chemistry* 288, 27068–27084.
- Juenemann, K., Wiemhoefer, A., and Reits, E.A. (2015). Detection of ubiquitinated huntingtin species in intracellular aggregates. *Front Mol Neurosci* 8, 1.
- Juenemann, K., Jansen, A.H.P., van Riel, L., Merckx, R., Mulder, M.P.C., An, H., Statsyuk, A., Kirstein, J., Ovaa, H., and Reits, E.A. (2018). Dynamic recruitment of ubiquitin to mutant huntingtin inclusion bodies. *Sci Rep* 8, 1405.
- Jung, Y.-J., and Chung, W.-S. (2018). Phagocytic Roles of Glial Cells in Healthy and Diseased Brains. *Biomol Ther (Seoul)* 26, 350–357.
- Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2000). LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J.* 19, 5720–5728.

- Kacem, K., Lacombe, P., Seylaz, J., and Bonvento, G. (1998). Structural organization of the perivascular astrocyte endfeet and their relationship with the endothelial glucose transporter: a confocal microscopy study. *Glia* 23, 1–10.
- Kakkar, V., Månsson, C., de Mattos, E.P., Bergink, S., van der Zwaag, M., van Waarde, M.A.W.H., Kloosterhuis, N.J., Melki, R., van Cruchten, R.T.P., Al-Karadaghi, S., et al. (2016). The S/T-Rich Motif in the DNAJB6 Chaperone Delays Polyglutamine Aggregation and the Onset of Disease in a Mouse Model. *Mol. Cell* 62, 272–283.
- Kalchman, M.A., Graham, R.K., Xia, G., Koide, H.B., Hodgson, J.G., Graham, K.C., Goldberg, Y.P., Gietz, R.D., Pickart, C.M., and Hayden, M.R. (1996). Huntingtin Is Ubiquitinated and Interacts with a Specific Ubiquitin-conjugating Enzyme. *J. Biol. Chem.* 271, 19385–19394.
- Kaltenbach, L.S., Romero, E., Becklin, R.R., Chettier, R., Bell, R., Phansalkar, A., Strand, A., Torcassi, C., Savage, J., Hurlburt, A., et al. (2007). Huntingtin interacting proteins are genetic modifiers of neurodegeneration. *PLoS Genet.* 3, e82.
- Kaltschmidt, B., Widera, D., and Kaltschmidt, C. (2005). Signaling via NF-kappaB in the nervous system. *Biochimica et Biophysica Acta* 1745, 287–299.
- Kaminsky, V., and Zhivotovsky, B. (2012). Proteases in autophagy. *Biochim. Biophys. Acta* 1824, 44–50.
- Kampinga, H.H., and Craig, E.A. (2010). The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 579–592.
- Kang, W., and Hebert, J.M. (2011). Signaling pathways in reactive astrocytes, a genetic perspective. *Molecular Neurobiology* 43, 147–154.
- Kassubek, J., Juengling, F.D., Ecker, D., and Landwehrmeyer, G.B. (2005). Thalamic atrophy in Huntington's disease co-varies with cognitive performance: a morphometric MRI analysis. *Cereb. Cortex* 15, 846–853.
- Kaushik, S., and Cuervo, A.M. (2018). The coming of age of chaperone-mediated autophagy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19, 365–381.
- Kaushik, S., Massey, A.C., Mizushima, N., and Cuervo, A.M. (2008). Constitutive activation of chaperone-mediated autophagy in cells with impaired macroautophagy. *Mol. Biol. Cell* 19, 2179–2192.
- Kayed, R., Head, E., Thompson, J.L., McIntire, T.M., Milton, S.C., Cotman, C.W., and Glabe, C.G. (2003). Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science* 300, 486–489.
- Kegel, K.B., Meloni, A.R., Yi, Y., Kim, Y.J., Doyle, E., Cuiffo, B.G., Sapp, E., Wang, Y., Qin, Z.-H., Chen, J.D., et al. (2002). Huntingtin is present in the nucleus, interacts with the transcriptional corepressor C-terminal binding protein, and represses transcription. *J. Biol. Chem.* 277, 7466–7476.
- Kegel, K.B., Sapp, E., Yoder, J., Cuiffo, B., Sobin, L., Kim, Y.J., Qin, Z.-H., Hayden, M.R., Aronin, N., Scott, D.L., et al. (2005). Huntingtin associates with acidic phospholipids at the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 280, 36464–36473.

Kegel, K.B., Sapp, E., Alexander, J., Reeves, P., Bleckmann, D., Sobin, L., Masso, N., Valencia, A., Jeong, H., Krainc, D., et al. (2010). Huntingtin cleavage product A forms in neurons and is reduced by gamma-secretase inhibitors. *Mol Neurodegener* 5, 58.

Kershaw, N.J., Murphy, J.M., Liao, N.P., Varghese, L.N., Laktyushin, A., Whitlock, E.L., Lucet, I.S., Nicola, N.A., and Babon, J.J. (2013). SOCS3 binds specific receptor-JAK complexes to control cytokine signaling by direct kinase inhibition. *Nature Structural & Molecular Biology* 20, 469–476.

Kettenmann, H., and Ransom, B.R. (2004). The Concept of Neuroglia: A Historical Perspective. In *Neuroglia*, H. Kettenmann, and B.R. Ransom, eds. (Oxford University Press), p.

Kettern, N., Dreiseidler, M., Tawo, R., and Höhfeld, J. (2010). Chaperone-assisted degradation: multiple paths to destruction. *Biol. Chem.* 391, 481–489.

Khakh, B.S., and Sofroniew, M.V. (2015). Diversity of astrocyte functions and phenotypes in neural circuits. *Nature Neuroscience* 18, 942–952.

Khakh, B.S., Beaumont, V., Cachope, R., Munoz-Sanjuan, I., Goldman, S.A., and Grantyn, R. (2017). Unravelling and Exploiting Astrocyte Dysfunction in Huntington's Disease. *Trends Neurosci.* 40, 422–437.

Khoshnan, A., Ko, J., Watkin, E.E., Paige, L.A., Reinhart, P.H., and Patterson, P.H. (2004). Activation of the I κ B kinase complex and nuclear factor- κ B contributes to mutant huntingtin neurotoxicity. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 24, 7999–8008.

Kiffin, R., Kaushik, S., Zeng, M., Bandyopadhyay, U., Zhang, C., Massey, A.C., Martinez-Vicente, M., and Cuervo, A.M. (2007). Altered dynamics of the lysosomal receptor for chaperone-mediated autophagy with age. *J. Cell. Sci.* 120, 782–791.

Kim, J., Waldvogel, H.J., Faull, R.L.M., Curtis, M.A., and Nicholson, L.F.B. (2015). The RAGE receptor and its ligands are highly expressed in astrocytes in a grade-dependant manner in the striatum and subependymal layer in Huntington's disease. *J. Neurochem.* 134, 927–942.

Kim, S., Nollen, E.A.A., Kitagawa, K., Bindokas, V.P., and Morimoto, R.I. (2002). Polyglutamine protein aggregates are dynamic. *Nat. Cell Biol.* 4, 826–831.

Kim, Y.E., Hosp, F., Frottin, F., Ge, H., Mann, M., Hayer-Hartl, M., and Hartl, F.U. (2016). Soluble Oligomers of PolyQ-Expanded Huntingtin Target a Multiplicity of Key Cellular Factors. *Mol. Cell* 63, 951–964.

Kim, Y.J., Yi, Y., Sapp, E., Wang, Y., Cuiffo, B., Kegel, K.B., Qin, Z.H., Aronin, N., and DiFiglia, M. (2001). Caspase 3-cleaved N-terminal fragments of wild-type and mutant huntingtin are present in normal and Huntington's disease brains, associate with membranes, and undergo calpain-dependent proteolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 12784–12789.

Kim, Y.J., Sapp, E., Cuiffo, B.G., Sobin, L., Yoder, J., Kegel, K.B., Qin, Z.-H., Detloff, P., Aronin, N., and DiFiglia, M. (2006). Lysosomal proteases are involved in generation of N-terminal huntingtin fragments. *Neurobiol. Dis.* 22, 346–356.

Kimura, S., Noda, T., and Yoshimori, T. (2008). Dynein-dependent movement of autophagosomes mediates efficient encounters with lysosomes. *Cell Struct. Funct.* 33, 109–122.

- Kirkegaard, T., and Jäättelä, M. (2009). Lysosomal involvement in cell death and cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 1793, 746–754.
- Knowles, T.P.J., Vendruscolo, M., and Dobson, C.M. (2014). The amyloid state and its association with protein misfolding diseases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 384–396.
- Koehler, R.C., Roman, R.J., and Harder, D.R. (2009). Astrocytes and the regulation of cerebral blood flow. *Trends Neurosci.* 32, 160–169.
- Koga, H., Martinez-Vicente, M., Macian, F., Verkhusha, V.V., and Cuervo, A.M. (2011a). A photoconvertible fluorescent reporter to track chaperone-mediated autophagy. *Nat Commun* 2, 386.
- Koga, H., Martinez-Vicente, M., Arias, E., Kaushik, S., Sulzer, D., and Cuervo, A.M. (2011b). Constitutive upregulation of chaperone-mediated autophagy in Huntington’s disease. *J. Neurosci.* 31, 18492–18505.
- Koike, M., Shibata, M., Ezaki, J., Peters, C., Saftig, P., Kominami, E., and Uchiyama, Y. (2013). Differences in expression patterns of cathepsin C/dipeptidyl peptidase I in normal, pathological and aged mouse central nervous system. *Eur. J. Neurosci.* 37, 816–830.
- Kolli, N., Lu, M., Maiti, P., Rossignol, J., and Dunbar, G.L. (2017). CRISPR-Cas9 Mediated Gene-Silencing of the Mutant Huntingtin Gene in an In Vitro Model of Huntington’s Disease. *Int J Mol Sci* 18.
- Komatsu, M., Waguri, S., Chiba, T., Murata, S., Iwata, J., Tanida, I., Ueno, T., Koike, M., Uchiyama, Y., Kominami, E., et al. (2006). Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* 441, 880–884.
- Kordasiewicz, H.B., Stanek, L.M., Wancewicz, E.V., Mazur, C., McAlonis, M.M., Pytel, K.A., Artates, J.W., Weiss, A., Cheng, S.H., Shihabuddin, L.S., et al. (2012). Sustained therapeutic reversal of Huntington’s disease by transient repression of huntingtin synthesis. *Neuron* 74, 1031–1044.
- Koyuncu, S., Fatima, A., Gutierrez-Garcia, R., and Vilchez, D. (2017). Proteostasis of Huntingtin in Health and Disease. *International Journal of Molecular Sciences* 18, 1568.
- Kremer, B., Goldberg, P., Andrew, S.E., Theilmann, J., Telenius, H., Zeisler, J., Squitieri, F., Lin, B., Bassett, A., and Almqvist, E. (1994). A worldwide study of the Huntington’s disease mutation. The sensitivity and specificity of measuring CAG repeats. *N. Engl. J. Med.* 330, 1401–1406.
- Kuang, E., Qi, J., and Ronai, Z. (2013). Emerging roles of E3 ubiquitin ligases in autophagy. *Trends Biochem. Sci.* 38, 453–460.
- Kuemmerle, S., Gutekunst, C.A., Klein, A.M., Li, X.J., Li, S.H., Beal, M.F., Hersch, S.M., and Ferrante, R.J. (1999). Huntington aggregates may not predict neuronal death in Huntington’s disease. *Ann. Neurol.* 46, 842–849.
- Kuffler, S.W. (1967). Neuroglial cells: physiological properties and a potassium mediated effect of neuronal activity on the glial membrane potential. *Proc. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 168, 1–21.
- Küppenbender, K.D., Standaert, D.G., Feuerstein, T.J., Penney, J.B., Young, A.B., and Landwehrmeyer, G.B. (2000). Expression of NMDA receptor subunit mRNAs in neurochemically identified projection and interneurons in the human striatum. *J. Comp. Neurol.* 419, 407–421.

Kwan, W., Träger, U., Davalos, D., Chou, A., Bouchard, J., Andre, R., Miller, A., Weiss, A., Giorgini, F., Cheah, C., et al. (2012). Mutant huntingtin impairs immune cell migration in Huntington disease. *J. Clin. Invest.* *122*, 4737–4747.

Labbadia, J., and Morimoto, R.I. (2013). Huntington's disease: underlying molecular mechanisms and emerging concepts. *Trends Biochem. Sci.* *38*, 378–385.

Labbadia, J., Novoselov, S.S., Bett, J.S., Weiss, A., Paganetti, P., Bates, G.P., and Cheetham, M.E. (2012). Suppression of protein aggregation by chaperone modification of high molecular weight complexes. *Brain* *135*, 1180–1196.

Lackie, R.E., Maciejewski, A., Ostapchenko, V.G., Marques-Lopes, J., Choy, W.-Y., Duennwald, M.L., Prado, V.F., and Prado, M.A.M. (2017). The Hsp70/Hsp90 Chaperone Machinery in Neurodegenerative Diseases. *Front Neurosci* *11*, 254.

Lander, G.C., Estrin, E., Matyskiela, M.E., Bashore, C., Nogales, E., and Martin, A. (2012). Complete subunit architecture of the proteasome regulatory particle. *Nature* *482*, 186–191.

Langfelder, P., Cantele, J.P., Chatzopoulou, D., Wang, N., Gao, F., Al-Ramahi, I., Lu, X.-H., Ramos, E.M., El-Zein, K., Zhao, Y., et al. (2016). Integrated genomics and proteomics define huntingtin CAG length-dependent networks in mice. *Nat. Neurosci.* *19*, 623–633.

Lavisse, S., Guillermier, M., Hérard, A.-S., Petit, F., Delahaye, M., Van Camp, N., Ben Haim, L., Lebon, V., Remy, P., Dollé, F., et al. (2012). Reactive astrocytes overexpress TSPO and are detected by TSPO positron emission tomography imaging. *J. Neurosci.* *32*, 10809–10818.

Lee, M.C.S., Miller, E.A., Goldberg, J., Orci, L., and Schekman, R. (2004). Bi-directional protein transport between the ER and Golgi. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *20*, 87–123.

Legleiter, J., Lotz, G.P., Miller, J., Ko, J., Ng, C., Williams, G.L., Finkbeiner, S., Patterson, P.H., and Muchowski, P.J. (2009). Monoclonal antibodies recognize distinct conformational epitopes formed by polyglutamine in a mutant huntingtin fragment. *J. Biol. Chem.* *284*, 21647–21658.

Leitman, J., Ulrich Hartl, F., and Lederkremer, G.Z. (2013). Soluble forms of polyQ-expanded huntingtin rather than large aggregates cause endoplasmic reticulum stress. *Nat Commun* *4*, 2753.

Lenhossek, M. (1893). *Der feinere Bau des Nervensystems im Lichte neuester Forschung.* F.M. Buchhandlung, ed. (H. Kornfield), p.

Leoni, V., and Caccia, C. (2015). The impairment of cholesterol metabolism in Huntington disease. *Biochim. Biophys. Acta* *1851*, 1095–1105.

Leoni, V., Mariotti, C., Tabrizi, S.J., Valenza, M., Wild, E.J., Henley, S.M.D., Hobbs, N.Z., Mandelli, M.L., Grisoli, M., Björkhem, I., et al. (2008). Plasma 24S-hydroxycholesterol and caudate MRI in pre-manifest and early Huntington's disease. *Brain* *131*, 2851–2859.

Leoni, V., Long, J.D., Mills, J.A., Di Donato, S., Paulsen, J.S., and PREDICT-HD study group (2013). Plasma 24S-hydroxycholesterol correlation with markers of Huntington disease progression. *Neurobiol. Dis.* *55*, 37–43.

Lepore, A.C., Dejea, C., Carmen, J., Rauck, B., Kerr, D.A., Sofroniew, M.V., and Maragakis, N.J. (2008). Selective ablation of proliferating astrocytes does not affect disease outcome in either acute or chronic models of motor neuron degeneration. *Experimental Neurology* *211*, 423–432.

Lerner, R.P., Trejo Martinez Ldel, C., Zhu, C., Chesselet, M.F., and Hickey, M.A. (2012). Striatal atrophy and dendritic alterations in a knock-in mouse model of Huntington's disease. *Brain Research Bulletin* 87, 571–578.

Levine, M.S., Klapstein, G.J., Koppel, A., Gruen, E., Cepeda, C., Vargas, M.E., Jokel, E.S., Carpenter, E.M., Zanjani, H., Hurst, R.S., et al. (1999). Enhanced sensitivity to N-methyl-D-aspartate receptor activation in transgenic and knockin mouse models of Huntington's disease. *J. Neurosci. Res.* 58, 515–532.

Levy, D.E., and Darnell, J.E., Jr. (2002). Stats: transcriptional control and biological impact. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 3, 651–662.

Li, S.H., Gutekunst, C.A., Hersch, S.M., and Li, X.J. (1998). Interaction of huntingtin-associated protein with dynactin P150Glued. *J. Neurosci.* 18, 1261–1269.

Li, Y., Yui, D., Luikart, B.W., McKay, R.M., Li, Y., Rubenstein, J.L., and Parada, L.F. (2012). Conditional ablation of brain-derived neurotrophic factor-TrkB signaling impairs striatal neuron development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 15491–15496.

Liberto, C.M., Albrecht, P.J., Herx, L.M., Yong, V.W., and Levison, S.W. (2004). Pro-regenerative properties of cytokine-activated astrocytes. *J. Neurochem.* 89, 1092–1100.

Liddel, S.A., and Barres, B.A. (2017). Reactive Astrocytes: Production, Function, and Therapeutic Potential. *Immunity* 46, 957–967.

Liddel, S.A., Guttenplan, K.A., Clarke, L.E., Bennett, F.C., Bohlen, C.J., Schirmer, L., Bennett, M.L., Munch, A.E., Chung, W.S., Peterson, T.C., et al. (2017). Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature* 541, 481–487.

Lievens, J.C., Woodman, B., Mahal, A., Spasic-Bosovic, O., Samuel, D., Kerkerian-Le Goff, L., and Bates, G.P. (2001). Impaired glutamate uptake in the R6 Huntington's disease transgenic mice. *Neurobiology of Disease* 8, 807–821.

Lievens, J.C., Rival, T., Iche, M., Chneiweiss, H., and Birman, S. (2005). Expanded polyglutamine peptides disrupt EGF receptor signaling and glutamate transporter expression in *Drosophila*. *Human Molecular Genetics* 14, 713–724.

Lilienbaum, A. (2013). Relationship between the proteasomal system and autophagy. *Int J Biochem Mol Biol* 4, 1–26.

Lin, C.H., Tallaksen-Greene, S., Chien, W.M., Cearley, J.A., Jackson, W.S., Crouse, A.B., Ren, S., Li, X.J., Albin, R.L., and Detloff, P.J. (2001). Neurological abnormalities in a knock-in mouse model of Huntington's disease. *Hum. Mol. Genet.* 10, 137–144.

Lin, F., Wu, J., Wang, Y., and Qin, Z. (2007). Huntingtin cleavage induced by thrombin in vitro. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)* 39, 15–18.

Lin, L., Jin, Z., Tan, H., Xu, Q., Peng, T., and Li, H. (2016). Atypical ubiquitination by E3 ligase WWP1 inhibits the proteasome-mediated degradation of mutant huntingtin. *Brain Res.* 1643, 103–112.

Lin, Z., Zhao, D., and Yang, L. (2013). Interaction between misfolded PrP and the ubiquitin-proteasome system in prion-mediated neurodegeneration. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 45, 477–484.

- Liot, G., Zala, D., Pla, P., Mottet, G., Piel, M., and Saudou, F. (2013). Mutant Huntingtin alters retrograde transport of TrkB receptors in striatal dendrites. *J. Neurosci.* *33*, 6298–6309.
- Liot, G., Valette, J., Pépin, J., Flament, J., and Brouillet, E. (2017). Energy defects in Huntington's disease: Why "in vivo" evidence matters. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *483*, 1084–1095.
- Liu, C.-C., Lin, Y.-C., Chen, Y.-H., Chen, C.-M., Pang, L.-Y., Chen, H.-A., Wu, P.-R., Lin, M.-Y., Jiang, S.-T., Tsai, T.-F., et al. (2016). Cul3-KLHL20 Ubiquitin Ligase Governs the Turnover of ULK1 and VPS34 Complexes to Control Autophagy Termination. *Mol. Cell* *61*, 84–97.
- Liu, Y., Wong, T.P., Aarts, M., Rooyackers, A., Liu, L., Lai, T.W., Wu, D.C., Lu, J., Tymianski, M., Craig, A.M., et al. (2007). NMDA receptor subunits have differential roles in mediating excitotoxic neuronal death both in vitro and in vivo. *J. Neurosci.* *27*, 2846–2857.
- Liuzzo, J.P., Petanceska, S.S., and Devi, L.A. (1999). Neurotrophic factors regulate cathepsin S in macrophages and microglia: A role in the degradation of myelin basic protein and amyloid beta peptide. *Mol. Med.* *5*, 334–343.
- Lobsiger, C.S., and Cleveland, D.W. (2007). Glial cells as intrinsic components of non-cell-autonomous neurodegenerative disease. *Nature Neuroscience* *10*, 1355–1360.
- Lovatt, D., Sonnewald, U., Waagepetersen, H.S., Schousboe, A., He, W., Lin, J.H., Han, X., Takano, T., Wang, S., Sim, F.J., et al. (2007). The transcriptome and metabolic gene signature of protoplasmic astrocytes in the adult murine cortex. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* *27*, 12255–12266.
- Lunkes, A., Lindenberg, K.S., Ben-Haiem, L., Weber, C., Devys, D., Landwehrmeyer, G.B., Mandel, J.-L., and Trottier, Y. (2002). Proteases acting on mutant huntingtin generate cleaved products that differentially build up cytoplasmic and nuclear inclusions. *Mol. Cell* *10*, 259–269.
- Lynch-Day, M.A., and Klionsky, D.J. (2010). The Cvt pathway as a model for selective autophagy. *FEBS Lett.* *584*, 1359–1366.
- Maiti, P., Manna, J., Veleri, S., and Frautschy, S. (2014). Molecular chaperone dysfunction in neurodegenerative diseases and effects of curcumin. *Biomed Res Int* *2014*, 495091.
- Malkki, H. (2016). Huntington disease: Selective deactivation of Huntington disease mutant allele by CRISPR-Cas9 gene editing. *Nat Rev Neurol* *12*, 614–615.
- Mandal, M., Wei, J., Zhong, P., Cheng, J., Duffney, L.J., Liu, W., Yuen, E.Y., Twelvetrees, A.E., Li, S., Li, X.-J., et al. (2011). Impaired alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptor trafficking and function by mutant huntingtin. *J. Biol. Chem.* *286*, 33719–33728.
- Mangiarini, L., Sathasivam, K., Seller, M., Cozens, B., Harper, A., Hetherington, C., Lawton, M., Trottier, Y., Lehrach, H., Davies, S.W., et al. (1996). Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell* *87*, 493–506.
- Mangiarini, L., Sathasivam, K., Mahal, A., Mott, R., Seller, M., and Bates, G.P. (1997). Instability of highly expanded CAG repeats in mice transgenic for the Huntington's disease mutation. *Nature Genetics* *15*, 197–200.

- Månsson, C., Kakkar, V., Monsellier, E., Sourigues, Y., Härmark, J., Kampinga, H.H., Melki, R., and Emanuelsson, C. (2014). DNAJB6 is a peptide-binding chaperone which can suppress amyloid fibrillation of polyglutamine peptides at substoichiometric molar ratios. *Cell Stress Chaperones* 19, 227–239.
- Marcellin, D., Abramowski, D., Young, D., Richter, J., Weiss, A., Marcel, A., Maassen, J., Kauffmann, M., Bibel, M., Shimshek, D.R., et al. (2012). Fragments of HdhQ150 mutant huntingtin form a soluble oligomer pool that declines with aggregate deposition upon aging. *PLoS ONE* 7, e44457.
- Marques Sousa, C., and Humbert, S. (2013). Huntingtin: here, there, everywhere! *J Huntingtons Dis* 2, 395–403.
- Martin, D.D., Ladha, S., Ehrnhoefer, D.E., and Hayden, M.R. (2015). Autophagy in Huntington disease and huntingtin in autophagy. *Trends in Neurosciences* 38, 26–35.
- Martín-Aparicio, E., Yamamoto, A., Hernández, F., Hen, R., Avila, J., and Lucas, J.J. (2001). Proteasomal-dependent aggregate reversal and absence of cell death in a conditional mouse model of Huntington's disease. *J. Neurosci.* 21, 8772–8781.
- Martinez-Vicente, M., Tallozy, Z., Wong, E., Tang, G., Koga, H., Kaushik, S., de Vries, R., Arias, E., Harris, S., Sulzer, D., et al. (2010). Cargo recognition failure is responsible for inefficient autophagy in Huntington's disease. *Nature Neuroscience* 13, 567–576.
- Massey, A.C., Kaushik, S., Sovak, G., Kiffin, R., and Cuervo, A.M. (2006). Consequences of the selective blockage of chaperone-mediated autophagy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 5805–5810.
- Massey, A.C., Follenzi, A., Kiffin, R., Zhang, C., and Cuervo, A.M. (2008). Early cellular changes after blockage of chaperone-mediated autophagy. *Autophagy* 4, 442–456.
- Mattson, M.P., and Camandola, S. (2001). NF-kappaB in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *The Journal of Clinical Investigation* 107, 247–254.
- Mattson, M.P., and Meffert, M.K. (2006). Roles for NF-kappaB in nerve cell survival, plasticity, and disease. *Cell Death Differ.* 13, 852–860.
- Matyash, V., and Kettenmann, H. (2010). Heterogeneity in astrocyte morphology and physiology. *Brain Research Reviews* 63, 2–10.
- Mauch, D.H., Nagler, K., Schumacher, S., Goritz, C., Muller, E.C., Otto, A., and Pfrieder, F.W. (2001). CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol. *Science* 294, 1354–1357.
- Mayer, M.P., and Bukau, B. (2005). Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell. Mol. Life Sci.* 62, 670–684.
- Mazarei, G., Neal, S.J., Becanovic, K., Luthi-Carter, R., Simpson, E.M., and Leavitt, B.R. (2010). Expression analysis of novel striatal-enriched genes in Huntington disease. *Hum. Mol. Genet.* 19, 609–622.
- McColgan, P., and Tabrizi, S.J. (2018). Huntington's disease: a clinical review. *Eur. J. Neurol.* 25, 24–34.

McGarry, A., McDermott, M., Kieburz, K., de Blicke, E.A., Beal, F., Marder, K., Ross, C., Shoulson, I., Gilbert, P., Mallonee, W.M., et al. (2017). A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of coenzyme Q10 in Huntington disease. *Neurology* 88, 152–159.

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.

McKinstry, S.U., Karadeniz, Y.B., Worthington, A.K., Hayrapetyan, V.Y., Ozlu, M.I., Serafin-Molina, K., Risher, W.C., Ustunkaya, T., Dragatsis, I., Zeitlin, S., et al. (2014). Huntingtin is required for normal excitatory synapse development in cortical and striatal circuits. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 34, 9455–9472.

Menalled, L.B. (2005). Knock-in mouse models of Huntington’s disease. *NeuroRx* 2, 465–470.

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. *The Journal of Comparative Neurology* 465, 11–26.

Menalled, L.B., Kudwa, A.E., Miller, S., Fitzpatrick, J., Watson-Johnson, J., Keating, N., Ruiz, M., Mushlin, R., Alosio, W., McConnell, K., et al. (2012). Comprehensive behavioral and molecular characterization of a new knock-in mouse model of Huntington’s disease: zQ175. *PLoS One* 7, e49838.

Mende-Mueller, L.M., Toneff, T., Hwang, S.R., Chesselet, M.F., and Hook, V.Y. (2001). Tissue-specific proteolysis of Huntingtin (htt) in human brain: evidence of enhanced levels of N- and C-terminal htt fragments in Huntington’s disease striatum. *J. Neurosci.* 21, 1830–1837.

Menet, V., Gimenez y Ribotta, M., Chauvet, N., Drian, M.J., Lannoy, J., Colucci-Guyon, E., and Privat, A. (2001). Inactivation of the glial fibrillary acidic protein gene, but not that of vimentin, improves neuronal survival and neurite growth by modifying adhesion molecule expression. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 21, 6147–6158.

Mestre, T.A. (2018). Recent advances in the therapeutic development for Huntington disease. *Parkinsonism Relat. Disord.*

Meunier, C., Merienne, N., Jollé, C., Déglon, N., and Pellerin, L. (2016). Astrocytes are key but indirect contributors to the development of the symptomatology and pathophysiology of Huntington’s disease. *Glia* 64, 1841–1856.

Michels, A.A., Kanon, B., Bensaude, O., and Kampinga, H.H. (1999). Heat shock protein (Hsp) 40 mutants inhibit Hsp70 in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 274, 36757–36763.

Middeldorp, J., and Hol, E.M. (2011). GFAP in health and disease. *Prog. Neurobiol.* 93, 421–443.

Mielcarek, M., Landles, C., Weiss, A., Bradaia, A., Seredenina, T., Inuabasi, L., Osborne, G.F., Wadel, K., Touller, C., Butler, R., et al. (2013). HDAC4 reduction: a novel therapeutic strategy to target cytoplasmic huntingtin and ameliorate neurodegeneration. *PLoS Biol.* 11, e1001717.

Mijaljica, D., Prescott, M., and Devenish, R.J. (2011). Microautophagy in mammalian cells: revisiting a 40-year-old conundrum. *Autophagy* 7, 673–682.

- Miller, J.P., Holcomb, J., Al-Ramahi, I., de Haro, M., Gafni, J., Zhang, N., Kim, E., Sanhueza, M., Torcassi, C., Kwak, S., et al. (2010). Matrix metalloproteinases are modifiers of huntingtin proteolysis and toxicity in Huntington's disease. *Neuron* 67, 199–212.
- Milnerwood, A.J., and Raymond, L.A. (2010). Early synaptic pathophysiology in neurodegeneration: insights from Huntington's disease. *Trends Neurosci.* 33, 513–523.
- Mishima, T., and Hirase, H. (2010). In vivo intracellular recording suggests that gray matter astrocytes in mature cerebral cortex and hippocampus are electrophysiologically homogeneous. *J. Neurosci.* 30, 3093–3100.
- Mishra, M.K., Wang, J., Keough, M.B., Fan, Y., Silva, C., Sloka, S., Hayardeny, L., Brück, W., and Yong, V.W. (2014). Laquinimod reduces neuroaxonal injury through inhibiting microglial activation. *Ann Clin Transl Neurol* 1, 409–422.
- Miyamoto, N., Maki, T., Shindo, A., Liang, A.C., Maeda, M., Egawa, N., Itoh, K., Lo, E.K., Lok, J., Ihara, M., et al. (2015). Astrocytes Promote Oligodendrogenesis after White Matter Damage via Brain-Derived Neurotrophic Factor. *J. Neurosci.* 35, 14002–14008.
- Mo, C., Hannan, A.J., and Renoir, T. (2015). Environmental factors as modulators of neurodegeneration: insights from gene-environment interactions in Huntington's disease. *Neurosci Biobehav Rev* 52, 178–192.
- Mochel, F., and Haller, R.G. (2011). Energy deficit in Huntington disease: why it matters. *J. Clin. Invest.* 121, 493–499.
- 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.
- Monteys, A.M., Ebanks, S.A., Keiser, M.S., and Davidson, B.L. (2017). CRISPR/Cas9 Editing of the Mutant Huntingtin Allele In Vitro and In Vivo. *Mol. Ther.* 25, 12–23.
- Morfini, G.A., You, Y.-M., Pollema, S.L., Kaminska, A., Liu, K., Yoshioka, K., Björkblom, B., Coffey, E.T., Bagnato, C., Han, D., et al. (2009). Pathogenic huntingtin inhibits fast axonal transport by activating JNK3 and phosphorylating kinesin. *Nat. Neurosci.* 12, 864–871.
- Morigaki, R., and Goto, S. (2017). Striatal Vulnerability in Huntington's Disease: Neuroprotection Versus Neurotoxicity. *Brain Sci* 7.
- Morimoto, R.I. (2011). The heat shock response: systems biology of proteotoxic stress in aging and disease. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 76, 91–99.
- Muchowski, P.J., and Wacker, J.L. (2005). Modulation of neurodegeneration by molecular chaperones. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 11–22.
- Muchowski, P.J., Schaffar, G., Sittler, A., Wanker, E.E., Hayer-Hartl, M.K., and Hartl, F.U. (2000). Hsp70 and hsp40 chaperones can inhibit self-assembly of polyglutamine proteins into amyloid-like fibrils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 7841–7846.
- Mulder, M.P.C., Witting, K., Berlin, I., Pruneda, J.N., Wu, K.-P., Chang, J.-G., Merx, R., Bialas, J., Groettrup, M., Vertegaal, A.C.O., et al. (2016). A cascading activity-based probe sequentially targets E1-E2-E3 ubiquitin enzymes. *Nat. Chem. Biol.* 12, 523–530.

- Myers, R.H. (2004). Huntington's disease genetics. *NeuroRx* 1, 255–262.
- Nafar, F., Williams, J.B., and Mearow, K.M. (2016). Astrocytes release HspB1 in response to amyloid- β exposure in vitro. *J. Alzheimers Dis.* 49, 251–263.
- Nagai, Y., Fujikake, N., Ohno, K., Higashiyama, H., Popiel, H.A., Rahadian, J., Yamaguchi, M., Strittmatter, W.J., Burke, J.R., and Toda, T. (2003). Prevention of polyglutamine oligomerization and neurodegeneration by the peptide inhibitor QBP1 in *Drosophila*. *Hum. Mol. Genet.* 12, 1253–1259.
- Nance, M.A. (2017). Genetic counseling and testing for Huntington's disease: A historical review. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 174, 75–92.
- 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.
- Nedergaard, M., Takano, T., and Hansen, A.J. (2002). Beyond the role of glutamate as a neurotransmitter. *Nature Reviews. Neuroscience* 3, 748–755.
- Nedergaard, M., Ransom, B., and Goldman, S.A. (2003). New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci.* 26, 523–530.
- Nguyen, G.D., Gokhan, S., Molero, A.E., and Mehler, M.F. (2013). Selective roles of normal and mutant huntingtin in neural induction and early neurogenesis. *PLoS ONE* 8, e64368.
- Nicolini, F., Haider, S., Reis Marques, T., Muhlert, N., Tziortzi, A.C., Searle, G.E., Natesan, S., Piccini, P., Kapur, S., Rabiner, E.A., et al. (2015). Altered PDE10A expression detectable early before symptomatic onset in Huntington's disease. *Brain* 138, 3016–3029.
- Niemelä, V., Burman, J., Blennow, K., Zetterberg, H., Larsson, A., and Sundblom, J. (2018). Cerebrospinal fluid sCD27 levels indicate active T cell-mediated inflammation in premanifest Huntington's disease. *PLoS ONE* 13, e0193492.
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., and Helmchen, F. (2005). Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 308, 1314–1318.
- Nopoulos, P.C. (2016). Huntington disease: a single-gene degenerative disorder of the striatum. *Dialogues Clin Neurosci* 18, 91–98.
- Nucifora, F.C., Sasaki, M., Peters, M.F., Huang, H., Cooper, J.K., Yamada, M., Takahashi, H., Tsuji, S., Troncoso, J., Dawson, V.L., et al. (2001). Interference by huntingtin and atrophin-1 with cbp-mediated transcription leading to cellular toxicity. *Science* 291, 2423–2428.
- Nwaobi, S.E., Cuddapah, V.A., Patterson, K.C., Randolph, A.C., and Olsen, M.L. (2016). The role of glial-specific Kir4.1 in normal and pathological states of the CNS. *Acta Neuropathol.* 132, 1–21.
- Oberheim, N.A., Tian, G.F., Han, X., Peng, W., Takano, T., Ransom, B., and Nedergaard, M. (2008). Loss of astrocytic domain organization in the epileptic brain. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 28, 3264–3276.

- Oberheim, N.A., Takano, T., Han, X., He, W., Lin, J.H.C., Wang, F., Xu, Q., Wyatt, J.D., Pilcher, W., Ojemann, J.G., et al. (2009). Uniquely hominid features of adult human astrocytes. *J. Neurosci.* *29*, 3276–3287.
- Oberheim, N.A., Goldman, S.A., and Nedergaard, M. (2012). Heterogeneity of astrocytic form and function. *Methods in Molecular Biology* *814*, 23–45.
- 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.
- Okamoto, S., Pouladi, M.A., Talantova, M., Yao, D., Xia, P., Ehrnhoefer, D.E., Zaidi, R., Clemente, A., Kaul, M., Graham, R.K., et al. (2009). Balance between synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor activity influences inclusions and neurotoxicity of mutant huntingtin. *Nature Medicine* *15*, 1407–1413.
- O’Kusky, J.R., Nasir, J., Cicchetti, F., Parent, A., and Hayden, M.R. (1999). Neuronal degeneration in the basal ganglia and loss of pallido-subthalamic synapses in mice with targeted disruption of the Huntington’s disease gene. *Brain Res.* *818*, 468–479.
- Oliveira, A.O., Osmand, A., Outeiro, T.F., Muchowski, P.J., and Finkbeiner, S. (2016). α B-Crystallin overexpression in astrocytes modulates the phenotype of the BACHD mouse model of Huntington’s disease. *Hum. Mol. Genet.* *25*, 1677–1689.
- O’Rourke, J.G., Gareau, J.R., Ochaba, J., Song, W., Raskó, T., Reverter, D., Lee, J., Monteys, A.M., Pallos, J., Mee, L., et al. (2013). SUMO-2 and PIAS1 modulate insoluble mutant huntingtin protein accumulation. *Cell Rep* *4*, 362–375.
- Orr, A.L., Li, S., Wang, C.-E., Li, H., Wang, J., Rong, J., Xu, X., Mastroberardino, P.G., Greenamyre, J.T., and Li, X.-J. (2008a). N-terminal mutant huntingtin associates with mitochondria and impairs mitochondrial trafficking. *J. Neurosci.* *28*, 2783–2792.
- Orr, A.L., Li, S., Wang, C.-E., Li, H., Wang, J., Rong, J., Xu, X., Mastroberardino, P.G., Greenamyre, J.T., and Li, X.-J. (2008b). N-Terminal Mutant Huntingtin Associates with Mitochondria and Impairs Mitochondrial Trafficking. *J. Neurosci.* *28*, 2783–2792.
- Orre, M., Kamphuis, W., Dooves, S., Kooijman, L., Chan, E.T., Kirk, C.J., Dimayuga Smith, V., Koot, S., Mamber, C., Jansen, A.H., et al. (2013). Reactive glia show increased immunoproteasome activity in Alzheimer’s disease. *Brain : A Journal of Neurology* *136*, 1415–1431.
- Orre, M., Kamphuis, W., Osborn, L.M., Jansen, A.H., Kooijman, L., Bossers, K., and Hol, E.M. (2014). Isolation of glia from Alzheimer’s mice reveals inflammation and dysfunction. *Neurobiology of Aging*.
- Ortega, Z., and Lucas, J.J. (2014). Ubiquitin-proteasome system involvement in Huntington’s disease. *Frontiers in Molecular Neuroscience* *7*, 77.
- Ortega, Z., Diaz-Hernandez, M., and Lucas, J.J. (2007). Is the ubiquitin-proteasome system impaired in Huntington’s disease? *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS* *64*, 2245–2257.
- Palfi, S., Brouillet, E., Jarraya, B., Bloch, J., Jan, C., Shin, M., Conde, F., Li, X.J., Aebischer, P., Hantraye, P., et al. (2007). Expression of mutated huntingtin fragment in the putamen is sufficient to produce abnormal movement in non-human primates. *Molecular Therapy : The Journal of the American Society of Gene Therapy* *15*, 1444–1451.

- Panatier, A., Theodosis, D.T., Mothet, J.P., Touquet, B., Pollegioni, L., Poulain, D.A., and Olié, S.H. (2006). Glia-derived D-serine controls NMDA receptor activity and synaptic memory. *Cell* 125, 775–784.
- Pankiv, S., Clausen, T.H., Lamark, T., Brech, A., Bruun, J.-A., Outzen, H., Øvervatn, A., Bjørkøy, G., and Johansen, T. (2007). p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J. Biol. Chem.* 282, 24131–24145.
- Panov, A.V., Gutekunst, C.-A., Leavitt, B.R., Hayden, M.R., Burke, J.R., Strittmatter, W.J., and Greenamyre, J.T. (2002). Early mitochondrial calcium defects in Huntington’s disease are a direct effect of polyglutamines. *Nat. Neurosci.* 5, 731–736.
- Papoutsis, M., Labuschagne, I., Tabrizi, S.J., and Stout, J.C. (2014). The cognitive burden in Huntington’s disease: pathology, phenotype, and mechanisms of compensation. *Mov. Disord.* 29, 673–683.
- Park, C., and Cuervo, A.M. (2013). Selective autophagy: talking with the UPS. *Cell Biochem. Biophys.* 67, 3–13.
- Parsons, M.P., Vanni, M.P., Woodard, C.L., Kang, R., Murphy, T.H., and Raymond, L.A. (2016). Real-time imaging of glutamate clearance reveals normal striatal uptake in Huntington disease mouse models. *Nat Commun* 7, 11251.
- Patassini, S., Begley, P., Xu, J., Church, S.J., Reid, S.J., Kim, E.H., Curtis, M.A., Dragunow, M., Waldvogel, H.J., Snell, R.G., et al. (2016). Metabolite mapping reveals severe widespread perturbation of multiple metabolic processes in Huntington’s disease human brain. *Biochim. Biophys. Acta* 1862, 1650–1662.
- 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.
- Pavese, N., Gerhard, A., Tai, Y.F., Ho, A.K., Turkheimer, F., Barker, R.A., Brooks, D.J., and Piccini, P. (2006). Microglial activation correlates with severity in Huntington disease: a clinical and PET study. *Neurology* 66, 1638–1643.
- Pearce, M.M., Spartz, E.J., Hong, W., Luo, L., and Kopito, R.R. (2015). Prion-like transmission of neuronal huntingtin aggregates to phagocytic glia in the *Drosophila* brain. *Nature Communications* 6, 6768.
- Pecho-Vrieseling, E., Rieker, C., Fuchs, S., Bleckmann, D., Esposito, M.S., Botta, P., Goldstein, C., Bernhard, M., Galimberti, I., Müller, M., et al. (2014). Transneuronal propagation of mutant huntingtin contributes to non-cell autonomous pathology in neurons. *Nature Neuroscience* 17, 1064–1072.
- Pellerin, L., Bouzier-Sore, A.-K., Aubert, A., Serres, S., Merle, M., Costalat, R., and Magistretti, P.J. (2007). Activity-dependent regulation of energy metabolism by astrocytes: an update. *Glia* 55, 1251–1262.
- Pépin, J., Francelle, L., Carrillo-de Sauvage, M.-A., de Longprez, L., Gipchtein, P., Cambon, K., Valette, J., Brouillet, E., and Flament, J. (2016). In vivo imaging of brain glutamate defects in a knock-in mouse model of Huntington’s disease. *Neuroimage* 139, 53–64.

Perluigi, M., Poon, H.F., Maragos, W., Pierce, W.M., Klein, J.B., Calabrese, V., Cini, C., De Marco, C., and Butterfield, D.A. (2005). Proteomic analysis of protein expression and oxidative modification in r6/2 transgenic mice: a model of Huntington disease. *Mol. Cell Proteomics* 4, 1849–1861.

Perrin, V., Régulier, E., Abbas-Terki, T., Hassig, R., Brouillet, E., Aebischer, P., Luthi-Carter, R., and Déglon, N. (2007). Neuroprotection by Hsp104 and Hsp27 in lentiviral-based rat models of Huntington's disease. *Mol. Ther.* 15, 903–911.

Petersén, A., and Björkqvist, M. (2006). Hypothalamic-endocrine aspects in Huntington's disease. *Eur. J. Neurosci.* 24, 961–967.

Peters-Libeu, C., Newhouse, Y., Krishnan, P., Cheung, K., Brooks, E., Weisgraber, K., and Finkbeiner, S. (2005). Crystallization and diffraction properties of the Fab fragment of 3B5H10, an antibody specific for disease-causing polyglutamine stretches. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 61, 1065–1068.

Petrelli, F., and Bezzi, P. (2016). Novel insights into gliotransmitters. *Curr Opin Pharmacol* 26, 138–145.

Pfriege, F.W. (2010). Role of glial cells in the formation and maintenance of synapses. *Brain Research Reviews* 63, 39–46.

Pfriege, F.W., and Ungerer, N. (2011). Cholesterol metabolism in neurons and astrocytes. *Prog. Lipid Res.* 50, 357–371.

Pickart, C.M. (2001). Mechanisms Underlying Ubiquitination. *Annual Review of Biochemistry* 70, 503–533.

Pierzynowska, K., Gaffke, L., Cyske, Z., Puchalski, M., Rintz, E., Bartkowski, M., Osiały, M., Pierzynowski, M., Mantej, J., Piotrowska, E., et al. (2018). Autophagy stimulation as a promising approach in treatment of neurodegenerative diseases. *Metab Brain Dis.*

Pišlar, A., and Kos, J. (2014). Cysteine cathepsins in neurological disorders. *Mol. Neurobiol.* 49, 1017–1030.

Plaza-Zabala, A., Sierra-Torre, V., and Sierra, A. (2017). Autophagy and Microglia: Novel Partners in Neurodegeneration and Aging. *Int J Mol Sci* 18.

Plog, B.A., and Nedergaard, M. (2018). The Glymphatic System in Central Nervous System Health and Disease: Past, Present, and Future. *Annu Rev Pathol* 13, 379–394.

Poirier, M.A., Li, H., Macosko, J., Cai, S., Amzel, M., and Ross, C.A. (2002). Huntingtin spheroids and protofibrils as precursors in polyglutamine fibrilization. *J. Biol. Chem.* 277, 41032–41037.

Politis, M., Lahiri, N., Niccolini, F., Su, P., Wu, K., Giannetti, P., Scahill, R.I., Turkheimer, F.E., Tabrizi, S.J., and Piccini, P. (2015). Increased central microglial activation associated with peripheral cytokine levels in premanifest Huntington's disease gene carriers. *Neurobiol. Dis.* 83, 115–121.

Ponpuak, M., Mandell, M.A., Kimura, T., Chauhan, S., Cleyrat, C., and Deretic, V. (2015). Secretory autophagy. *Curr Opin. Cell Biol.* 35, 106–116.

- Popiel, H.A., Takeuchi, T., Fujita, H., Yamamoto, K., Ito, C., Yamane, H., Muramatsu, S., Toda, T., Wada, K., and Nagai, Y. (2012). Hsp40 gene therapy exerts therapeutic effects on polyglutamine disease mice via a non-cell autonomous mechanism. *PLoS ONE* 7, e51069.
- Pouladi, M.A., Morton, A.J., and Hayden, M.R. (2013). Choosing an animal model for the study of Huntington's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 708–721.
- Powers, W.J., Videen, T.O., Markham, J., McGee-Minnich, L., Antenor-Dorsey, J.V., Hershey, T., and Perlmutter, J.S. (2007). Selective defect of in vivo glycolysis in early Huntington's disease striatum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 2945–2949.
- Puente, X.S., Sánchez, L.M., Overall, C.M., and López-Otín, C. (2003). Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. *Nat. Rev. Genet.* 4, 544–558.
- Qi, L., Zhang, X.-D., Wu, J.-C., Lin, F., Wang, J., DiFiglia, M., and Qin, Z.-H. (2012). The role of chaperone-mediated autophagy in huntingtin degradation. *PLoS ONE* 7, e46834.
- Qin, Z.-H., and Gu, Z.-L. (2004). Huntingtin processing in pathogenesis of Huntington disease. *Acta Pharmacol. Sin.* 25, 1243–1249.
- Quarrell, O.W.J., Nance, M.A., Nopoulos, P., Paulsen, J.S., Smith, J.A., and Squitieri, F. (2013). Managing juvenile Huntington's disease. *Neurodegener Dis Manag* 3.
- Radhakrishnan, S.K., Lee, C.S., Young, P., Beskow, A., Chan, J.Y., and Deshaies, R.J. (2010). Transcription factor Nrf1 mediates the proteasome recovery pathway after proteasome inhibition in mammalian cells. *Mol Cell* 38, 17–28.
- Ramdzan, Y.M., Nisbet, R.M., Miller, J., Finkbeiner, S., Hill, A.F., and Hatters, D.M. (2010). Conformation sensors that distinguish monomeric proteins from oligomers in live cells. *Chem. Biol.* 17, 371–379.
- Ramdzan, Y.M., Trubetskov, M.M., Ormsby, A.R., Newcombe, E.A., Sui, X., Tobin, M.J., Bongiovanni, M.N., Gras, S.L., Dewson, G., Miller, J.M.L., et al. (2017). Huntingtin Inclusions Trigger Cellular Quiescence, Deactivate Apoptosis, and Lead to Delayed Necrosis. *Cell Rep* 19, 919–927.
- Ratovitski, T., Gucek, M., Jiang, H., Chighladze, E., Waldron, E., D'Ambola, J., Hou, Z., Liang, Y., Poirier, M.A., Hirschhorn, R.R., et al. (2009). Mutant huntingtin N-terminal fragments of specific size mediate aggregation and toxicity in neuronal cells. *J. Biol. Chem.* 284, 10855–10867.
- Ravikumar, B., Duden, R., and Rubinsztein, D.C. (2002). Aggregate-prone proteins with polyglutamine and polyalanine expansions are degraded by autophagy. *Hum. Mol. Genet.* 11, 1107–1117.
- Ravikumar, B., Vacher, C., Berger, Z., Davies, J.E., Luo, S., Oroz, L.G., Scaravilli, F., Easton, D.F., Duden, R., O'Kane, C.J., et al. (2004). Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nat. Genet.* 36, 585–595.
- Ravikumar, B., Acevedo-Arozena, A., Imarisio, S., Berger, Z., Vacher, C., O'Kane, C.J., Brown, S.D.M., and Rubinsztein, D.C. (2005). Dynein mutations impair autophagic clearance of aggregate-prone proteins. *Nat. Genet.* 37, 771–776.
- Ravikumar, B., Sarkar, S., Davies, J.E., Futter, M., Garcia-Arencibia, M., Green-Thompson, Z.W., Jimenez-Sanchez, M., Korolchuk, V.I., Lichtenberg, M., Luo, S., et al. (2010). Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiol. Rev.* 90, 1383–1435.

- Rebec, G.V. (2013). Dysregulation of corticostriatal ascorbate release and glutamate uptake in transgenic models of Huntington's disease. *Antioxid. Redox Signal.* *19*, 2115–2128.
- Rebec, G.V. (2018). Corticostriatal network dysfunction in Huntington's disease: Deficits in neural processing, glutamate transport, and ascorbate release. *CNS Neurosci Ther* *24*, 281–291.
- Rebec, G.V., Barton, S.J., and Ennis, M.D. (2002). Dysregulation of ascorbate release in the striatum of behaving mice expressing the Huntington's disease gene. *J. Neurosci.* *22*, RC202.
- Reddy, P.H., and Shirendeb, U.P. (2012). Mutant huntingtin, abnormal mitochondrial dynamics, defective axonal transport of mitochondria, and selective synaptic degeneration in Huntington's disease. *Biochim. Biophys. Acta* *1822*, 101–110.
- Reichenbach, N., Delekate, A., Plescher, M., Schmitt, F., Krauss, S., Blank, N., Halle, A., and Petzold, G.C. (2019). Inhibition of Stat3-mediated astrogliosis ameliorates pathology in an Alzheimer's disease model. *EMBO Mol Med.*
- Reis, S.D., Pinho, B.R., and Oliveira, J.M.A. (2017). Modulation of Molecular Chaperones in Huntington's Disease and Other Polyglutamine Disorders. *Mol. Neurobiol.* *54*, 5829–5854.
- Ren, P.-H., Lauckner, J.E., Kachirskaia, I., Heuser, J.E., Melki, R., and Kopito, R.R. (2009). Cytoplasmic penetration and persistent infection of mammalian cells by polyglutamine aggregates. *Nat. Cell Biol.* *11*, 219–225.
- Repnik, U., Stoka, V., Turk, V., and Turk, B. (2012). Lysosomes and lysosomal cathepsins in cell death. *Biochim. Biophys. Acta* *1824*, 22–33.
- Rigamonti, D., Bolognini, D., Mutti, C., Zuccato, C., Tartari, M., Sola, F., Valenza, M., Kazantsev, A.G., and Cattaneo, E. (2007). Loss of huntingtin function complemented by small molecules acting as repressor element 1/neuron restrictive silencer element silencer modulators. *J. Biol. Chem.* *282*, 24554–24562.
- Rising, A.C., Xu, J., Carlson, A., Napoli, V.V., Denovan-Wright, E.M., and Mandel, R.J. (2011). Longitudinal behavioral, cross-sectional transcriptional and histopathological characterization of a knock-in mouse model of Huntington's disease with 140 CAG repeats. *Experimental Neurology* *228*, 173–182.
- Robertson, J.M. (2018). The Gliocentric Brain. *Int J Mol Sci* *19*.
- Rodrigues, F.B., Byrne, L.M., McColgan, P., Robertson, N., Tabrizi, S.J., Zetterberg, H., and Wild, E.J. (2016a). Cerebrospinal Fluid Inflammatory Biomarkers Reflect Clinical Severity in Huntington's Disease. *PLOS ONE* *11*, e0163479.
- Rodrigues, F.B., Byrne, L., McColgan, P., Robertson, N., Tabrizi, S.J., Leavitt, B.R., Zetterberg, H., and Wild, E.J. (2016b). Cerebrospinal fluid total tau concentration predicts clinical phenotype in Huntington's disease. *J. Neurochem.* *139*, 22–25.
- Roos, R.A. (2010). Huntington's disease: a clinical review. *Orphanet Journal of Rare Diseases* *5*, 40.
- Rosas, H.D., Tuch, D.S., Hevelone, N.D., Zaleta, A.K., Vangel, M., Hersch, S.M., and Salat, D.H. (2006). Diffusion tensor imaging in presymptomatic and early Huntington's disease: Selective white matter pathology and its relationship to clinical measures. *Mov. Disord.* *21*, 1317–1325.

- Rosas, H.D., Salat, D.H., Lee, S.Y., Zaleta, A.K., Pappu, V., Fischl, B., Greve, D., Hevelone, N., and Hersch, S.M. (2008). Cerebral cortex and the clinical expression of Huntington's disease: complexity and heterogeneity. *Brain* *131*, 1057–1068.
- Rosenblatt, A., Liang, K.-Y., Zhou, H., Abbott, M.H., Gourley, L.M., Margolis, R.L., Brandt, J., and Ross, C.A. (2006). The association of CAG repeat length with clinical progression in Huntington disease. *Neurology* *66*, 1016–1020.
- Ross, C.A., and Poirier, M.A. (2005a). Opinion: What is the role of protein aggregation in neurodegeneration? *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* *6*, 891–898.
- Ross, C.A., and Poirier, M.A. (2005b). Opinion: What is the role of protein aggregation in neurodegeneration? *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* *6*, 891–898.
- Ross, C.A., and Tabrizi, S.J. (2011). Huntington's disease: from molecular pathogenesis to clinical treatment. *The Lancet. Neurology* *10*, 83–98.
- Ross, C.A., Aylward, E.H., Wild, E.J., Langbehn, D.R., Long, J.D., Warner, J.H., Scahill, R.I., Leavitt, B.R., Stout, J.C., Paulsen, J.S., et al. (2014). Huntington disease: natural history, biomarkers and prospects for therapeutics. *Nature Reviews. Neurology* *10*, 204–216.
- Rouach, N., Avignone, E., Mème, W., Koulakoff, A., Venance, L., Blomstrand, F., and Giaume, C. (2002). Gap junctions and connexin expression in the normal and pathological central nervous system. *Biol. Cell* *94*, 457–475.
- Rüb, U., Hoche, F., Brunt, E.R., Heinsen, H., Seidel, K., Del Turco, D., Paulson, H.L., Bohl, J., von Gall, C., Vonsattel, J.-P., et al. (2013). Degeneration of the cerebellum in Huntington's disease (HD): possible relevance for the clinical picture and potential gateway to pathological mechanisms of the disease process. *Brain Pathol.* *23*, 165–177.
- Rubinsztein, D.C. (2007). Autophagy induction rescues toxicity mediated by proteasome inhibition. *Neuron* *54*, 854–856.
- Rüdiger, S., Buchberger, A., and Bukau, B. (1997). Interaction of Hsp70 chaperones with substrates. *Nat. Struct. Biol.* *4*, 342–349.
- Rui, Y.-N., Xu, Z., Patel, B., Cuervo, A.M., and Zhang, S. (2015). HTT/Huntingtin in selective autophagy and Huntington disease: A foe or a friend within? *Autophagy* *11*, 858–860.
- Ruiz, M., and Déglon, N. (2012). Viral-mediated overexpression of mutant huntingtin to model HD in various species. *Neurobiol. Dis.* *48*, 202–211.
- Rujano, M.A., Kampinga, H.H., and Salomons, F.A. (2007). Modulation of polyglutamine inclusion formation by the Hsp70 chaperone machine. *Exp. Cell Res.* *313*, 3568–3578.
- 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.
- Sahoo, B., Drombosky, K.W., and Wetzel, R. (2016). Fluorescence Correlation Spectroscopy: A Tool to Study Protein Oligomerization and Aggregation In Vitro and In Vivo. *Methods Mol. Biol.* *1345*, 67–87.

- Saibil, H. (2013). Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *14*, 630–642.
- Salvador, N., Aguado, C., Horst, M., and Knecht, E. (2000). Import of a cytosolic protein into lysosomes by chaperone-mediated autophagy depends on its folding state. *J. Biol. Chem.* *275*, 27447–27456.
- San Gil, R., Ooi, L., Yerbury, J.J., and Ecroyd, H. (2017). The heat shock response in neurons and astroglia and its role in neurodegenerative diseases. *Mol Neurodegener* *12*, 65.
- Sánchez, I., Mahlke, C., and Yuan, J. (2003). Pivotal role of oligomerization in expanded polyglutamine neurodegenerative disorders. *Nature* *421*, 373–379.
- Sapp, E., Schwarz, C., Chase, K., Bhide, P.G., Young, A.B., Penney, J., Vonsattel, J.P., Aronin, N., and DiFiglia, M. (1997). Huntingtin localization in brains of normal and Huntington's disease patients. *Ann. Neurol.* *42*, 604–612.
- Sathasivam, K., Lane, A., Legleiter, J., Warley, A., Woodman, B., Finkbeiner, S., Paganetti, P., Muchowski, P.J., Wilson, S., and Bates, G.P. (2010). Identical oligomeric and fibrillar structures captured from the brains of R6/2 and knock-in mouse models of Huntington's disease. *Hum. Mol. Genet.* *19*, 65–78.
- Saudou, F., and Humbert, S. (2016). The Biology of Huntingtin. *Neuron* *89*, 910–926.
- Saudou, F., Finkbeiner, S., Devys, D., and Greenberg, M.E. (1998). Huntingtin acts in the nucleus to induce apoptosis but death does not correlate with the formation of intranuclear inclusions. *Cell* *95*, 55–66.
- Scaglione, K.M., Basrur, V., Ashraf, N.S., Konen, J.R., Elenitoba-Johnson, K.S.J., Todi, S.V., and Paulson, H.L. (2013). The ubiquitin-conjugating enzyme (E2) Ube2w ubiquitinates the N terminus of substrates. *J. Biol. Chem.* *288*, 18784–18788.
- Schaefer, M.H., Fontaine, J.-F., Vinayagam, A., Porras, P., Wanker, E.E., and Andrade-Navarro, M.A. (2012). HIPPIE: Integrating protein interaction networks with experiment based quality scores. *PLoS ONE* *7*, e31826.
- Schaffar, G., Breuer, P., Boteva, R., Behrends, C., Tzvetkov, N., Strippel, N., Sakahira, H., Siegers, K., Hayer-Hartl, M., and Hartl, F.U. (2004). Cellular toxicity of polyglutamine expansion proteins: mechanism of transcription factor deactivation. *Mol. Cell* *15*, 95–105.
- Scherzinger, E., Lurz, R., Turmaine, M., Mangiarini, L., Hollenbach, B., Hasenbank, R., Bates, G.P., Davies, S.W., Lehrach, H., and Wanker, E.E. (1997). Huntingtin-encoded polyglutamine expansions form amyloid-like protein aggregates in vitro and in vivo. *Cell* *90*, 549–558.
- 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. *Human Molecular Genetics* *8*, 397–407.
- Schilling, G., Klevytska, A., Tebbenkamp, A.T.N., Juenemann, K., Cooper, J., Gonzales, V., Slunt, H., Poirer, M., Ross, C.A., and Borchelt, D.R. (2007). Characterization of huntingtin pathologic fragments in human Huntington disease, transgenic mice, and cell models. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *66*, 313–320.

- Schipper-Krom, S., Juenemann, K., Jansen, A.H., Wiemhoefer, A., van den Nieuwendijk, R., Smith, D.L., Hink, M.A., Bates, G.P., Overkleeft, H., Ovaa, H., et al. (2014). Dynamic recruitment of active proteasomes into polyglutamine initiated inclusion bodies. *FEBS Letters* 588, 151–159.
- Schmidt, M., and Finley, D. (2014). Regulation of proteasome activity in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1843, 13–25.
- Schousboe, A. (2003). Role of astrocytes in the maintenance and modulation of glutamatergic and GABAergic neurotransmission. *Neurochemical Research* 28, 347–352.
- Schrader, E.K., Harstad, K.G., and Matouschek, A. (2009). Targeting proteins for degradation. *Nat. Chem. Biol.* 5, 815–822.
- Schwarcz, R., Foster, A.C., French, E.D., Whetsell, W.O., and Köhler, C. (1984). Excitotoxic models for neurodegenerative disorders. *Life Sci.* 35, 19–32.
- Schwarz, L., Goldbaum, O., Bergmann, M., Probst-Cousin, S., and Richter-Landsberg, C. (2012). Involvement of macroautophagy in multiple system atrophy and protein aggregate formation in oligodendrocytes. *J. Mol. Neurosci.* 47, 256–266.
- Scott, L.J. (2011). Tetrabenazine: for chorea associated with Huntington’s disease. *CNS Drugs* 25, 1073–1085.
- Seglen, P.O., and Gordon, P.B. (1982). 3-Methyladenine: specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79, 1889–1892.
- Selkoe, D.J., Salazar, F.J., Abraham, C., and Kosik, K.S. (1982). Huntington’s disease: changes in striatal proteins reflect astrocytic gliosis. *Brain Res.* 245, 117–125.
- Senut, M.C., Suhr, S.T., Kaspar, B., and Gage, F.H. (2000). Intraneuronal aggregate formation and cell death after viral expression of expanded polyglutamine tracts in the adult rat brain. *J. Neurosci.* 20, 219–229.
- Seo, H., Sonntag, K.C., and Isacson, O. (2004). Generalized brain and skin proteasome inhibition in Huntington’s disease. *Annals of Neurology* 56, 319–328.
- Seo, H., Sonntag, K.-C., Kim, W., Cattaneo, E., and Isacson, O. (2007). Proteasome Activator Enhances Survival of Huntington’s Disease Neuronal Model Cells. *PLOS ONE* 2, e238.
- Seong, I.S., Woda, J.M., Song, J.-J., Lloret, A., Abeyrathne, P.D., Woo, C.J., Gregory, G., Lee, J.-M., Wheeler, V.C., Walz, T., et al. (2010). Huntingtin facilitates polycomb repressive complex 2. *Hum. Mol. Genet.* 19, 573–583.
- Sepers, M.D., and Raymond, L.A. (2014). Mechanisms of synaptic dysfunction and excitotoxicity in Huntington’s disease. *Drug Discovery Today* 19, 990–996.
- Seredenina, T., and Luthi-Carter, R. (2012). What have we learned from gene expression profiles in Huntington’s disease? *Neurobiol. Dis.* 45, 83–98.
- Serguera, C., and Bemelmans, A.-P. (2014). Gene therapy of the central nervous system: general considerations on viral vectors for gene transfer into the brain. *Rev. Neurol. (Paris)* 170, 727–738.

- Sheikh, S., Safia, null, Haque, E., and Mir, S.S. (2013). Neurodegenerative Diseases: Multifactorial Conformational Diseases and Their Therapeutic Interventions. *J Neurodegener Dis* 2013, 563481.
- Shen, K., Calamini, B., Fauerbach, J.A., Ma, B., Shahmoradian, S.H., Serrano Lachapel, I.L., Chiu, W., Lo, D.C., and Frydman, J. (2016). Control of the structural landscape and neuronal proteotoxicity of mutant Huntingtin by domains flanking the polyQ tract. *Elife* 5.
- Shibata, M., Lu, T., Furuya, T., Degterev, A., Mizushima, N., Yoshimori, T., MacDonald, M., Yankner, B., and Yuan, J. (2006). Regulation of intracellular accumulation of mutant Huntingtin by Beclin 1. *J. Biol. Chem.* 281, 14474–14485.
- Shibuki, K., Gomi, H., Chen, L., Bao, S., Kim, J.J., Wakatsuki, H., Fujisaki, T., Fujimoto, K., Katoh, A., Ikeda, T., et al. (1996). Deficient cerebellar long-term depression, impaired eyeblink conditioning, and normal motor coordination in GFAP mutant mice. *Neuron* 16, 587–599.
- Shin, J.W., Kim, K.-H., Chao, M.J., Atwal, R.S., Gillis, T., MacDonald, M.E., Gusella, J.F., and Lee, J.-M. (2016). Permanent inactivation of Huntington’s disease mutation by personalized allele-specific CRISPR/Cas9. *Hum. Mol. Genet.* 25, 4566–4576.
- Shin, J.Y., Fang, Z.H., Yu, Z.X., Wang, C.E., Li, S.H., and Li, X.J. (2005). Expression of mutant huntingtin in glial cells contributes to neuronal excitotoxicity. *The Journal of Cell Biology* 171, 1001–1012.
- Sierra, A., de Castro, F., Del Río-Hortega, J., Rafael Iglesias-Rozas, J., Garrosa, M., and Kettenmann, H. (2016). The “Big-Bang” for modern glial biology: Translation and comments on Pío del Río-Hortega 1919 series of papers on microglia. *Glia* 64, 1801–1840.
- Silvestroni, A., Faull, R.L., Strand, A.D., and Moller, T. (2009). Distinct neuroinflammatory profile in post-mortem human Huntington’s disease. *Neuroreport* 20, 1098–1103.
- Sinadinos, C., Burbidge-King, T., Soh, D., Thompson, L.M., Marsh, J.L., Wytttenbach, A., and Mudher, A.K. (2009). Live axonal transport disruption by mutant huntingtin fragments in *Drosophila* motor neuron axons. *Neurobiol. Dis.* 34, 389–395.
- Singhrao, S.K., Thomas, P., Wood, J.D., MacMillan, J.C., Neal, J.W., Harper, P.S., and Jones, A.L. (1998). Huntingtin protein colocalizes with lesions of neurodegenerative diseases: An investigation in Huntington’s, Alzheimer’s, and Pick’s diseases. *Exp. Neurol.* 150, 213–222.
- Sittler, A., Lurz, R., Lueder, G., Priller, J., Lehrach, H., Hayer-Hartl, M.K., Hartl, F.U., and Wanker, E.E. (2001). Geldanamycin activates a heat shock response and inhibits huntingtin aggregation in a cell culture model of Huntington’s disease. *Hum. Mol. Genet.* 10, 1307–1315.
- Skibinski, G.A., and Boyd, L. (2012). Ubiquitination is involved in secondary growth, not initial formation of polyglutamine protein aggregates in *C. elegans*. *BMC Cell Biol.* 13, 10.
- Skotte, N.H., Andersen, J.V., Santos, A., Aldana, B.I., Willert, C.W., Nørremølle, A., Waagepetersen, H.S., and Nielsen, M.L. (2018). Integrative Characterization of the R6/2 Mouse Model of Huntington’s Disease Reveals Dysfunctional Astrocyte Metabolism. *Cell Rep* 23, 2211–2224.
- Slezak, M., and Pfrieder, F.W. (2003). New roles for astrocytes: regulation of CNS synaptogenesis. *Trends Neurosci.* 26, 531–535.

- Slow, E.J., van Raamsdonk, J., Rogers, D., Coleman, S.H., Graham, R.K., Deng, Y., Oh, R., Bissada, N., Hossain, S.M., Yang, Y.-Z., et al. (2003). Selective striatal neuronal loss in a YAC128 mouse model of Huntington disease. *Hum. Mol. Genet.* *12*, 1555–1567.
- Smith, C.M., Mayer, J.A., and Duncan, I.D. (2013). Autophagy promotes oligodendrocyte survival and function following dysmyelination in a long-lived myelin mutant. *J. Neurosci.* *33*, 8088–8100.
- Smith, D.M., Chang, S.-C., Park, S., Finley, D., Cheng, Y., and Goldberg, A. (2007). Docking of the Proteasomal ATPases' C-termini in the 20S Proteasomes alpha Ring Opens the Gate for Substrate Entry. *Mol Cell* *27*, 731–744.
- Soares, T.R., Reis, S.D., Pinho, B.R., Duchen, M.R., and Oliveira, J.M.A. (2018). Targeting the proteostasis network in Huntington's disease. *Ageing Res. Rev.* *49*, 92–103.
- Sofroniew, M.V., and Vinters, H.V. (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathologica* *119*, 7–35.
- Somjen, G.G. (1988). Nervenkitz: notes on the history of the concept of neuroglia. *Glia* *1*, 2–9.
- Song, J.W., Misgeld, T., Kang, H., Knecht, S., Lu, J., Cao, Y., Cotman, S.L., Bishop, D.L., and Lichtman, J.W. (2008). Lysosomal activity associated with developmental axon pruning. *J. Neurosci.* *28*, 8993–9001.
- Song, W., Chen, J., Petrilli, A., Liot, G., Klinglmayr, E., Zhou, Y., Poquiz, P., Tjong, J., Pouladi, M.A., Hayden, M.R., et al. (2011). Mutant huntingtin binds the mitochondrial fission GTPase dynamin-related protein-1 and increases its enzymatic activity. *Nat. Med.* *17*, 377–382.
- Sontag, E.M., Lotz, G.P., Yang, G., Sontag, C.J., Cummings, B.J., Glabe, C.G., Muchowski, P.J., and Thompson, L.M. (2012). Detection of Mutant Huntingtin Aggregation Conformers and Modulation of SDS-Soluble Fibrillar Oligomers by Small Molecules. *J Huntingtons Dis* *1*, 119–132.
- Sorolla, M.A., Reverter-Branchat, G., Tamarit, J., Ferrer, I., Ros, J., and Cabisco, E. (2008). Proteomic and oxidative stress analysis in human brain samples of Huntington disease. *Free Radic. Biol. Med.* *45*, 667–678.
- Soulet, D., and Cicchetti, F. (2011). The role of immunity in Huntington's disease. *Mol. Psychiatry* *16*, 889–902.
- Southwell, A.L., Smith, S.E.P., Davis, T.R., Caron, N.S., Villanueva, E.B., Xie, Y., Collins, J.A., Ye, M.L., Sturrock, A., Leavitt, B.R., et al. (2015a). Ultrasensitive measurement of huntingtin protein in cerebrospinal fluid demonstrates increase with Huntington disease stage and decrease following brain huntingtin suppression. *Sci Rep* *5*, 12166.
- Southwell, A.L., Franciosi, S., Villanueva, E.B., Xie, Y., Winter, L.A., Veeraraghavan, J., Jonason, A., Felczak, B., Zhang, W., Kovalik, V., et al. (2015b). Anti-semaphorin 4D immunotherapy ameliorates neuropathology and some cognitive impairment in the YAC128 mouse model of Huntington disease. *Neurobiol. Dis.* *76*, 46–56.
- Spokes, E.G., Garrett, N.J., Rossor, M.N., and Iversen, L.L. (1980). Distribution of GABA in post-mortem brain tissue from control, psychotic and Huntington's chorea subjects. *J. Neurol. Sci.* *48*, 303–313.

Sroka, K., Voigt, A., Deeg, S., Reed, J.C., Schulz, J.B., Bähr, M., and Kermer, P. (2009). BAG1 modulates huntingtin toxicity, aggregation, degradation, and subcellular distribution. *J. Neurochem.* *111*, 801–807.

Stanek, L.M., Sardi, S.P., Mastis, B., Richards, A.R., Treleaven, C.M., Taksir, T., Misra, K., Cheng, S.H., and Shihabuddin, L.S. (2014). Silencing mutant huntingtin by adeno-associated virus-mediated RNA interference ameliorates disease manifestations in the YAC128 mouse model of Huntington's disease. *Hum. Gene Ther.* *25*, 461–474.

Stefani, M., and Rigacci, S. (2013). Protein folding and aggregation into amyloid: the interference by natural phenolic compounds. *Int J Mol Sci* *14*, 12411–12457.

Steffan, J.S., Kazantsev, A., Spasic-Boskovic, O., Greenwald, M., Zhu, Y.Z., Gohler, H., Wanker, E.E., Bates, G.P., Housman, D.E., and Thompson, L.M. (2000). The Huntington's disease protein interacts with p53 and CREB-binding protein and represses transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *97*, 6763–6768.

Steffan, J.S., Bodai, L., Pallos, J., Poelman, M., McCampbell, A., Apostol, B.L., Kazantsev, A., Schmidt, E., Zhu, Y.Z., Greenwald, M., et al. (2001). Histone deacetylase inhibitors arrest polyglutamine-dependent neurodegeneration in *Drosophila*. *Nature* *413*, 739–743.

Steigerwald, F., Schulz, T.W., Schenker, L.T., Kennedy, M.B., Seeburg, P.H., and Köhr, G. (2000). C-Terminal truncation of NR2A subunits impairs synaptic but not extrasynaptic localization of NMDA receptors. *J. Neurosci.* *20*, 4573–4581.

Stephenson, J., Nutma, E., van der Valk, P., and Amor, S. (2018). Inflammation in CNS neurodegenerative diseases. *Immunology* *154*, 204–219.

Stoka, V., Turk, B., and Turk, V. (2005). Lysosomal cysteine proteases: structural features and their role in apoptosis. *IUBMB Life* *57*, 347–353.

Stoy, N., Mackay, G.M., Forrest, C.M., Christofides, J., Egerton, M., Stone, T.W., and Darlington, L.G. (2005). Tryptophan metabolism and oxidative stress in patients with Huntington's disease. *J. Neurochem.* *93*, 611–623.

Sturrock, A., Laule, C., Wyper, K., Milner, R.A., Decolongon, J., Santos, R.D., Coleman, A.J., Carter, K., Creighton, S., Bechtel, N., et al. (2015). A longitudinal study of magnetic resonance spectroscopy Huntington's disease biomarkers. *Movement Disorders : Official Journal of the Movement Disorder Society*.

Su, P., Zhang, J., Wang, D., Zhao, F., Cao, Z., Aschner, M., and Luo, W. (2016). The role of autophagy in modulation of neuroinflammation in microglia. *Neuroscience* *319*, 155–167.

Sugars, K.L., Brown, R., Cook, L.J., Swartz, J., and Rubinsztein, D.C. (2004). Decreased cAMP response element-mediated transcription: an early event in exon 1 and full-length cell models of Huntington's disease that contributes to polyglutamine pathogenesis. *J. Biol. Chem.* *279*, 4988–4999.

Sun, Y., and MacRae, T.H. (2005). The small heat shock proteins and their role in human disease. *FEBS J.* *272*, 2613–2627.

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. *The Lancet. Neurology* 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. *The Lancet. Neurology* 12, 637–649.

Tai, H.-C., and Schuman, E.M. (2008). Ubiquitin, the proteasome and protein degradation in neuronal function and dysfunction. *Nature Reviews Neuroscience* 9, 826–838.

Tai, Y.F., Pavese, N., Gerhard, A., Tabrizi, S.J., Barker, R.A., Brooks, D.J., and Piccini, P. (2007a). Microglial activation in presymptomatic Huntington's disease gene carriers. *Brain* 130, 1759–1766.

Tai, Y.F., Pavese, N., Gerhard, A., Tabrizi, S.J., Barker, R.A., Brooks, D.J., and Piccini, P. (2007b). Microglial activation in presymptomatic Huntington's disease gene carriers. *Brain* 130, 1759–1766.

Takahashi, T., Kikuchi, S., Katada, S., Nagai, Y., Nishizawa, M., and Onodera, O. (2008). Soluble polyglutamine oligomers formed prior to inclusion body formation are cytotoxic. *Hum. Mol. Genet.* 17, 345–356.

Takalo, M., Salminen, A., Soininen, H., Hiltunen, M., and Haapasalo, A. (2013). Protein aggregation and degradation mechanisms in neurodegenerative diseases. *Am J Neurodegener Dis* 2, 1–14.

Takano, H., and Gusella, J.F. (2002). The predominantly HEAT-like motif structure of huntingtin and its association and coincident nuclear entry with dorsal, an NF- κ B/Rel/dorsal family transcription factor. *BMC Neurosci* 3, 15.

Takeuchi, T. (2018). Non-cell Autonomous Maintenance of Proteostasis by Molecular Chaperones and Its Molecular Mechanism. *Biol. Pharm. Bull.* 41, 843–849.

Takeuchi, T., and Nagai, Y. (2017). Protein Misfolding and Aggregation as a Therapeutic Target for Polyglutamine Diseases. *Brain Sci* 7.

Takeuchi, T., Suzuki, M., Fujikake, N., Popiel, H.A., Kikuchi, H., Futaki, S., Wada, K., and Nagai, Y. (2015). Intercellular chaperone transmission via exosomes contributes to maintenance of protein homeostasis at the organismal level. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112, E2497-2506.

Tam, S., Spiess, C., Auyeung, W., Joachimiak, L., Chen, B., Poirier, M.A., and Frydman, J. (2009). The chaperonin TRiC blocks a huntingtin sequence element that promotes the conformational switch to aggregation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 1279–1285.

Tan, Z., Dai, W., van Erp, T.G.M., Overman, J., Demuro, A., Digman, M.A., Hatami, A., Albay, R., Sontag, E.M., Potkin, K.T., et al. (2015). Huntington's disease cerebrospinal fluid seeds aggregation of mutant huntingtin. *Mol. Psychiatry* 20, 1286–1293.

Tang, B.L. (2018). Unconventional Secretion and Intercellular Transfer of Mutant Huntingtin. *Cells* 7.

Tashiro, Y., Urushitani, M., Inoue, H., Koike, M., Uchiyama, Y., Komatsu, M., Tanaka, K., Yamazaki, M., Abe, M., Misawa, H., et al. (2012). Motor Neuron-specific Disruption of Proteasomes, but Not Autophagy, Replicates Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J. Biol. Chem.* 287, 42984–42994.

- Tatham, M.H., Plechanovová, A., Jaffray, E.G., Salmen, H., and Hay, R.T. (2013). Ube2W conjugates ubiquitin to α -amino groups of protein N-termini. *Biochem. J.* *453*, 137–145.
- Taylor, A.R., Robinson, M.B., Gifondorwa, D.J., Tytell, M., and Milligan, C.E. (2007). Regulation of heat shock protein 70 release in astrocytes: role of signaling kinases. *Dev Neurobiol* *67*, 1815–1829.
- The Huntington's Disease Collaborative Research group (1993). A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. The Huntington's Disease Collaborative Research Group. *Cell* *72*, 971–983.
- Theodosis, D.T. (2002). Oxytocin-secreting neurons: A physiological model of morphological neuronal and glial plasticity in the adult hypothalamus. *Front Neuroendocrinol* *23*, 101–135.
- Thibaut, T.A., Anderson, R.T., and Smith, D.M. (2018). A common mechanism of proteasome impairment by neurodegenerative disease-associated oligomers. *Nature Communications* *9*, 1097.
- Thompson, L.M., Aiken, C.T., Kaltenbach, L.S., Agrawal, N., Illes, K., Khoshnan, A., Martinez-Vincente, M., Arrasate, M., O'Rourke, J.G., Khashwji, H., et al. (2009). IKK phosphorylates Huntingtin and targets it for degradation by the proteasome and lysosome. *The Journal of Cell Biology* *187*, 1083–1099.
- Tkac, I., Dubinsky, J.M., Keene, C.D., Gruetter, R., and Low, W.C. (2007). Neurochemical changes in Huntington R6/2 mouse striatum detected by in vivo 1H NMR spectroscopy. *J. Neurochem.* *100*, 1397–1406.
- Tong, X., Ao, Y., Faas, G.C., Nwaobi, S.E., Xu, J., Haustein, M.D., Anderson, M.A., Mody, I., Olsen, M.L., Sofroniew, M.V., et al. (2014). Astrocyte Kir4.1 ion channel deficits contribute to neuronal dysfunction in Huntington's disease model mice. *Nature Neuroscience* *17*, 694–703.
- Tonoki, A., Kuranaga, E., Tomioka, T., Hamazaki, J., Murata, S., Tanaka, K., and Miura, M. (2009). Genetic Evidence Linking Age-Dependent Attenuation of the 26S Proteasome with the Aging Process. *Mol Cell Biol* *29*, 1095–1106.
- Trager, U., Andre, R., Lahiri, N., Magnusson-Lind, A., Weiss, A., Grueninger, S., McKinnon, C., Sirinathsingji, E., Kahlon, S., Pfister, E.L., et al. (2014). HTT-lowering reverses Huntington's disease immune dysfunction caused by NFkappaB pathway dysregulation. *Brain : A Journal of Neurology* *137*, 819–833.
- Trajkovic, K., Jeong, H., and Krainc, D. (2017). Mutant Huntingtin Is Secreted via a Late Endosomal/Lysosomal Unconventional Secretory Pathway. *J. Neurosci.* *37*, 9000–9012.
- Travessa, A.M., Rodrigues, F.B., Mestre, T.A., and Ferreira, J.J. (2017). Fifteen Years of Clinical Trials in Huntington's Disease: A Very Low Clinical Drug Development Success Rate. *J Huntingtons Dis* *6*, 157–163.
- Tripathi, P., Rodriguez-Muela, N., Klim, J.R., de Boer, A.S., Agrawal, S., Sandoe, J., Lopes, C.S., Ogliari, K.S., Williams, L.A., Shear, M., et al. (2017). Reactive Astrocytes Promote ALS-like Degeneration and Intracellular Protein Aggregation in Human Motor Neurons by Disrupting Autophagy through TGF- β 1. *Stem Cell Reports* *9*, 667–680.
- Trottier, Y., Biancalana, V., and Mandel, J.L. (1994). Instability of CAG repeats in Huntington's disease: relation to parental transmission and age of onset. *J. Med. Genet.* *31*, 377–382.

- Trottier, Y., Devys, D., Imbert, G., Saudou, F., An, I., Lutz, Y., Weber, C., Agid, Y., Hirsch, E.C., and Mandel, J.L. (1995). Cellular localization of the Huntington's disease protein and discrimination of the normal and mutated form. *Nat. Genet.* *10*, 104–110.
- Trushina, E., Dyer, R.B., Badger, J.D., Ure, D., Eide, L., Tran, D.D., Vrieze, B.T., Legendre-Guillemain, V., McPherson, P.S., Mandavilli, B.S., et al. (2004). Mutant huntingtin impairs axonal trafficking in mammalian neurons in vivo and in vitro. *Mol. Cell. Biol.* *24*, 8195–8209.
- Tsai, Y.C., Fishman, P.S., Thakor, N.V., and Oyler, G.A. (2003). Parkin Facilitates the Elimination of Expanded Polyglutamine Proteins and Leads to Preservation of Proteasome Function. *J. Biol. Chem.* *278*, 22044–22055.
- Tsang, T.M., Woodman, B., McLoughlin, G.A., Griffin, J.L., Tabrizi, S.J., Bates, G.P., and Holmes, E. (2006). Metabolic characterization of the R6/2 transgenic mouse model of Huntington's disease by high-resolution MAS 1H NMR spectroscopy. *J. Proteome Res.* *5*, 483–492.
- Tsvetkov, A.S., Arrasate, M., Barmada, S., Ando, D.M., Sharma, P., Shaby, B.A., and Finkbeiner, S. (2013). Proteostasis of polyglutamine varies among neurons and predicts neurodegeneration. *Nat. Chem. Biol.* *9*, 586–592.
- Turk, B., Turk, D., and Turk, V. (2000). Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers. *Biochim. Biophys. Acta* *1477*, 98–111.
- Turk, V., Turk, B., and Turk, D. (2001). Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities. *EMBO J.* *20*, 4629–4633.
- 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.
- Tydlacka, S., Wang, C.E., Wang, X., Li, S., and Li, X.J. (2008). Differential activities of the ubiquitin-proteasome system in neurons versus glia may account for the preferential accumulation of misfolded proteins in neurons. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* *28*, 13285–13295.
- Tyedmers, J., Mogk, A., and Bukau, B. (2010). Cellular strategies for controlling protein aggregation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *11*, 777–788.
- Underwood, B.R., Green-Thompson, Z.W., Pugh, P.J., Lazic, S.E., Mason, S.L., Griffin, J., Jones, P.S., Rowe, J.B., Rubinsztein, D.C., and Barker, R.A. (2017). An open-label study to assess the feasibility and tolerability of rilmenidine for the treatment of Huntington's disease. *J. Neurol.* *264*, 2457–2463.
- Vachey, G., and Déglon, N. (2018). CRISPR/Cas9-Mediated Genome Editing for Huntington's Disease. *Methods Mol. Biol.* *1780*, 463–481.
- Valenza, M., and Cattaneo, E. (2011). Emerging roles for cholesterol in Huntington's disease. *Trends Neurosci.* *34*, 474–486.
- Valenza, M., Leoni, V., Karasinska, J.M., Petricca, L., Fan, J., Carroll, J., Pouladi, M.A., Fossale, E., Nguyen, H.P., Riess, O., et al. (2010). Cholesterol defect is marked across multiple rodent models of Huntington's disease and is manifest in astrocytes. *J. Neurosci.* *30*, 10844–10850.

- Van Laere, K., Casteels, C., Dhollander, I., Goffin, K., Grachev, I., Bormans, G., and Vandenberghe, W. (2010). Widespread decrease of type 1 cannabinoid receptor availability in Huntington disease in vivo. *J. Nucl. Med.* *51*, 1413–1417.
- Venkatraman, P., Wetzel, R., Tanaka, M., Nukina, N., and Goldberg, A.L. (2004). Eukaryotic Proteasomes Cannot Digest Polyglutamine Sequences and Release Them during Degradation of Polyglutamine-Containing Proteins. *Molecular Cell* *14*, 95–104.
- Verdoes, M., Oresic Bender, K., Segal, E., van der Linden, W.A., Syed, S., Withana, N.P., Sanman, L.E., and Bogyo, M. (2013). Improved quenched fluorescent probe for imaging of cysteine cathepsin activity. *J. Am. Chem. Soc.* *135*, 14726–14730.
- Verkhatsky, A., and Nedergaard, M. (2018). Physiology of Astroglia. *Physiol. Rev.* *98*, 239–389.
- Verkhatsky, A., Nedergaard, M., and Hertz, L. (2015). Why are astrocytes important? *Neurochem. Res.* *40*, 389–401.
- Vilchez, D., Morantte, I., Liu, Z., Douglas, P.M., Merkwirth, C., Rodrigues, A.P.C., Manning, G., and Dillin, A. (2012). RPN-6 determines *C. elegans* longevity under proteotoxic stress conditions. *Nature* *489*, 263–268.
- Vilchez, D., Saez, I., and Dillin, A. (2014). The role of protein clearance mechanisms in organismal ageing and age-related diseases. *Nature Communications* *5*, 5659.
- Virchow, R. (1856). *Gesammelte Abhandlungen zur wissenschaftlichen Medizin*.
- Vittal, V., Shi, L., Wenzel, D.M., Scaglione, K.M., Duncan, E.D., Basrur, V., Elenitoba-Johnson, K.S.J., Baker, D., Paulson, H.L., Brzovic, P.S., et al. (2015). Intrinsic disorder drives N-terminal ubiquitination by Ube2w. *Nat. Chem. Biol.* *11*, 83–89.
- Volterra, A., and Meldolesi, J. (2005). Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nature Reviews. Neuroscience* *6*, 626–640.
- Vonsattel, J.P., and DiFiglia, M. (1998). Huntington disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *57*, 369–384.
- Vonsattel, J.P., Myers, R.H., Stevens, T.J., Ferrante, R.J., Bird, E.D., and Richardson, E.P., Jr. (1985a). Neuropathological classification of Huntington's disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* *44*, 559–577.
- Vonsattel, J.P., Myers, R.H., Stevens, T.J., Ferrante, R.J., Bird, E.D., and Richardson, E.P. (1985b). Neuropathological classification of Huntington's disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *44*, 559–577.
- Wacker, J.L., Zareie, M.H., Fong, H., Sarikaya, M., and Muchowski, P.J. (2004). Hsp70 and Hsp40 attenuate formation of spherical and annular polyglutamine oligomers by partitioning monomer. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *11*, 1215–1222.
- Walker, L.C., and LeVine, H. (2012). Corruption and spread of pathogenic proteins in neurodegenerative diseases. *J. Biol. Chem.* *287*, 33109–33115.
- van Wamelen, D.J., Aziz, N.A., Roos, R. a. C., and Swaab, D.F. (2014). Hypothalamic alterations in Huntington's disease patients: comparison with genetic rodent models. *J. Neuroendocrinol.* *26*, 761–775.

- Wang, B., Zeng, L., Merillat, S.A., Fischer, S., Ochaba, J., Thompson, L.M., Barmada, S.J., Scaglione, K.M., and Paulson, H.L. (2018). The ubiquitin conjugating enzyme Ube2W regulates solubility of the Huntington's disease protein, huntingtin. *Neurobiol. Dis.* *109*, 127–136.
- Wang, L., Lin, F., Wang, J., Wu, J., Han, R., Zhu, L., Difiglia, M., and Qin, Z. (2012). Expression of mutant N-terminal huntingtin fragment (htt552-100Q) in astrocytes suppresses the secretion of BDNF. *Brain Research* *1449*, 69–82.
- Wegrzynowicz, M., Bichell, T.J., Soares, B.D., Loth, M.K., McGlothan, J.S., Mori, S., Alikhan, F.S., Hua, K., Coughlin, J.M., Holt, H.K., et al. (2015). Novel BAC Mouse Model of Huntington's Disease with 225 CAG Repeats Exhibits an Early Widespread and Stable Degenerative Phenotype. *J Huntingtons Dis* *4*, 17–36.
- Wellington, C.L., Leavitt, B.R., and Hayden, M.R. (2000). Huntington disease: new insights on the role of huntingtin cleavage. *J. Neural Transm. Suppl.* 1–17.
- Wendt, W., Zhu, X.-R., Lübbert, H., and Stichel, C.C. (2007). Differential expression of cathepsin X in aging and pathological central nervous system of mice. *Exp. Neurol.* *204*, 525–540.
- Wendt, W., Lübbert, H., and Stichel, C.C. (2008). Upregulation of cathepsin S in the aging and pathological nervous system of mice. *Brain Res.* *1232*, 7–20.
- Wexler, A., Wild, E.J., and Tabrizi, S.J. (2016). George Huntington: a legacy of inquiry, empathy and hope. *Brain* *139*, 2326–2333.
- Weydt, P., Pineda, V.V., Torrence, A.E., Libby, R.T., Satterfield, T.F., Lazarowski, E.R., Gilbert, M.L., Morton, G.J., Bammler, T.K., Strand, A.D., et al. (2006). Thermoregulatory and metabolic defects in Huntington's disease transgenic mice implicate PGC-1alpha in Huntington's disease neurodegeneration. *Cell Metab.* *4*, 349–362.
- White, J.K., Auerbach, W., Duyao, M.P., Vonsattel, J.P., Gusella, J.F., Joyner, A.L., and MacDonald, M.E. (1997). Huntingtin is required for neurogenesis and is not impaired by the Huntington's disease CAG expansion. *Nat. Genet.* *17*, 404–410.
- Wild, E.J., and Tabrizi, S.J. (2017). Therapies targeting DNA and RNA in Huntington's disease. *Lancet Neurol* *16*, 837–847.
- Wild, E.J., Boggio, R., Langbehn, D., Robertson, N., Haider, S., Miller, J.R.C., Zetterberg, H., Leavitt, B.R., Kuhn, R., Tabrizi, S.J., et al. (2015). Quantification of mutant huntingtin protein in cerebrospinal fluid from Huntington's disease patients. *J. Clin. Invest.* *125*, 1979–1986.
- Wilhelmsson, U., Bushong, E.A., Price, D.L., Smarr, B.L., Phung, V., Terada, M., Ellisman, M.H., and Pekny, M. (2006). Redefining the concept of reactive astrocytes as cells that remain within their unique domains upon reaction to injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *103*, 17513–17518.
- Wilson, J.X. (1997). Antioxidant defense of the brain: a role for astrocytes. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* *75*, 1149–1163.
- Wojtowicz, A.M., Dvorzhak, A., Semtner, M., and Grantyn, R. (2013). Reduced tonic inhibition in striatal output neurons from Huntington mice due to loss of astrocytic GABA release through GAT-3. *Frontiers in Neural Circuits* *7*, 188.

- Wong, E., and Cuervo, A.M. (2010). Integration of clearance mechanisms: the proteasome and autophagy. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a006734.
- 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.
- Wood, T.E., Barry, J., Yang, Z., Cepeda, C., Levine, M.S., and Gray, M. (2018). Mutant huntingtin reduction in astrocytes slows disease progression in the bachd conditional huntington's disease mouse model. *Hum. Mol. Genet.*
- Wooten, M.W., Hu, X., Babu, J.R., Seibenhener, M.L., Geetha, T., Paine, M.G., and Wooten, M.C. (2006). Signaling, polyubiquitination, trafficking, and inclusions: sequestosome 1/p62's role in neurodegenerative disease. *J. Biomed. Biotechnol.* 2006, 62079.
- Wytenbach, A., Sauvageot, O., Carmichael, J., Diaz-Latoud, C., Arrigo, A.-P., and Rubinsztein, D.C. (2002). Heat shock protein 27 prevents cellular polyglutamine toxicity and suppresses the increase of reactive oxygen species caused by huntingtin. *Hum. Mol. Genet.* 11, 1137–1151.
- Xie, Y., Hayden, M.R., and Xu, B. (2010). BDNF overexpression in the forebrain rescues Huntington's disease phenotypes in YAC128 mice. *J. Neurosci.* 30, 14708–14718.
- Xu, X., Tay, Y., Sim, B., Yoon, S.-I., Huang, Y., Ooi, J., Utami, K.H., Ziaei, A., Ng, B., Radulescu, C., et al. (2017). Reversal of Phenotypic Abnormalities by CRISPR/Cas9-Mediated Gene Correction in Huntington Disease Patient-Derived Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports* 8, 619–633.
- Xuereb, J.H., MacMillan, J.C., Snell, R., Davies, P., and Harper, P.S. (1996). Neuropathological diagnosis and CAG repeat expansion in Huntington's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 60, 78–81.
- Yamamoto, A., Tagawa, Y., Yoshimori, T., Moriyama, Y., Masaki, R., and Tashiro, Y. (1998). Bafilomycin A1 prevents maturation of autophagic vacuoles by inhibiting fusion between autophagosomes and lysosomes in rat hepatoma cell line, H-4-II-E cells. *Cell Struct. Funct.* 23, 33–42.
- Yamamoto, A., Lucas, J.J., and Hen, R. (2000). Reversal of neuropathology and motor dysfunction in a conditional model of Huntington's disease. *Cell* 101, 57–66.
- Yamamoto, A., Cremona, M.L., and Rothman, J.E. (2006). Autophagy-mediated clearance of huntingtin aggregates triggered by the insulin-signaling pathway. *J. Cell Biol.* 172, 719–731.
- Yamanaka, T., Miyazaki, H., Oyama, F., Kurosawa, M., Washizu, C., Doi, H., and Nukina, N. (2008). Mutant Huntingtin reduces HSP70 expression through the sequestration of NF-Y transcription factor. *EMBO J.* 27, 827–839.
- Yang, H., Zhong, X., Ballar, P., Luo, S., Shen, Y., Rubinsztein, D.C., Monteiro, M.J., and Fang, S. (2007). Ubiquitin ligase Hrd1 enhances the degradation and suppresses the toxicity of polyglutamine-expanded huntingtin. *Experimental Cell Research* 313, 538–550.
- Yang, S., Chang, R., Yang, H., Zhao, T., Hong, Y., Kong, H.E., Sun, X., Qin, Z., Jin, P., Li, S., et al. (2017). CRISPR/Cas9-mediated gene editing ameliorates neurotoxicity in mouse model of Huntington's disease. *J. Clin. Invest.* 127, 2719–2724.

- Yu, Z.X., Li, S.H., Evans, J., Pillarisetti, A., Li, H., and Li, X.J. (2003). Mutant huntingtin causes context-dependent neurodegeneration in mice with Huntington's disease. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 23, 2193–2202.
- Yuen, E.Y., Wei, J., Zhong, P., and Yan, Z. (2012). Disrupted GABAAR trafficking and synaptic inhibition in a mouse model of Huntington's disease. *Neurobiol. Dis.* 46, 497–502.
- Zacharoff, L., Tkac, I., Song, Q., Tang, C., Bolan, P.J., Mangia, S., Henry, P.-G., Li, T., and Dubinsky, J.M. (2012). Cortical metabolites as biomarkers in the R6/2 model of Huntington's disease. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 32, 502–514.
- Zaffagnini, G., and Martens, S. (2016). Mechanisms of Selective Autophagy. *J. Mol. Biol.* 428, 1714–1724.
- Zala, D., Bensadoun, J.-C., Pereira de Almeida, L., Leavitt, B.R., Gutekunst, C.-A., Aebischer, P., Hayden, M.R., and Déglon, N. (2004). Long-term lentiviral-mediated expression of ciliary neurotrophic factor in the striatum of Huntington's disease transgenic mice. *Exp. Neurol.* 185, 26–35.
- Zamanian, J.L., Xu, L., Foo, L.C., Nouri, N., Zhou, L., Giffard, R.G., and Barres, B.A. (2012). Genomic analysis of reactive astrogliosis. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 32, 6391–6410.
- 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.
- Zhai, W., Jeong, H., Cui, L., Krainc, D., and Tjian, R. (2005). In vitro analysis of huntingtin-mediated transcriptional repression reveals multiple transcription factor targets. *Cell* 123, 1241–1253.
- Zhang, J., Gregory, S., Scahill, R.I., Durr, A., Thomas, D.L., Lehericy, S., Rees, G., Tabrizi, S.J., Zhang, H., and TrackOn-HD investigators (2018a). In vivo characterization of white matter pathology in premanifest huntington's disease. *Ann. Neurol.* 84, 497–504.
- Zhang, X., Smith, D.L., Meriin, A.B., Engemann, S., Russel, D.E., Roark, M., Washington, S.L., Maxwell, M.M., Marsh, J.L., Thompson, L.M., et al. (2005). A potent small molecule inhibits polyglutamine aggregation in Huntington's disease neurons and suppresses neurodegeneration in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 892–897.
- Zhang, X., Abels, E.R., Redzic, J.S., Margulis, J., Finkbeiner, S., and Breakefield, X.O. (2016). Potential Transfer of Polyglutamine and CAG-Repeat RNA in Extracellular Vesicles in Huntington's Disease: Background and Evaluation in Cell Culture. *Cell. Mol. Neurobiol.* 36, 459–470.
- Zhang, X., Wan, J.-Q., and Tong, X.-P. (2018b). Potassium channel dysfunction in neurons and astrocytes in Huntington's disease. *CNS Neurosci Ther* 24, 311–318.
- Zhang, Y., Chen, K., Sloan, S.A., Bennett, M.L., Scholze, A.R., O'Keefe, S., Phatnani, H.P., Guarnieri, P., Caneda, C., Ruderisch, N., et al. (2014). An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex. *J. Neurosci.* 34, 11929–11947.

- Zhao, T., Hong, Y., Li, S., and Li, X.-J. (2016). Compartment-Dependent Degradation of Mutant Huntingtin Accounts for Its Preferential Accumulation in Neuronal Processes. *J. Neurosci.* *36*, 8317–8328.
- Zhao, T., Hong, Y., Yin, P., Li, S., and Li, X.-J. (2017). Differential HspBP1 expression accounts for the greater vulnerability of neurons than astrocytes to misfolded proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *114*, E7803–E7811.
- Zhou, Y., and Danbolt, N.C. (2013). GABA and Glutamate Transporters in Brain. *Front Endocrinol (Lausanne)* *4*, 165.
- Zhou, H., Li, S.H., and Li, X.J. (2001). Chaperone suppression of cellular toxicity of huntingtin is independent of polyglutamine aggregation. *J. Biol. Chem.* *276*, 48417–48424.
- Zuccato, C., Ciammola, A., Rigamonti, D., Leavitt, B.R., Goffredo, D., Conti, L., MacDonald, M.E., Friedlander, R.M., Silani, V., Hayden, M.R., et al. (2001). Loss of huntingtin-mediated BDNF gene transcription in Huntington's disease. *Science* *293*, 493–498.
- 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. *Nature Genetics* *35*, 76–83.
- Zuccato, C., Belyaev, N., Conforti, P., Ooi, L., Tartari, M., Papadimou, E., MacDonald, M., Fossale, E., Zeitlin, S., Buckley, N., et al. (2007). Widespread disruption of repressor element-1 silencing transcription factor/neuron-restrictive silencer factor occupancy at its target genes in Huntington's disease. *J. Neurosci.* *27*, 6972–6983.
- Zuccato, C., Valenza, M., and Cattaneo, E. (2010). Molecular mechanisms and potential therapeutical targets in Huntington's disease. *Physiological Reviews* *90*, 905–981.

Titre : Les astrocytes réactifs, des partenaires anti-agrégants dans la maladie de Huntington : identification des mécanismes impliqués dans le dialogue neurone-astrocyte.

Mots clés : Agrégats de mHtt, maladie de Huntington, astrocytes réactifs, protéostasie, vecteurs viraux, voie JAK2-STAT3.

Résumé : La maladie de Huntington (MH) est une maladie neurodégénérative causée par une extension de répétitions du codon CAG dans le gène de la *Huntingtine* (*Htt*). Cette maladie est caractérisée par la mort des neurones striataux et la présence d'agrégats de Htt mutée (mHtt). De plus, au cours de la MH, les astrocytes, qui sont essentiels au bon fonctionnement neuronal, changent d'état et deviennent réactifs. La réactivité astrocytaire est caractérisée par des changements morphologiques et transcriptomiques mais l'impact fonctionnel de cette réactivité reste peu compris.

Afin d'étudier le rôle des astrocytes réactifs dans la MH, nous avons utilisé des vecteurs viraux récemment développés par notre équipe, qui induisent ou bloquent la réactivité astrocytaire *in vivo* en ciblant la voie JAK2-STAT3. Nous avons montré que les astrocytes réactifs diminuent le nombre et la taille des agrégats de mHtt majoritairement présents dans les neurones. Ceci est associé à l'amélioration de plusieurs altérations neuronales observées dans ces modèles. Une analyse transcriptomique réalisée sur des astrocytes réactifs révèle des changements majeurs d'expression de gènes liés aux systèmes de protéostasie. De plus, l'activité du lysosome

et du protéasome est augmentée dans les astrocytes réactifs de souris modèles de la MH. Nous montrons également que les astrocytes réactifs éliminent plus efficacement leurs propres agrégats de mHtt, suggérant qu'au cours de la MH, ces cellules pourraient dégrader plus efficacement la mHtt provenant des neurones. De plus, certaines protéines chaperonnes sont induites dans les astrocytes réactifs. En particulier, la co-chaperonne DNAJB1/Hsp40 est surexprimée dans les astrocytes réactifs et est retrouvée dans les exosomes isolés à partir de striata de souris MH. Des expériences de gain et perte de fonction suggèrent que cette chaperonne est impliquée dans les effets bénéfiques des astrocytes réactifs sur l'agrégation de la mHtt et l'état des neurones. Les astrocytes réactifs pourraient donc libérer des protéines anti-agrégantes qui favorise l'élimination de la mHtt dans les neurones.

Notre étude montre que les astrocytes peuvent, en devenant réactifs au cours de la MH, acquérir des propriétés bénéfiques pour les neurones et favoriser, via un dialogue complexe avec les neurones, l'élimination des agrégats de mHtt.

Titre : Reactive astrocytes as anti-aggregation partners in Huntington's disease : identification of mechanisms involved in the neuron-astrocyte dialogue.

Mots clés : mHtt aggregates, Huntington's disease, reactive astrocytes, proteostasis, viral vector, JAK2-STAT3 pathway.

Résumé : Huntington's disease (HD) is a hereditary neurodegenerative disease caused by an expansion of CAG codons in the *Huntingtin* gene. It is characterized by the death of striatal neurons and the presence of mutant Huntingtin (mHtt) aggregates. In pathological conditions, as in HD, astrocytes change and become reactive. Astrocyte reactivity is characterized by morphological and significant transcriptomic changes. Astrocytes are essential for the proper functioning of neurons but the functional changes associated with reactivity are still unclear.

To better understand the roles played by reactive astrocytes in HD, we took advantage of our recently developed viral vectors that infect selectively astrocytes *in vivo* and either block or induce reactivity, through manipulation of the JAK2-STAT3 pathway. We used these vectors in two complementary mouse models of HD and found that reactive astrocytes decrease the number and the size of mHtt aggregates that mainly form in neurons. Reduced mHtt aggregation was associated with improvement of neuronal alterations observed in our mouse models of HD.

A genome-wide transcriptomic analysis was performed on acutely sorted reactive astrocytes and revealed an enrichment in genes linked to proteolysis. Lysosomal and proteosomal activities were also increased in reactive astrocytes in HD mice. Moreover, we show that reactive astrocytes degrade more efficiently their own mHtt aggregates, suggesting that these cells could siphon mHtt away from neurons. Alternatively, several chaperones were induced in reactive astrocytes. In particular, the co-chaperone DNAJB1/Hsp40 was upregulated in reactive astrocytes and was present in exosomal fraction from HD mouse striatum. Loss and gain of function experiments suggest that this chaperone is involved in the beneficial effects of reactive astrocytes on mHtt aggregation and neuronal status. Therefore, reactive astrocytes could release anti-aggregation proteins that could promote mHtt clearance in neurons.

Overall, our data show that astrocytes, by becoming reactive in HD, develop a protective response that involves complex bidirectional signaling with neurons to reduce mHtt aggregation.

