



**HAL**  
open science

# Rôle des altérations transcriptionnelles et épigénétiques dans les déficits comportementaux de la maladie de Huntington

Caroline Lotz-Tavernier

► **To cite this version:**

Caroline Lotz-Tavernier. Rôle des altérations transcriptionnelles et épigénétiques dans les déficits comportementaux de la maladie de Huntington. Neurosciences [q-bio.NC]. Université de Strasbourg, 2019. Français. NNT : 2019STRAJ099 . tel-03270806

**HAL Id: tel-03270806**

**<https://theses.hal.science/tel-03270806>**

Submitted on 25 Jun 2021

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE**

**Laboratoire de Neurosciences Cognitives et Adaptatives**

**THÈSE** présentée par :

**Caroline LOTZ-TAVERNIER**

soutenue le : **17 décembre 2019**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : **Neurosciences**

**Rôle des altérations transcriptionnelles et  
épigénétiques dans les déficits comportementaux  
de la maladie de Huntington**

**THÈSE** dirigée par :

**Mme MERIENNE Karine**

Directrice de recherche, Université de Strasbourg

**RAPPORTEURS :**

**Mme CABOCHE Jocelyne**

Directrice de recherche, Université Pierre et Marie Curie

**M. FAURE Alexis**

Maître de conférences, Université Paris-Sud

**EXAMINATEUR :**

**Mme ROUAUX Caroline**

Chargée de recherche, Université de Strasbourg

---

**INVITE :**

**M. BROUILLET Emmanuel**

Directeur de recherche, Université Paris-Saclay



## ..... REMERCIEMENTS .....

La thèse est un long fleuve, pas toujours tranquille, le long duquel j'ai été accompagnée par de nombreuses personnes. Je souhaite remercier tous ceux qui m'ont aidée à mener à bien cette thèse, de près ou de loin, matériellement, physiquement ou psychologiquement.

Je tiens tout d'abord à remercier les docteurs **Jocelyne CABOCHE**, **Caroline ROUAUX** et **Alexis FAURE** de m'avoir fait l'honneur d'évaluer mon travail de thèse. J'ai été ravie d'avoir pu échanger avec vous sur mes travaux. Je remercie également le Dr. **Emmanuel BROUILLET** pour notre collaboration et pour avoir assisté à ma soutenance de thèse.

Merci au Pr. **Jean-Christophe CASSEL**, directeur du LNCA, de m'avoir accueillie au laboratoire et d'avoir été présent pendant ces trois ans pour répondre à mes questions, particulièrement pour la préparation du concours de l'école doctorale qui marque le début de cette aventure.

Je remercie également le Dr. **Anne-Laurence BOUTILLIER** de m'avoir accueillie dans l'équipe. Merci Laurette pour tes conseils au cours de ma thèse et particulièrement pour nos discussions à propos des résultats, ta disponibilité et ton soutien en cette fin de thèse.

Je souhaite tout particulièrement adresser des remerciements à ma directrice de thèse, **Karine MERIENNE**. Karine, un grand merci à toi qui, depuis le master, m'a donnée la chance de travailler à tes côtés. Merci de m'avoir poussée tout au long de ces 3 années à me dépasser, d'avoir pris le temps de m'enseigner la démarche et la rigueur scientifique, et surtout merci pour ta patience, ainsi que ta disponibilité (et tes relectures !). J'ai particulièrement apprécié d'avoir pu échanger avec toi en cette fin de thèse à propos des résultats et des hypothèses qui en découlent. Je suis fière de pouvoir aujourd'hui me sentir presque à l'aise en face de données transcriptomiques ! Pour tout cela et tout le reste, merci.

Un merci tout particulier également à **Rafael ALCALA VIDA** qui, à plusieurs niveaux, a beaucoup contribué à cette thèse. Rafa, thank you so much for everything. Thank you for your support, for everything you taught me, for your help in the experiments but also in the analyzes. Thank you also for the funny memories in the surgery room that made the dissection times lighter ! I think I will never forget your battle with the bug and the trash, and especially I will never forget your head THE FAMOUS DAY of dissection, it will continue to make me laugh for a long time !

Je souhaite remercier **Jonathan SEGUIN** d'avoir pris du temps pour relire ma thèse et m'aider, à maintes et maintes reprises, à comprendre les analyses bioinformatiques et les statistiques. Merci pour toutes tes analyses, ta disponibilité et ton investissement dans ma thèse.

Je remercie également **Ali AWADA**, qui a réalisé des expériences pour ma thèse. Ali, thanks à lot for your help for the counting at the end of my thesis ! So now, the next one is you ;) I wish you success and, above all, to enjoy your third year of PhD !

Bien évidemment, c'est le tour de **Brigitte** et **Karine** ! Il n'y a pas de tartines à faire parce que vous savez à quel point vous êtes des piliers pour le laboratoire !

Brigitte, je me rappelle encore mon premier jour de stage de master, je l'ai passé avec toi en salle d'immuno à faire des essais de marquages, autant dire que ma vie au LNCA commençait bien ! Merci pour tout ce que tu m'as appris, pour les coups de mains, d'avoir été là dans les moments de ras-le-bol, mais aussi dans les bons moments ... Merci pour ton soutien sans failles et surtout de m'avoir appris à dire non et à redescendre sur Terre quand mon esprit partait en cacahuète !

Karine, j'ai été ravie de pouvoir râler avec toi le matin lorsque le labo est encore calme, ton self-contrôle le reste de la journée m'a toujours impressionnée ! Merci pour ta gentillesse, ta disponibilité, ton investissement et ta bonne humeur à toute épreuve.

J'ai eu également l'occasion pendant ma thèse de rencontrer des amies formidables : **Amélie, Aurélie, Estelle, Laurie-Anne et Marie**. Je sais qu'on continuera les soirées filles et sushis, les potins seront justes différents ! Merci pour tous ces moments « off » qu'on n'a pu partager.

Estelle, je suis heureuse de t'avoir eu à mes côtés pendant ces 3 ans et demi. Merci simplement d'avoir été là au quotidien. On a partagé les mêmes galères, les week-ends comportement, les coups de bourre, les pétages de plomb, la forme de poire et surtout, les odeurs matinales et les « Hm » ! Promis je viendrais avec des bières et des sandwiches triangles quand tu en auras besoin les prochains mois.

Aurélie, j'ai été très contente que tu nous rejoignes dans l'équipe et j'avoue que nos discussions matinales m'ont vraiment manquées cette année. Merci beaucoup d'avoir pris du temps pour relire ma thèse (Htt :). Merci aussi pour tes nombreux coups de mains, tes trucs et astuces, tes séances de relaxation et ton accent alsacien ! Et surtout merci de m'avoir toujours soutenue.

Marie, tu as été mon coach pour la rédaction et mon indicateur de « normalité ». J'ai été heureuse qu'on ait pu aller à la FENS ensemble l'année dernière, les meilleurs sushis du monde resteront gravés sur mon palais ! Merci beaucoup d'avoir été vraiment présente pour moi pendant cette dernière année de thèse, d'avoir compris mes phases « ascenseur émotionnel », d'avoir toujours pris du temps pour me rassurer.

Amélie, je suis heureuse que dès le début de ma thèse tu aies été présente et qu'on ait pu se rapprocher. Merci de m'avoir formée et appris ta rigueur dans les expériences (les extractions d'ARNs du lundi matin...), mais aussi d'avoir toujours cru en moi et de m'avoir écoutée (avec une bonne gaufre c'était encore mieux). Merci aussi pour tes petits messages et ton aide en cette fin de thèse, word n'a effectivement plus de secrets pour toi !

Laurie, tu es arrivée en cours de route, et tu es pour moi un modèle de réussite ! Merci d'avoir été particulièrement présente pour moi en cette fin de thèse malgré ton emploi du temps hyper chargé. Tes conseils et ton soutien m'ont été très précieux.

Merci à la team pétanque (**Etienne, David, Amélie, Estelle, Christian, JC**) qui permettait une petite bouffée d'oxygène entre 12 et 14h. Merci David pour tes conseils en cette fin de rédaction et grâce à toi je me sentais moins seule en galère avec les analyses transcriptomiques.

Merci aussi aux « anciens » du labo, **Damien** pour les nombreuses bières, les sushis et tes coups de mains dès que nécessaire, **Bastien** pour les petits « afterworks » de l'époque dans ton jardin et tes visites au labo avec Olya qui nous redonnaient toujours le sourire.

Je remercie aussi les « nouveaux » doctorants (plus si nouveaux), **Laura T.** pour t'être si bien occupée des souris, **Laura D, Christopher, Caroline, Marion et Gaëlle**. La fin de la thèse arrive plus vite qu'on ne le pense, alors bon courage pour le reste !

Un grand merci à **tous les autres membres du laboratoire**, notamment : **Vincent**, pour avoir partagé avec moi tous ces week-ends de comportement et pour toutes nos discussions sur « l'après-thèse » et la vie à la campagne ; **Katia**, pour avoir été dans mon jury de mi-thèse et ton soutien ; **Anne** pour ton aide avec la station de comptage et ta gentillesse ; **Carole**, pour nos nombreuses discussions de bureau ; **Catherine**, pour tes sourires le matin et ta gentillesse ; **Aude**, pour avoir pris soin de nos souris au début de ma thèse ; **Chantal**, pour ton investissement avec les souris et tes conseils ; **Georges et Olivier**, pour avoir pris soin de nos animaux.

Merci aussi aux stagiaires, **Elisabeth, Jade, Théo et Florian**, pour leur contribution à mon projet.

Je souhaite remercier ma famille et mes amis qui m'ont soutenue, qui ont supporté et accepté, sans toujours comprendre, les inconvénients de la thèse et du travail avec les animaux. Merci à vous de m'avoir fait régulièrement « sortir la tête » du bouillon comme on dit. Grâce à vous, j'ai appris à déconnecter pour mieux repartir, et ma dernière année a été beaucoup plus facile à vivre comme cela.

**Maman**, sans ton soutien je ne serais jamais arrivée jusque-là. Merci d'avoir toujours cru en moi et d'avoir toujours compris et accepté mon investissement dans ma thèse. Tu es mon pilier, merci simplement pour tout ce que tu fais depuis le début.

**Thomas**, j'espère que cette thèse te permettra de comprendre que les « chercheurs ne font pas que chercher quoi chercher » ! Il va falloir trouver d'autres blagues et dictons ! Merci de m'avoir si souvent embêtée, ça m'a endurcie n'est-ce pas ? Je suis heureuse d'avoir pu toujours compter sur toi sur le plan personnel, particulièrement pendant cette année 2019.

**Bernard**, finis aussi les « des chercheurs qui cherchent on en trouve, .. », tu verras que des chercheurs qui trouvent il y en a aussi ! Merci pour les nœuds que tu m'as dénoué plusieurs fois dans le dos ! Et merci simplement d'être avec nous.

**Monique et Éric**, merci d'avoir compris, depuis le master, ces nombreux week-ends et soirées passés à travailler. Grâce à vous, j'ai également pu mettre à certains moments ma thèse de côté pour profiter des moments passés en famille.

Je tiens à remercier mes cousins pour votre soutien lors de cette dernière ligne droite, qui m'a vraiment fait chaud au cœur.

**François**, grâce à toi mon stock de thé n'a jamais été négligé et il t'en remercie (bon en vrai c'est surtout moi qui te remercie) ! Merci aussi pour ton soutien, ta compréhension et pour les breaks réparateurs-de-moral de la préparation du concert.

**Jérémie et Nathalie**, merci pour les nombreuses relectures dans un temps restreint (si ça se trouve vous avez tout refourgué à Léo-Paul et Jean-Baptiste enfaite... bravo) ! Merci pour vos nombreux coups de mains proposés et votre soutien sans failles !

À mes précieuses amies depuis toujours, **Sophie et Marie**, merci d'être là pour moi. Je ne vous remercierai jamais assez pour tout ce que vous avez fait pour moi cette année.

Fofie, merci pour toutes ces balades et ces discussions sur le banc des commères quand ça n'allait pas (et même quand ça allait !). Merci d'être revenue en dernière minute fin octobre, tu tombais à pic. Bon... maintenant je n'ai plus qu'à prendre mes billets pour la Martinique !

Marie, merci d'avoir toujours voulu « casser des gueules » quand j'étais énervée. Merci de m'avoir envoyé des petits messages de temps en temps pour me sortir de la rédaction et de venir me voir pour boire des bières (ou de la tisane enfaite) et papoter.

Un grand merci aussi à **Pauline** d'être toujours là quand j'en ai besoin, **Raphaël** pour tes talents de graphistes qui nous ont tellement aidés cette année, **Timothé** pour me rappeler qu'il y a toujours pire comme situation. Mais un grand merci aussi **Tyb** de me pousser à me renseigner sur l'après-thèse, pour tes corrections et aussi pour les soirées ragots-bières de l'époque. Enfin, **Julien** un grand merci pour la relecture de l'introduction (même si tu n'as compris que le grand 1 !).

Mention spéciale à **Pétrus**, le gardien du savoir, qui a été là jours et nuits pour garder mes affaires.

Le meilleur pour la fin, **Mathieu**. Merci d'avoir accepté, supporté mes humeurs et mes absences, je sais que ce n'était pas facile tous les jours. Merci d'avoir endossé le rôle d'aide à domicile et d'aide à la personne ces derniers mois et particulièrement ces dernières semaines. Merci de m'avoir fait prendre l'air, de m'avoir encouragée et de m'avoir fait rire quand j'en avais besoin. Merci de m'avoir rappelé qu'il n'y avait pas que la thèse dans la vie. À toi, mon mari, je t'aime.



# ..... TABLE DES MATIERES .....

<b>Introduction</b>	<b>1</b>
<b>1. La maladie de Huntington</b>	<b>3</b>
1.1. De la chorée à la MH	3
1.2. La MH, une maladie génétique	4
<b>1.2.1. La répétition de triplets CAG</b>	<b>4</b>
<b>1.2.2. Une expansion particulièrement instable</b>	<b>6</b>
<b>1.2.3. Des gènes modificateurs</b>	<b>6</b>
1.3. Neuropathologie de la MH	8
<b>1.3.1. Le striatum</b>	<b>8</b>
1.3.1.a. Description générale	8
1.3.1.b. Connectivité du striatum	10
1.3.1.c. Striatum dorsal et cognition	12
1.3.1.d. Striatum ventral et cognition	13
<b>1.3.2. Le striatum dans la MH</b>	<b>14</b>
1.3.2.a. L'atrophie striatale	14
1.3.2.b. La vulnérabilité du striatum	16
1.4. Une triade de symptômes	19
<b>1.4.1. Troubles moteurs</b>	<b>19</b>
<b>1.4.2. Troubles psychiatriques</b>	<b>20</b>
<b>1.4.3. Troubles cognitifs</b>	<b>21</b>
1.4.3.a. Des altérations cognitives multiples	21
1.4.3.b. Des altérations cognitives dépendantes du striatum	22
1.5. Modélisation de la MH	25
<b>1.5.1. Modèles murins</b>	<b>25</b>
1.5.1.a. Expression du fragment N-terminal de la huntingtine	26
1.5.1.b. Expression de la forme complète de la huntingtine humaine	28
1.5.1.c. Des rats pour étudier la MH	30
<b>1.5.2. Modèles in vitro : iPSCs</b>	<b>30</b>
<b>2. Mécanismes moléculaires et pathogénèse de la MH</b>	<b>33</b>
2.1. La huntingtine	33
<b>2.1.1. Biologie et physiologie de la huntingtine</b>	<b>33</b>
2.1.1.a. Domaines d'interaction de la huntingtine	33
2.1.1.b. Les modifications post-traductionnelles de la huntingtine	33
2.1.1.c. Interactions et rôles physiologiques de la huntingtine	35



<b>2.1.2. La huntingtine mutée</b>	<b>36</b>
2.1.2.a. De la fragmentation à l'agrégation	36
2.1.2.b. Huntingtine mutée : Perte de fonction ou gain de fonction toxique ?	39
2.2. Protéotoxicité cytoplasmique de la huntingtine mutée	41
<b>2.2.1. Altération de la protéolyse intracellulaire</b>	<b>41</b>
2.2.1.a. L'autophagie	41
2.2.1.b. Le système UPS	43
<b>2.2.2. Stress du réticulum endoplasmique</b>	<b>44</b>
<b>2.2.3. Altération du métabolisme énergétique</b>	<b>45</b>
2.2.3.a. Le dysfonctionnement mitochondrial	45
2.2.3.b. Le stress oxydatif	47
2.3. Protéotoxicité nucléaire de la huntingtine mutée	48
<b>2.3.1. Dérégulations transcriptionnelles</b>	<b>48</b>
2.3.1.a. Signature transcriptionnelle des ARNm du striatum	48
2.3.1.b. Signature transcriptionnelle des ARNs non codants du striatum	51
2.3.1.c. Conséquences fonctionnelles de la dérégulation transcriptionnelle	52
<b>2.3.2. Interaction de la huntingtine mutée avec les acteurs de la transcription</b>	<b>53</b>
<b>2.3.3. Altérations épigénétiques</b>	<b>56</b>
2.3.3.a. Dynamique épigénétique et transcription	56
2.3.3.b. Neuroépigénétique et plasticité	59
2.3.3.c. Caractéristiques de l'épigénome dans la MH	60
<b>3. Les stratégies thérapeutiques pour la maladie de Huntington</b>	<b>64</b>
3.1. Les traitements symptomatiques	64
3.2. Les traitements curatifs	65
<b>3.2.1. Les thérapies cellulaires</b>	<b>65</b>
<b>3.2.2. La thérapie génique</b>	<b>66</b>
3.2.2.a. Les thérapies ciblant l'ARN de la huntingtine mutée	67
3.2.2.b. Les thérapies ciblant l'ADN de la huntingtine mutée	69
<b>3.2.3. Les thérapies pharmacologiques</b>	<b>71</b>
3.2.3.a. Les thérapies ciblant la protéotoxicité cytoplasmique de la huntingtine	72
3.2.3.b. Les thérapies ciblant la protéotoxicité nucléaire de la huntingtine	74
<b>Objectifs de la thèse</b>	<b>81</b>
<b>Matériel &amp; méthodes</b>	<b>85</b>
<b>1. Animaux</b>	<b>87</b>
<b>2. Traitement pharmacologique des souris</b>	<b>88</b>
2.1. Groupes expérimentaux	88

2.2.	Protocole du traitement pharmacologique des souris	88
<b>3.</b>	<b>Analyses comportementales</b>	<b>89</b>
3.1.	Evaluation des performances cognitives	90
<b>3.1.1.</b>	<b>Le labyrinthe en double-H</b>	<b>90</b>
3.1.1.a.	Evaluation de la mémoire procédurale des souris	90
3.1.1.b.	Evaluation de la flexibilité cognitive	93
<b>3.1.2.</b>	<b>La piscine de Morris</b>	<b>94</b>
<b>3.1.3.</b>	<b>La tâche de localisation d'objets</b>	<b>96</b>
3.2.	Evaluation des performances motrices	98
<b>3.2.1.</b>	<b>Rotarod</b>	<b>98</b>
<b>3.2.2.</b>	<b>Test de franchissement de la barre</b>	<b>99</b>
<b>3.2.3.</b>	<b>Actographie</b>	<b>99</b>
3.3.	Evaluation de l'anxiété	99
<b>4.</b>	<b>Prélèvement des tissus</b>	<b>100</b>
4.1.	Dissection des cerveaux	100
4.2.	Fixation des cerveaux	101
<b>5.</b>	<b>Analyses histologiques</b>	<b>101</b>
5.1.	La stéréologie	101
5.2.	Coupes au cryostat	102
5.3.	Immunohistochimie sur coupes flottantes	103
5.4.	Comptage neuronal par stéréologie	105
<b>5.4.1.</b>	<b>Principe du dissecteur optique</b>	<b>105</b>
<b>5.4.2.</b>	<b>Paramètres du comptage</b>	<b>106</b>
<b>6.</b>	<b>Analyses moléculaires de l'expression protéique</b>	<b>107</b>
6.1.	Extraction des protéines totales	107
6.2.	Western blot	107
<b>7.</b>	<b>Analyses moléculaires de l'expression génique</b>	<b>109</b>
7.1.	Extraction des ARNs totaux	109
7.2.	Séquençage des ARNs et analyse des résultats	110
<b>8.</b>	<b>Analyses épigénétiques</b>	<b>111</b>
8.1.	Préparation des tissus pour le ChIP	111
8.2.	Protocole de ChIP	111
8.3.	Analyse des données ChIP-seq	112
<b>9.</b>	<b>Analyses statistiques</b>	<b>112</b>
	<b>Résultats</b>	<b>113</b>

<b>1.</b>	<b>Corrélation entre les altérations comportementales et moléculaires chez les souris R6/1115</b>	
1.1.	Les altérations comportementales des souris R6/1 _____	115
1.1.1.	<b>Caractérisation du phénotype cognitif des souris dans le labyrinthe en double-H _____</b>	<b>116</b>
1.1.1.a.	Caractérisation du comportement des souris WT dans le labyrinthe en double-H ____	116
1.1.1.b.	Altération précoce de la mémoire procédurale des souris R6/1 _____	119
1.1.1.c.	Altération de la flexibilité cognitive _____	123
1.1.2.	<b>Evaluation des performances cognitives dépendantes de l'hippocampe _____</b>	<b>125</b>
1.1.3.	<b>Evaluation des performances motrices des souris R6/1 _____</b>	<b>127</b>
1.1.4.	<b>Résumé des altérations comportementales des souris R6/1 _____</b>	<b>129</b>
1.2.	Altération fonctionnelle des neurones du striatum des souris R6/1 _____	130
1.2.1.	<b>Expression des protéines Egr1 et Fos dans le striatum des souris WT et R6/1 _____</b>	<b>131</b>
1.2.2.	<b>Expression des protéines Egr1 et Fos dans l'hippocampe des souris WT et R6/1 _____</b>	<b>133</b>
1.3.	Dynamique du transcriptome des souris WT et R6/1 au cours du processus de mémorisation	136
1.3.1.	<b>Analyse de la qualité des échantillons séquencés _____</b>	<b>136</b>
1.3.2.	<b>Caractérisation du transcriptome du striatum et de l'hippocampe chez les souris WT et R6/1 en condition basale, lors de la formation, lors du rappel d'une mémoire procédurale _____</b>	<b>137</b>
1.3.2.a.	Altération préférentielle du transcriptome striatal des souris R6/1 par rapport au transcriptome de l'hippocampe _____	137
1.3.2.b.	Altération des régulations transcriptionnelles striatales induites par le processus de mémorisation chez les souris R6/1 _____	140
1.3.2.c.	Induction du transcriptome de l'hippocampe chez les souris WT et R6/1 _____	145
1.3.3.	<b>Evaluation de l'engagement du striatum et de l'hippocampe des souris WT et R6/1 dans le labyrinthe en double-H _____</b>	<b>146</b>
<b>2.</b>	<b>Caractérisation de la relation de cause à effet entre les altérations comportementales et moléculaires des souris R6/1 _____</b>	<b>148</b>
2.1.	Evaluation de l'effet comportemental du traitement CSP-TTK21 _____	149
2.1.1.	<b>Amélioration partielle de la mémoire procédurale des souris R6/1 CSP-TTK21 _____</b>	<b>150</b>
2.1.2.	<b>Effet de CSP-TTK21 sur le phénotype moteur des souris R6/1 _____</b>	<b>154</b>
2.1.3.	<b>Evaluation de l'effet de CSP-TTK21 sur le phénotype global des souris R6/1 _____</b>	<b>156</b>
2.1.3.a.	Absence d'effet sur l'anxiété des souris R6/1 _____	156
2.1.3.b.	Absence d'effet sur le poids des souris R6/1 _____	157
2.2.	Evaluation des conséquences fonctionnelles du traitement CSP-TTK21 _____	158
2.2.1.	<b>Effet de la molécule CSP-TTK21 sur l'expression des protéines Egr1 et Fos dans le striatum des souris R6/1 _____</b>	<b>158</b>
2.2.2.	<b>Effet du traitement CSP-TTK21 sur les agrégats de huntingtine mutée dans le striatum des souris R6/1 _____</b>	<b>160</b>
2.3.	Evaluation de l'effet du composé CSP-TTK21 au niveau transcriptomique _____	161

2.3.1.	<i>Analyse de la qualité des échantillons séquencés</i>	161
2.3.2.	<i>Effet de CSP-TTK21 sur les signatures transcriptomiques du striatum des souris R6/1</i>	163
2.3.3.	<i>Effet du composé CSP-TTK21 sur le transcriptome striatal des souris R6/1</i>	166
2.4.	Evaluation de l'effet de la molécule CSP-TTK21 au niveau épigénétique	171
2.4.1.	<i>Analyse de la qualité des échantillons séquencés</i>	171
2.4.2.	<i>Effet de CSP-TTK21 sur l'acétylation de H3K27 dans le striatum des souris R6/1</i>	171
<b>Discussion</b>		<b>175</b>
1.	Caractérisation de la mémoire procédurale des souris WT et R6/1 dans le labyrinthe en double-H	177
2.	Signatures transcriptionnelles du striatum induites lors de la formation d'une mémoire procédurale	184
3.	Evaluation de l'effet de la molécule CSP-TTK21 sur le transcriptome striatal et la mémoire procédurale des souris R6/1	187
<b>Conclusion &amp; perspectives</b>		<b>195</b>
<b>Annexes</b>		<b>201</b>
<b>Bibliographie</b>		<b>245</b>



## ..... LISTE DES FIGURES & TABLEAUX .....

### **Introduction**

<u>Figure 1</u> : Corrélation entre la pénétrance de la MH et le nombre de triplets CAG .....	4
<u>Figure 2</u> : Corrélation inverse entre l'âge de début des premiers symptômes et le nombre de CAG ....	5
<u>Figure 3</u> : Anatomie des ganglions de la base .....	8
<u>Figure 4</u> : Structure du striatum chez la Souris.....	9
<u>Figure 5</u> : Cytoarchitecture du striatum chez la Souris .....	10
<u>Figure 6</u> : Connexions neuronales des boucles motrices impliquant le striatum : la voie directe et la voie indirecte .....	11
<u>Figure 7</u> : Neuropathologie de la MH chez l'Homme .....	14
<u>Figure 8</u> : Perturbation progressive des voies directe et indirecte du striatum au cours de la MH ....	19
<u>Figure 9</u> : Illustration des protocoles permettant d'évaluer la mémoire procédurale des modèles murins de la MH .....	23
<u>Figure 10</u> : Représentation schématique de la séquence de la protéine HTT humaine .....	32
<u>Figure 11</u> : Les multiples variants toxiques de la HTT mutée .....	35
<u>Figure 12</u> : Les agrégats de HTT mutée .....	36
<u>Figure 13</u> : Protéotoxicité de la HTT mutée et de ses fragments .....	37
<u>Figure 14</u> : Dysfonctionnement autophagique dans la MH .....	40
<u>Figure 15</u> : Dysfonctionnement du système UPS dans la MH .....	41
<u>Figure 16</u> : Dysfonctionnement mitochondrial dans la MH .....	45
<u>Figure 17</u> : Caractéristiques de la dérégulation transcriptionnelle dans la MH.....	47
<u>Figure 18</u> : Enrichissement spécifique des gènes dérégulés dans les neurones et les cellules gliales du striatum .....	49
<u>Figure 19</u> : Régulation de la transcription des gènes par les enhanceurs .....	50
<u>Figure 20</u> : Exemples des altérations transcriptionnelles dans la MH .....	52
<u>Figure 21</u> : Régulation de la transcription par les modifications épigénétiques de la chromatine .....	54
<u>Figure 22</u> : Dynamique des modifications épigénétiques de la chromatine .....	55
<u>Figure 23</u> : Altération des profils H3K27ac des super-enhancers des gènes striataux dans la MH .....	58
<u>Figure 24</u> : Résumé de l'altération des modifications d'histones et de la méthylation de l'ADN dans les neurones touchés par la HTT mutée .....	60
<u>Figure 25</u> : Illustration des cibles des thérapies géniques dans la MH.....	64
<u>Figure 26</u> : Schéma du principe du système CRISPR/Cas9 .....	67
<u>Figure 27</u> : Inactivation spécifique de l'allèle muté médié par CRISPR/Cas9.....	68
<u>Figure 28</u> : Illustration des cibles pharmacologiques cytoplasmiques testées pour la MH .....	69

### **Matériel et méthodes**

<u>Figure 29</u> : Planning expérimental du traitement pharmacologique des souris avec la molécule CSP-TTK21 et de l'évaluation de son effet comportemental .....	85
<u>Figure 30</u> : Dispositif du labyrinthe en double-H.....	86
<u>Figure 31</u> : Protocole d'étude de la mémoire procédurale des souris dans le labyrinthe en double-H .....	88
<u>Figure 32</u> : Protocole d'étude de la flexibilité cognitive des souris dans le labyrinthe en double-H ....	90
<u>Figure 33</u> : Protocole d'évaluation de la mémoire spatiale des souris en piscine de Morris.....	91

<u>Figure 34</u> : Protocole d'évaluation de la mémoire spatiale des souris dans une tâche de localisation d'objets.....	93
<u>Figure 35</u> : Tests comportementaux évaluant les performances motrices des souris R6/1 .....	94
<u>Figure 36</u> : Evaluation de l'anxiété de souris avec le test de transition clair/obscur .....	96
<u>Figure 37</u> : Dissection des structures cérébrales des souris pour les analyses moléculaires.....	97
<u>Figure 38</u> : Préparation des coupes de cerveaux de souris pour l'immunohistochimie et le comptage par stéréologie .....	99
<u>Figure 39</u> : Exemple de comptage neuronal avec les dissecteurs optiques .....	102

## Résultats

<u>Figure 40</u> : Evaluation des performances des souris WT dans le labyrinthe en double-H.....	114
<u>Figure 41</u> : Evaluation des performances d'apprentissage des souris WT et R6/1 à 11 et 14 semaines dans le labyrinthe en double-H .....	116
<u>Figure 42</u> : Evaluation de la stratégie d'apprentissage utilisée par les souris WT et R6/1 à 11 et 14 semaines dans le labyrinthe en double-H .....	118
<u>Figure 43</u> : Evaluation de la flexibilité cognitive des souris WT et R6/1 dans le labyrinthe en double-H .....	120
<u>Figure 44</u> : Evaluation des performances cognitives dépendantes de l'hippocampe chez les souris WT et R6/1 à 11 et 14 semaines .....	122
<u>Figure 45</u> : Evaluation des performances motrices des souris WT et R6/1 à 11 et 14 semaines.....	124
<u>Figure 46</u> : Plan du prélèvement des tissus pour les analyses histologiques.....	127
<u>Figure 47</u> : Quantification des protéines Egr1 et Fos dans le striatum des souris WT et R6/1, en condition basale et après un apprentissage dans le labyrinthe en double-H.....	128
<u>Figure 48</u> : Quantification des protéines Egr1 et Fos dans l'hippocampe des souris WT et R6/1, en condition basale et après un apprentissage dans le labyrinthe en double-H.....	131
<u>Figure 49</u> : Conditions expérimentales et qualité des échantillons séquencés .....	133
<u>Figure 50</u> : Effet du génotype sur l'expression des gènes dans le striatum et l'hippocampe des souris WT et R6/1.....	134
<u>Figure 51</u> : Effets du processus de mémorisation sur le transcriptome striatal des souris WT, R6/1	138
<u>Figure 52</u> : Effets du processus de mémorisation sur le transcriptome de l'hippocampe des souris WT et R6/1 .....	141
<u>Figure 53</u> : Implication différentielle du striatum et de l'hippocampe des souris WT et R6/1 dans le labyrinthe en double-H .....	143
<u>Figure 54</u> : Schéma de la conception de l'étude permettant d'évaluer l'effet de la molécule CSP-TTK21 sur le phénotype des souris R6/1.....	146
<u>Figure 55</u> : Evaluation de l'effet du traitement CSP-TTK21 sur les performances d'apprentissage des souris R6/1.....	148
<u>Figure 56</u> : Evaluation de l'effet du traitement CSP-TTK21 sur le déficit de mémoire procédurale des souris R6/1.....	150
<u>Figure 57</u> : Evaluation de l'effet du traitement CSP-TTK21 sur les performances motrices des souris R6/1.....	152
<u>Figure 58</u> : Evaluation de l'anxiété des souris WT Saline, R6/1 CSP et R6/1 CSP-TTK21.....	154
<u>Figure 59</u> : Effet du traitement CSP-TTK21 sur le poids des souris R6/1.....	155
<u>Figure 60</u> : Evaluation de l'effet du traitement CSP-TTK21 sur l'expression des protéines Egr1 et Fos dans le striatum des souris R6/1 .....	156

<u>Figure 61</u> : Evaluation de l'effet du traitement CSP-TTK21 sur les agrégats de HTT mutée dans le striatum des souris R6/1 .....	158
<u>Figure 62</u> : Conditions expérimentales et qualité des échantillons de striatum séquencés.....	159
<u>Figure 63</u> : Effet de la molécule CSP-TTK21 sur les signatures transcriptomiques du striatum des souris R6/1 .....	162
<u>Figure 64</u> : Modulation du transcriptome striatal des souris R6/1 CSP-TTK21 en faveur de la survie neuronale .....	163
<u>Figure 65</u> : Modulation du transcriptome striatal des souris R6/1 CSP-TTK21 en faveur d'une activation du métabolisme du cholestérol.....	165
<u>Figure 66</u> : Conditions expérimentales du ChIP-seq et qualité des échantillons séquencés .....	169
<u>Figure 67</u> : Evaluation des changements d'acétylation de H3K27 dans le striatum des souris R6/1 CSP-TTK21.....	171

## **Tableaux**

<u>Tableau I</u> : Exemples de gènes dérégulés dans le striatum Huntington .....	48
<u>Tableau II</u> : Sélectivité et classification des HDACi.....	72
<u>Tableau III</u> : Anticorps primaires et secondaires utilisés pour les immunomarquages.....	100
<u>Tableau IV</u> : Anticorps primaires et secondaires utilisés pour les western blots.....	104
<u>Tableau V</u> : Informations sur le séquençage des ARNs .....	105

## **Annexes**

<u>Annexe 1</u> : Activité locomotrice spontanée des souris WT et R6/1, mâles et femelles, âgées de 14 semaines.....	201
<u>Annexe 2</u> : Quantification des protéines Egr1 et Fos dans le striatum des souris WT et R6/1, mâles et femelles, en condition basale et après un apprentissage dans le double-H.....	202
<u>Annexe 3</u> : Quantification des protéines Egr1 et Fos dans l'hippocampe des souris WT et R6/1, mâles et femelles, en condition basale et après un apprentissage dans le double-H.....	203
<u>Annexe 4</u> : Signatures fonctionnelles des gènes sur- et sous-exprimés dans le striatum et l'hippocampe des souris R6/1.....	204
<u>Annexe 5</u> : Signatures fonctionnelles des gènes sur- et sous-exprimés dans le striatum des souris WT au cours du processus de mémorisation .....	205
<u>Annexe 6</u> : Evaluation de l'effet du traitement CSP-TTK21 sur le phénotype moteur des souris R6/1, mâles et femelles.....	206
<u>Annexe 7</u> : Evaluation de l'anxiété des souris WT Saline, R6/1 CSP et R6/1 CSP-TTK21, mâles et femelles .....	207
<u>Annexe 8</u> : Quantification des protéines Egr1 et Fos dans le striatum des souris WT Saline, R6/1 CSP et R6/1 CSP-TTK21 après le test de rappel dans le labyrinthe en double-H.....	208
<u>Annexe 9</u> : Effet de CSP-TTK21 sur les signatures transcriptomiques du striatum des souris R6/1 ...	209
<u>Annexe 10</u> : Revue collaborative .....	211
<u>Annexe 11</u> : Article collaboratif .....	229





## LISTE DES ABREVIATIONS

<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>ADNc</b>	ADN complémentaire
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique
<b>ARNi</b>	ARN interférent
<b>ARNm</b>	ARN messenger
<b>ARN Pol II</b>	ARN Polymérase II
<b>ASO</b>	Oligonucléotide anti-sens
<b>BAC</b>	Bacterial artificial chromosome
<b>BDNF</b>	Brain-derived neurotrophic factor
<b>BHE</b>	Barrière hémato-encéphalique
<b>Cas9</b>	CRISPR associated protein 9
<b>CBP</b>	CREB-binding protein
<b>ChIP</b>	Chromatin immunoprecipitation
<b>ChIP-seq</b>	Chromatin immunoprecipitation sequencing
<b>CREB</b>	cAMP response element-binding protein
<b>CRISPR</b>	Clustered regulated interspaced short palindromic repeat
<b>CSP</b>	Nanosphère de carbone
<b>DG</b>	Gyrus denté
<b>DLS</b>	Striatum dorsolatéral
<b>DMS</b>	Striatum dorsomédian
<b>DNMT</b>	ADN méthyltransférase
<b>eARN</b>	ARN enhancer
<b>ERAD</b>	Endoplasmic reticulum-associated degradation
<b>FANS</b>	Fluorescent-activated nuclei sorting
<b>FDA</b>	Food and drug administration
<b>GFP</b>	Green fluorescent protein
<b>GPe</b>	Globus pallidus externe
<b>GPI</b>	Globus pallidus interne
<b>GWAS</b>	Genome wide association study
<b>HAT</b>	Histone acétyltransférase
<b>HDAC</b>	Histone désacétylase
<b>HDACi</b>	Inhibiteur d'histone désacétylase
<b>HDM</b>	Histone déméthylase
<b>HEAT</b>	Huntingtine, elongation factor 3, protein phosphatase 2A, TOR1
<b>HMT</b>	Histone méthyltransférase
<b>HTT</b>	Huntingtine
<b>IEG</b>	Gène précoce immédiat
<b>iPSC</b>	Induced pluripotent stem cell

<b>IRMf</b>	Imagerie par résonance magnétique fonctionnelle
<b>KI</b>	Knock-in
<b>KO</b>	Knock-out
<b>LCM</b>	Laser capture microdissection
<b>LXR</b>	Liver X receptors
<b>MH</b>	Maladie de Huntington
<b>miARN</b>	Micro ARN
<b>mPTP</b>	Pore de transition de perméabilité mitochondriale
<b>MSN</b>	Medium-sized spiny neurons
<b>MSN-D1</b>	Neurones moyens épineux exprimant le récepteur D1
<b>MSN-D2</b>	Neurones moyens épineux exprimant le récepteur D2
<b>PAM</b>	Protospacer adjacent motif
<b>PB</b>	Phénylbutyrate
<b>PBS</b>	Phosphate buffered saline
<b>PolyQ</b>	Polyglutamine
<b>PPSE</b>	Potentiel post-synaptique exciteur
<b>PRD</b>	Prolin rich domain
<b>PTM</b>	Modification post-traductionnelle
<b>RAN</b>	Repeat-associated non ATG
<b>RE</b>	Réticulum endoplasmique
<b>REST</b>	RE1-silencing transcription factor
<b>RE1/NRSE</b>	Repressor element 1/ neuron-restrictive silencer element
<b>RISC</b>	RNA-induced silencing complex
<b>RNase H</b>	Ribonucléase H
<b>RNA-seq</b>	RNA-sequencing
<b>Rpm</b>	Rotations par minute
<b>R-O</b>	Responses and outcomes (action dirigée vers un but)
<b>ROS</b>	Dérivés réactifs de l'oxygène
<b>SAHA</b>	Acide subérylanilide hydroxamique
<b>SB</b>	Butyrate de sodium
<b>SCFA</b>	Acides gras à chaîne courte
<b>SERE</b>	Simple Error Ratio Estimate
<b>sgRNA</b>	Single guide RNA
<b>SIRT1</b>	Silent information regulator T1
<b>SNP</b>	Single nucleotide polymorphism
<b>SNr</b>	Substance noire réticulée
<b>Sp1</b>	Specificity protein 1
<b>S-R</b>	Stimuli and responses (association entre un stimulus et une réponse)
<b>STN</b>	Noyau sous-thalamique
<b>TALENS</b>	Transcription activator like effector nucleases
<b>TBP</b>	TATA-binding protein

<b>TET</b>	Ten-eleven-translocation
<b>TRAP</b>	Translating ribosome affinity purification
<b>TSA</b>	Trichostatine A
<b>TSS</b>	Transcription start site
<b>UPS</b>	Ubiquitin-Proteasome system
<b>UPR</b>	Unfolded protein response
<b>VMAT2</b>	Transporteurs vésiculaires de monoamines de type 2
<b>YAC</b>	Yeast artificial chromosome
<b>ZF</b>	Zinc finger
<b>ZFN</b>	Zinc finger nucleases



## ..... AVANT-PROPOS .....

Les premières traces de l'Histoire des neurosciences remontent à l'Égypte ancienne, une époque où le cœur était considéré comme le siège de l'esprit et de l'intelligence. Au cours des siècles, cette vision a changé, bien que des variations familières de ces anciennes croyances subsistent, comme "apprendre quelque chose par cœur". C'est notamment l'étude des fractures du crâne et des blessures à la tête qui a fait émerger les premières indications qu'un dommage cérébral pouvait sous-tendre des symptômes neurologiques. Au fil des siècles, les avancées scientifiques se multiplient, notamment grâce à l'évolution des techniques d'analyse et l'étude de cas pathologiques. En effet, une part importante de la compréhension du fonctionnement cérébral passe par l'analyse de ses dysfonctionnements. Aujourd'hui, avec l'identification des maladies neurodégénératives, les études en neurosciences représentent un enjeu de société majeur pour traiter, retarder et prévenir les pathologies du système nerveux. Ma thèse s'inscrit dans ce contexte, en se focalisant sur l'étude des mécanismes moléculaires sous-jacents aux altérations comportementales dans la maladie de Huntington (MH), une meilleure compréhension de la pathogénèse permettant d'explorer de nouvelles pistes thérapeutiques pour traiter et/ou retarder les symptômes.

La MH est une maladie neurodégénérative qui, à la différence de la maladie d'Alzheimer ou la maladie de Parkinson, a une origine purement génétique. Elle est causée par une expansion anormale de triplets CAG dans le gène codant pour la protéine huntingtine (HTT). Elle se caractérise par une triade de symptômes regroupant des troubles moteurs, cognitifs et psychiatriques. La HTT mutée, qui comporte une expansion de polyglutamines, est particulièrement toxique pour les neurones, ce qui conduit à un dysfonctionnement neuronal et à une dégénérescence (*The Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993*), qui touche préférentiellement les neurones moyens épineux du striatum (*Vonsattel et DiFiglia, 1998*). Le dysfonctionnement neuronal observé dans la MH résulte de nombreux mécanismes pathogéniques, associés notamment à la présence d'agrégats de HTT mutée dans le noyau et le cytoplasme des neurones striataux. Parmi ces mécanismes, ma thèse se focalise sur les dérégulations transcriptionnelles dans le striatum affecté par la mutation de la HTT (*Seredenina et Luthi-Carter, 2012*). En effet, les études transcriptomiques montrent que l'expression des gènes qui déterminent l'identité des neurones striataux (par exemple *Drd1*,

*Drd2*, *Pde10a*, *Darpp32*) sont sous-exprimés dans le striatum des patients et des modèles murins de la MH (Hodges et al., 2006 ; Kuhn et al., 2007 ; Langfelder et al., 2016). La baisse d'expression de ces gènes est corrélée à une baisse d'acétylation des histones, en particulier de l'acétylation de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27ac) (Achour et al. 2015). Cette perte d'acétylation pourrait contribuer aux dérégulations transcriptionnelles et pourrait être liée à la baisse d'activité de l'histone acétyltransferase CBP (*Creb Binding Protein*) qui acétyle H3K27 (Tie et al., 2009) et qui est séquestrée dans les agrégats de HTT mutée (Kazantsev et al., 1999 ; Nucifora et al., 2001).

Etonnamment, le rôle de ces altérations moléculaires dans la mise en place des troubles comportementaux de la MH est encore mal compris. C'est pourquoi, au cours de ma thèse, je me suis intéressée à la corrélation entre ces altérations moléculaires et comportementales, afin de mieux comprendre à quel point les déficits comportementaux dans la MH sont sous-tendus par les dérégulations transcriptionnelles et épigénétiques décrites dans le striatum. J'ai également testé l'effet d'une stratégie thérapeutique ciblant les dérégulations épigénétiques sur la pathogénèse de la MH, une étude qui a permis d'apporter une meilleure compréhension des mécanismes sous-jacents aux troubles comportementaux dans la MH.

La première partie de ma thèse s'attache à présenter les concepts majeurs sur lesquels mes travaux se sont basés. Dans un premier chapitre, je présente les caractéristiques générales de la MH et les modèles utilisés pour son étude. Le deuxième chapitre est focalisé sur les mécanismes pathogéniques de la maladie associés à la mutation de la HTT. Enfin, une description des stratégies thérapeutiques fait l'objet du dernier chapitre de l'introduction. Après une présentation des objectifs de ma thèse et des méthodes utilisées, je rapporte les résultats obtenus, qui s'axent principalement autour de données comportementales chez un modèle murin de la maladie et de données transcriptomiques réalisées notamment sur le striatum de souris contrôles et « Huntington ». Dans la partie suivante, ces résultats sont discutés, avec une présentation des hypothèses émises concernant les mécanismes pathogéniques sous-jacents aux altérations comportementales. Enfin, ma thèse se clôt par une conclusion générale et la présentation des perspectives amenées par ces travaux.

# INTRODUCTION







## 1. LA MALADIE DE HUNTINGTON

La maladie de Huntington (MH) est une maladie neurodégénérative d'origine génétique, à transmission autosomique dominante. Sa prévalence est d'environ 1 individu sur 10 000 et concerne près de 18 000 personnes en France, dont 12 000 porteurs asymptomatiques du gène muté et 6000 cas déclarés.

Pendant de nombreux siècles, la MH, autrefois appelée « chorée » du grec « *khoreia* » (la danse) évoquant les mouvements incontrôlés des personnes malades, a été ignorée car associée à des atteintes différentes ou considérée dans un cadre religieux plutôt que médical. L'histoire médicale de la chorée commence en Allemagne vers l'an mille, avec une étrange épidémie caractérisée par un besoin irrésistible de danser. Les mouvements involontaires, les états psychiques (vertiges, hallucinations) et les cris des « danseurs » laissaient penser qu'ils étaient possédés et jusqu'au XV<sup>ème</sup> siècle, exorcismes et processions étaient fréquemment pratiqués sur ces personnes.

### 1.1. De la chorée à la MH

En 1872, le jeune médecin Georges Huntington publie un article, « On Chorea » (Huntington, 2003) dans lequel il définit la chorée comme des contractions involontaires et des spasmes touchant les muscles volontaires. Il décrit également une forme de chorée particulière qu'il a pu observer essentiellement dans l'est de Long Island. Il caractérise cette forme de la maladie en trois points :

- Une nature héréditaire : « *When either or both the parents have shown manifestations of the disease [...] one or more of the offspring almost invariably suffer from the disease.* » (Huntington, 2003)
- Une tendance à la folie : « *The tendency to insanity, and sometimes that form of insanity which leads to suicide, is marked. I know of several instances of suicide of people suffering from this form of chorea, or who belonged to families in which the disease existed.* » (Huntington, 2003)
- Une manifestation à l'âge adulte : « *I do not know of a single case that has shown any marked signs of chorea before the age of thirty or forty years, while those who*

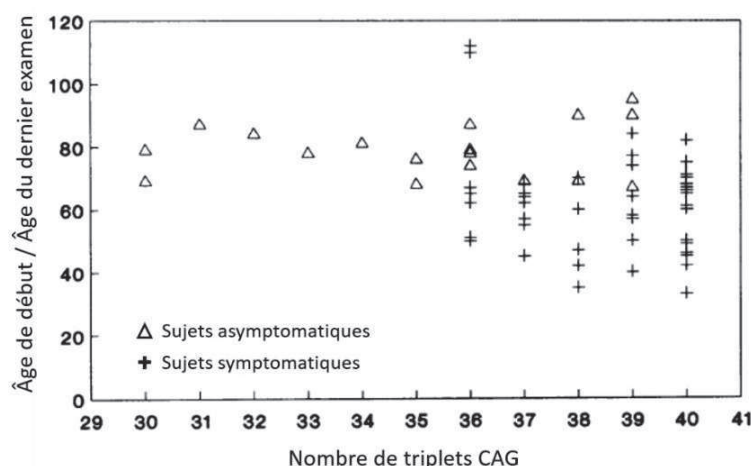
*pass the fortieth year without symptoms of the disease, are seldom attacked.* »  
(Huntington, 2003)

En 1983, le gène associé à la MH a été localisé sur le chromosome 4 (Gusella et al., 1983). Dix ans plus tard, les travaux du Huntington's Disease Collaborative Research Group ont permis d'identifier ce gène, appelé *IT15* (*Interesting Transcript 15*) autrefois et *HTT* aujourd'hui, et de déterminer la nature de la mutation à l'origine de la pathologie.

## 1.2. La MH, une maladie génétique

### 1.2.1. La répétition de triplets CAG

La mutation à l'origine de la MH est une expansion anormale de codons CAG dans l'exon 1 du gène *HTT*, codant pour une protéine appelée Huntingtine (HTT). La taille de cette répétition polymorphe de triplets CAG a été déterminée chez des personnes saines et atteintes de la MH et très rapidement, une corrélation génotype-phénotype a été soulevée (Andrew et al., 1993; Duyao et al., 1993; Snell et al., 1993) : l'expansion des personnes saines ne dépasse pas 35 CAG en moyenne, tandis que celle des patients comporte plus de 40 CAG (Figure 1). En effet, au-delà de ce seuil, la pénétrance de la maladie est complète. En revanche une personne avec une expansion comprise entre 35 et 40 CAG ne développe pas obligatoirement la MH, mais le risque est fortement augmenté (Figure 1) (Rubinsztein et al., 1996).



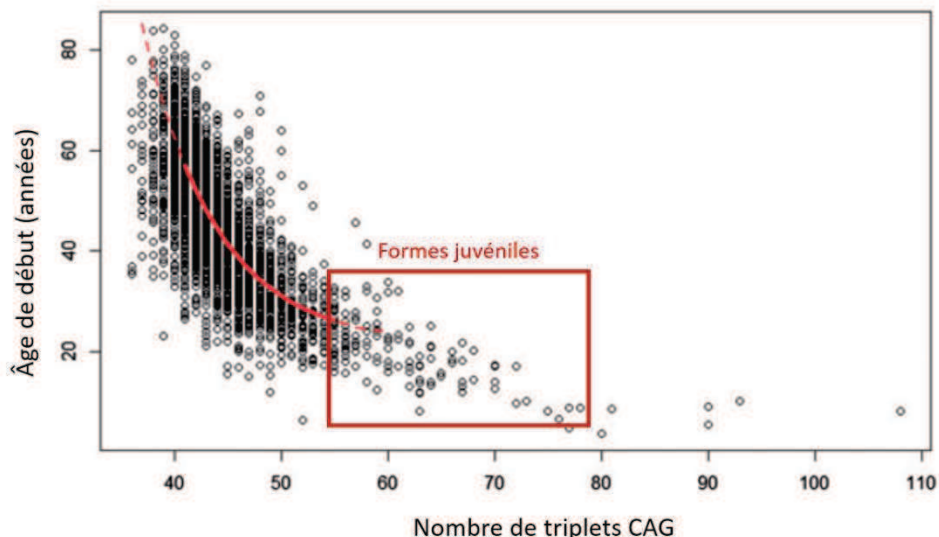
**Figure 1 : Corrélation entre la pénétrance de la MH et le nombre de triplets CAG.**

En dessous de 35 répétitions, l'ensemble des cas observés sont asymptomatiques à l'âge de leur dernier examen médical tandis qu'avec 40 CAG l'ensemble des individus développent des symptômes de la MH. Entre 35 et 40 CAG la pénétrance est incomplète, certaines personnes développent la maladie, d'autres restent asymptomatiques. D'après Rubinsztein et al., 1996.

## Introduction

La taille de l'expansion de CAG est également un facteur déterminant de l'âge de début de la maladie. La MH se déclenche généralement à l'âge adulte vers 40 ans. Cependant, le nombre de triplets CAG est fortement corrélé à l'âge de début des premiers symptômes ; ainsi, plus le nombre de CAG est élevé plus la maladie risque de démarrer précocement (Figure 2). Il existe notamment une forme juvénile de la MH qui se déclenche vers l'adolescence et qui est souvent associée à une expansion de plus de 55 CAG (Figure 2). Cette forme de la maladie est rare et représente moins de 10% des cas.

Plusieurs modèles statistiques ont été créés pour estimer l'âge de début des premiers symptômes en fonction du nombre de CAG (Pour revue : Langbehn et al., 2010). En revanche, cette corrélation ne représente qu'environ 56% de la variation de l'âge d'apparition des premiers symptômes (Gusella et al., 2014). En effet, il existe une variabilité individuelle importante : deux personnes ayant le même nombre de CAG ne développeront pas forcément la maladie au même âge. Plusieurs études montrent que l'âge de début de la MH peut être avancé ou retardé en fonction de l'instabilité de la répétition, de facteurs génétiques ou encore de facteurs environnementaux (Wexler, 2004). De façon surprenante, l'espérance de vie, du diagnostic à la mort, est comparable entre les patients et semble donc indépendante de la taille de la répétition de CAG (Gusella et al., 1996).



**Figure 2 : Corrélation inverse entre l'âge de début des premiers symptômes et le nombre de CAG.**

Plus le nombre de CAG est important plus la maladie va apparaître précocement. La majeure partie des patients comportent une expansion autour de 40 CAG et développent la maladie vers 40 ans. Certains cas de MH démarrent plus tôt, vers 20 ans, et sont associés à une expansion de plus de 55 CAG. (D'après Holmans et al., 2017 ; N=360 individus)

### 1.2.2. [Une expansion particulièrement instable](#)

Plusieurs études montrent que la répétition de triplets CAG est particulièrement instable dans le gène *HTT* muté et que cette instabilité augmente avec la longueur de la répétition (Wheeler et al., 2007). Celle-ci est généralement modifiée d'un seul à quelques triplets avec, de façon prédominante, une augmentation de sa taille.

L'instabilité augmente particulièrement lors de la transmission intergénérationnelle, particulièrement paternelle, on parle alors d'instabilité gamétique. En effet, certains hommes présentent une prédisposition à l'instabilité de la répétition lors de la spermatogénèse (Wheeler et al., 2007). Celle-ci est à l'origine du phénomène « d'anticipation » observé dans les familles Huntington (Andrew et al., 1993) : l'expansion de CAG a tendance à augmenter en taille au cours des générations. Or, sa taille étant inversement corrélée à l'âge de début de la maladie, la MH a tendance à se déclarer plus précocement au cours des générations successives.

L'expansion de CAG peut également s'agrandir au niveau somatique au cours du vieillissement des tissus, c'est l'instabilité somatique. Cette dernière, présente dans plusieurs tissus dont le cerveau, pourrait jouer un rôle important dans la pathogénèse de la MH et serait donc susceptible de l'accélérer (Swami et al., 2009).

### 1.2.3. [Des gènes modificateurs](#)

Des études montrent qu'une partie importante de la variabilité individuelle est héréditaire (Djoussé et al., 2003; Wexler, 2004). En d'autres termes, elle est attribuée à une autre variation génétique dont les conséquences fonctionnelles entraînent une modification de l'issue des processus pathogéniques associés à la mutation du gène *HTT*.

Afin de comprendre l'origine de cette variabilité héréditaire, des études d'association pangénomique (GWAS - *Genome Wide Association Study*) ont été réalisées sur plusieurs cohortes d'individus sains et malades en corrélant leurs génotypes et phénotypes. Ces études permettent d'analyser les variations génétiques entre les personnes saines et porteuses de la mutation en séquençant leur ADN, et en effectuant un suivi phénotypique régulier. L'objectif consiste à identifier des variants génétiques, c'est-à-dire des polymorphismes nucléotidiques (*Single Nucleotide Polymorphism* - SNP) associés à des gènes impliqués dans la pathogénèse.

## Introduction

Ces gènes, aussi appelés gènes modificateurs, pourraient affecter le phénotype ou l'expression d'autres gènes et, par conséquent, être impliqués dans le retardement ou l'accélération du début de la MH.

En 2015, l'étude GWA du Consortium GeM-HD (Genetic Modifiers of Huntington's Disease) et de leurs collaborateurs (The Massachusetts HD Center Without Walls -MaHDC-, European Huntington's Disease Network -EHDN-) a analysé la différence entre l'âge réel et l'âge prédit de début des symptômes d'environ 4000 patients Huntington. Trois *loci* significativement associés à une modification de l'âge d'apparition de la MH ont été identifiés (GeMHD, 2015).

De même, un *locus* sur le chromosome 8 a été associé à une accélération de 1,6 ans de l'apparition des premiers symptômes de la maladie. Ce SNP pourrait correspondre à deux gènes candidats : *RRM2B* (*p53-inducible ribonucleotide reductase M2 B*), codant pour une sous-unité d'une enzyme associée aux dommages de l'ADN, et *UBR5* codant pour un domaine de l'ubiquitine-protéine ligase E3 (GeMHD, 2015).

Sur le chromosome 15, un *locus* a été identifié avec deux variants possibles, l'un associé à une accélération de 6,1 ans de la pathologie et l'autre à un retard de 1,4 ans. Ces polymorphismes sont retrouvés au niveau du gène *FAN1* (*Fanconi anemia FANCD1/FANCD2-associated [endo] nuclease 1*), codant pour une enzyme impliquée dans les mécanismes de réparation de l'ADN (GeMHD, 2015). *FAN1* semblerait modifier le déclenchement de la pathogénèse en améliorant la stabilité de l'expansion de CAG (Goold et al., 2019).

Enfin, un autre SNP a été détecté sur le chromosome 3, à côté du gène *MLH1* (*mutL homolog 1*) (GeMHD, 2015; Lee et al., 2017). Ce gène est connu pour son implication dans la réparation des mésappariements de l'ADN et dans l'instabilité somatique de l'expansion de CAG (Pinto et al., 2013). Ce variant semble diminuer l'activité de la protéine MLH1, entraînant une réduction de l'expansion de triplets CAG et un délai de déclenchement de la pathologie de 0,7 an (Lee et al., 2017).

De façon globale, les mécanismes associés à la réparation de l'ADN semblent pouvoir influencer l'âge d'apparition des premiers symptômes de la maladie en modifiant la stabilité de l'expansion de triplets CAG du gène *HTT*.

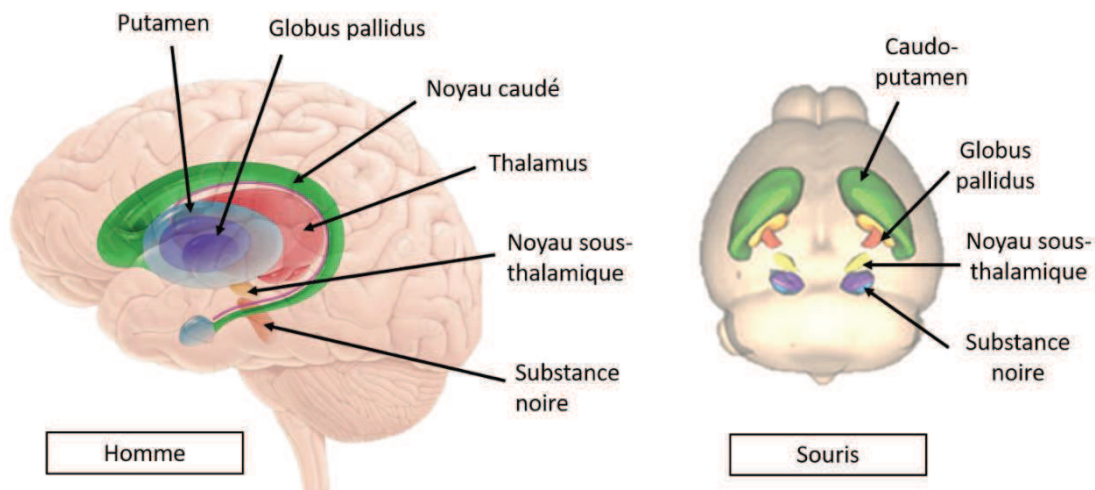
### 1.3. Neuropathologie de la MH

La HTT est une protéine exprimée de façon ubiquitaire, mais sa mutation semble affecter particulièrement le cerveau. Certaines structures cérébrales telles que le striatum, première structure affectée dans la MH, semblent plus vulnérables que d'autres à la HTT mutée.

#### 1.3.1. Le striatum

##### 1.3.1.a. Description générale

Le striatum est le module d'entrée dans les ganglions de la base, un système de noyaux sous-corticaux regroupant le noyau caudé, le putamen, le noyau sous-thalamique, le globus pallidus et la substance noire (Figure 3).



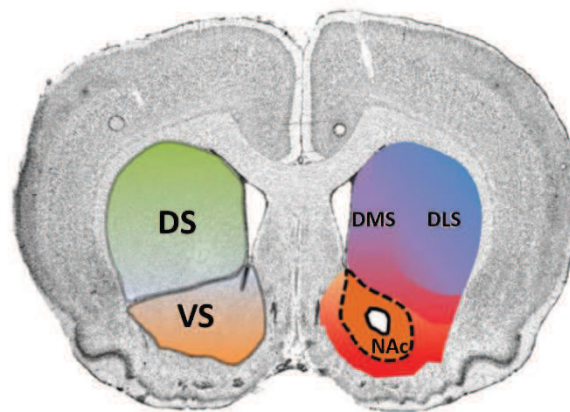
**Figure 3 : Anatomie des ganglions de la base.**

Les ganglions de la base chez l'Homme (à gauche), constitués du striatum (noyau caudé, putamen, noyaux accumbens), du noyau sous-thalamique, du globus pallidus et de la substance noire. Les ganglions de la base chez la souris (à droite) sont constitués du striatum (caudo-putamen), du noyau sous-thalamique, du globus pallidus et de la substance noire.

Chez l'Homme, le striatum est composé du noyau caudé, du putamen et du noyau accumbens. Localisé dans la partie ventrale du cerveau et adjacent aux ventricules latéraux, il constitue le point d'entrée majeur des afférences des ganglions de la base. Le striatum reçoit des afférences glutamatergiques provenant principalement du cortex, mais aussi du thalamus et des structures limbiques comme l'amygdale. Ces entrées sont complétées par des afférences dopaminergiques issues du mésencéphale, qui exercent un contrôle sur le traitement des informations sortant du striatum.

## Introduction

Chez le rongeur, le noyau caudé et le putamen sont fusionnés en une seule et même structure, le caudé-putamen ou caudo-putamen ([Figure 3](#)). Sur la base de la diversité des afférences, le striatum peut être divisé en une partie dorsale correspondant au caudé-putamen et une partie ventrale constituée du noyau accumbens ([Figure 4](#)). Le striatum ventral est impliqué dans le système de récompense et les processus motivationnels, tandis que le striatum dorsal est impliqué dans le contrôle moteur et la cognition (Graybiel et al., 1994; Broadbent et al., 2007; Grahn et al., 2008; Burton et al., 2015). La partie dorsale du striatum peut elle-même être subdivisée virtuellement en fonction de son hétérogénéité fonctionnelle en une partie dorsolatérale (DLS) et dorsomédiane (DMS), correspondant respectivement au putamen et noyau caudé des primates ([Figure 4](#)).



**Figure 4 : Structure du striatum chez la Souris.**

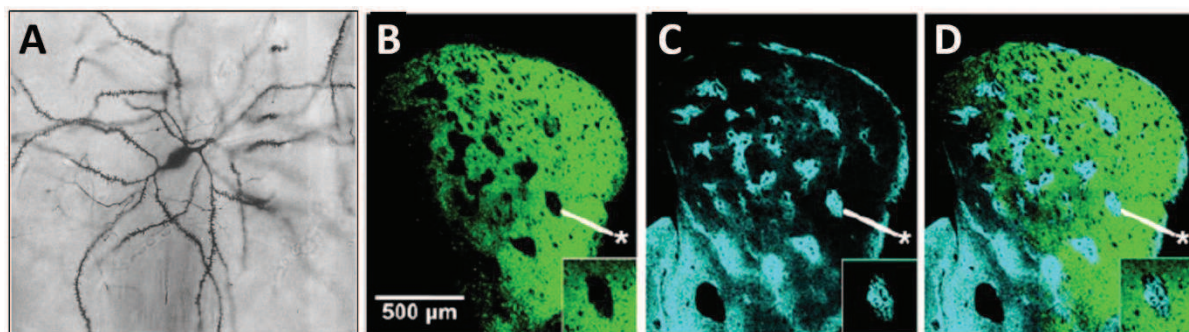
Le striatum est divisé en une partie dorsale (DS) qui elle-même est composée du striatum dorsomédian (DMS) et dorsolatéral (DLS), et une partie ventrale (VS) composée du noyau accumbens (NAc).

Au niveau cytoarchitectural, le striatum est constitué majoritairement de neurones moyens épineux (MSNs - *Medium Spiny Neurons*) GABAergiques, comportant un soma de 20 à 25 $\mu$ m de diamètre et une arborisation dendritique dense et riche en épines dendritiques ([Figure 5A](#)). 5 à 10% de la population cellulaire du striatum est également constituée plusieurs catégories d'interneurones (Kawaguchi et al., 1995; Oorschot, 2013) : des interneurones cholinergiques de grande taille (soma de 20-40 $\mu$ m de diamètre) et sans épines dendritiques et des interneurones GABAergiques également dépourvus d'épines dendritiques, divisés en plusieurs catégories selon leurs propriétés neurochimiques. Ainsi, les interneurones GABAergiques expriment soit la parvalbumine, soit le neuropeptide Y et la somatostatine, soit la calrétinine.



## Introduction

Au niveau neurochimique, des études ont établi que l'organisation du striatum était hétérogène, avec des compartiments différents, les striosomes (ou patches) et la matrice (Figure 5B,C,D). Il est bien connu que ces compartiments diffèrent dans l'expression de marqueurs neurochimiques : les striosomes sont caractérisés entre autres par une forte expression de récepteurs opioïdes  $\mu$  et de substance P. La matrice extrastriosomale quant à elle, est enrichie en calbindine, somatostatine, enképhaline et en marqueurs cholinergiques tels que l'acétylcholinestérase (Graybiel and Ragsdale, 1978; Gerfen et al., 1987; Holt et al., 1997; Brimblecombe and Cragg, 2017). La signification de cette compartimentation est encore mal comprise, mais des études ont suggéré que ces deux compartiments présenteraient également des différences en termes de connectivité anatomique. L'amygdale et le cortex préfrontal seraient reliés aux striosomes, tandis que la matrice recevrait des informations issues principalement du cortex sensorimoteur. Chez le rongeur, les neurones des striosomes projettent essentiellement vers la substance noire compacte et ceux de la matrice vers la substance noire réticulée (Pour revue : Gerfen, 1992; Crittenden et al., 2016).



**Figure 5 : Cytoarchitecture du striatum chez la Souris.**

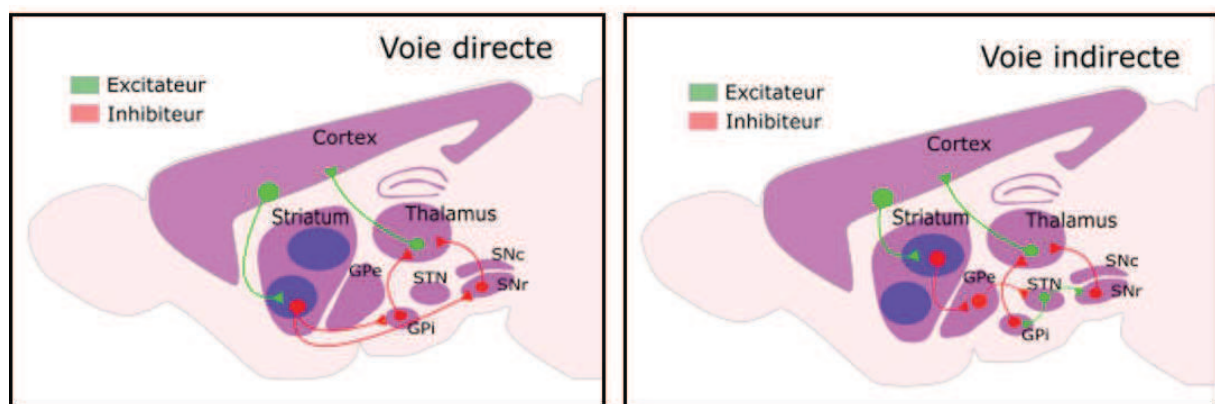
(A) Neurone moyen épineux, type cellulaire dominant dans le striatum, révélé par imprégnation de Golgi (Smith and Bolam, 1990). (B-D) Images confocales d'une coupe de striatum d'une souris transgénique exprimant un marquage fluorescent dans la matrice (B), marquée par un anticorps reconnaissant les récepteurs  $\mu$  des striosomes (C). (D) Superposition des marquages de la matrice (vert) et des striosomes (bleu) du striatum. Des exemples de striosomes sont indiqués par l'étoile blanche (\*) (Crittenden et al., 2016).

### 1.3.1.b. Connectivité du striatum

Des études de traçage, d'électrophysiologie chez l'animal et d'imagerie chez l'Homme ont conduit à déterminer la connectivité anatomique et fonctionnelle du striatum. Plusieurs boucles de connections anatomiques ont été identifiées, par exemple : une boucle limbique entre le striatum ventral et le cortex préfrontal pour les informations émotionnelles et motivationnelles, une boucle associative entre le striatum dorsal, le cortex préfrontal et les aires motrices traitant les informations cognitives ou encore une boucle sensorimotrice

## Introduction

impliquant le striatum dorsal, les aires motrices et le cortex somatosensoriel (Alexander, 1986; Alexander and Crutcher, 1990; Parent, 1990; Haber et al., 2000; Grahn et al., 2008; Devan et al., 2011). Cette dernière est particulièrement bien décrite ; elle est activée en permanence pour adapter la stratégie du mouvement et est altérée dans des pathologies caractérisées par des dysfonctionnements moteurs telles que la MH ou encore la maladie de Parkinson. Cette boucle, tout comme les autres, regroupe deux voies parallèles aux influences opposées sur les noyaux de sortie des ganglions de la base (Alexander and Crutcher, 1990). Ces voies, l'une directe et l'autre indirecte, prennent naissance dans le striatum et impliquent deux catégories de MSNs, divisés en fonction de leurs projections et des récepteurs qu'ils expriment.



**Figure 6 : Connexions neuronales des boucles motrices impliquant le striatum : les voies directe et indirecte.** Le cortex projette *via* des connexions excitatrices sur le striatum (Str), qui sont ensuite transférées sur les structures de sortie des ganglions de la base, le globus pallidus interne (GPi) et la substance noire réticulée (SNr). Ces projections se font *via* deux voies : une projection directe inhibitrice du striatum vers les GPi/SNr (voie directe) et une voie indirecte impliquant une projection inhibitrice du striatum vers le globus pallidus externe (GPe) qui est transmise ensuite au noyau sous-thalamique (STN) qui lui-même envoie des projections excitatrices sur le GPi et la SNr. Les afférences inhibitrices du GPi et de la SNr projettent sur le thalamus, d'où les informations sont ensuite transmises au cortex *via* des projections excitatrices (Figure : Rafael Alcalá Vida).

Premièrement, la voie directe implique des MSNs qui, en plus des récepteurs glutamatergiques, muscariniques et GABAergiques, expriment les récepteurs dopaminergiques D1 ainsi que deux neuropeptides, la substance P et la dynorphine. Ces MSNs exprimant le récepteur D1 projettent sur les noyaux de sortie des ganglions de la base, la substance noire réticulée (SNr) et le segment interne du globus pallidus (GPi) (Figure 6). Ces afférences GABA/Substance P, en désinhibant les cibles thalamiques, facilitent l'exécution du mouvement volontaire (Alexander and Crutcher, 1990; Devan et al., 2011).

Deuxièmement, la voie indirecte implique une population de MSNs qui expriment les récepteurs dopaminergiques D2 et adénergique A2A ainsi que la Leu- et la Met-

## Introduction

enképhaline, en plus des récepteurs glutamatergiques, muscariniques et GABAergiques. Les efférences GABA/enképhalines de ces MSNs exprimant le récepteur D2 projettent d'abord sur le segment externe du globus pallidus (GPe) *via* une voie GABA/enképhaline, puis sur le noyau sous-thalamique *via* une voie purement GABAergique, et enfin vers les noyaux de sortie *via* une voie glutamatergique excitatrice (Figure 6). L'activation de cette voie indirecte supprime l'activité du GPe, qui désinhibe alors le noyau sous-thalamique et active les noyaux de sortie excitateurs, entraînant une inhibition des cibles thalamiques et une répression des mouvements volontaires (Alexander and Crutcher, 1990; Devan et al., 2011).

### 1.3.1.c. *Striatum dorsal et cognition*

Historiquement, le striatum a beaucoup été étudié pour son implication dans différents aspects du contrôle moteur, qui se trouve altéré dans plusieurs pathologies neurologiques. Plus récemment, par l'étude des boucles cortico-striatales notamment, d'autres aspects des fonctions du striatum ont été intégrées, particulièrement son rôle dans les mécanismes de prise de décision basée sur des processus affectifs ou de récompense (Pour revue : Grahn et al., 2008; Balleine and O'Doherty, 2010; Devan et al., 2011). Les performances, lors de ces actions dirigées vers une récompense, reflètent l'interaction de deux processus d'apprentissage différents : un contrôlant l'acquisition d'une action dirigée vers un but et l'autre l'acquisition d'une habitude. Dans le cas d'un comportement dirigé vers un but, le choix de l'action est régi par une association entre l'action et sa conséquence (R-O, *responses and outcomes*). Pour l'apprentissage d'une habitude, le choix de l'action est contrôlé par l'association entre un stimulus et une réponse (S-R, *stimuli and responses*). Des études chez le Rat (Dickinson, 1994; Dickinson et al., 1995) et l'Homme (Tricomi et al., 2009) ont montré que lors d'un apprentissage, les performances dépendent d'abord d'une stratégie R-O, mais laissent ensuite place à un apprentissage S-R lorsque celles-ci deviennent plus habituelles, plus routinières.

Les substrats neuronaux de ces processus ont été étudiés chez le rongeur par des lésions des structures d'intérêt (Yin et al., 2005), et chez l'Homme par des expériences d'imagerie (Daw et al., 2006; Tanaka et al., 2008; Gläscher et al., 2009). Ces études ont mis en évidence que le DMS a un rôle crucial dans l'apprentissage et l'expression d'un comportement dirigé vers un but (R-O) chez le rongeur. En revanche, chez l'Homme ce serait la partie ventromédiane du cortex préfrontal et la partie antérieure du noyau caudé qui seraient

## Introduction

impliquées. De même pour l'acquisition des habitudes (S-R), Yin et collaborateurs (2004) ont montré que des rats avec une lésion du DLS maintenaient un comportement R-O même après un entraînement intensif, tandis que les rats contrôles sollicitaient une stratégie S-R, démontrant le rôle crucial du DLS dans l'acquisition des habitudes (Yin et al., 2004). Par ailleurs, chez l'Homme, un apprentissage S-R entraîne une augmentation de l'activité d'une région latérale du striatum, le caudo-ventral putamen (Tricomi et al., 2009).

Enfin, ces processus d'apprentissage ont souvent été considérés comme antagonistes et en compétition. Cependant, plusieurs arguments suggèrent que ces systèmes peuvent également coopérer pour évaluer et sélectionner les actions. La compétition ou la coopération de ces systèmes d'apprentissage ne dépendraient pas uniquement des interactions locales du striatum dorsal mais également des interactions cortico-striatales, cortico-corticales et d'autres structures cérébrales intégrant des composantes telles que les processus motivationnels et émotionnels (Balleine and O'Doherty, 2010).

### 1.3.1.d. *Striatum ventral et cognition*

Le noyau accumbens a souvent été considéré comme un « centre de la récompense » et a été très étudié pour son implication dans les comportements associés à des stimuli appétitifs. Or, plusieurs études ont montré que de nombreux comportements liés à l'obtention de récompenses ne sont pas affectés par une perturbation de son fonctionnement (Corbit et al., 2001; Ito et al., 2004; Castañé et al., 2010; Pour revue : Floresco, 2015). De manière plus générale, le noyau accumbens est référencé comme une « interface limbique-motrice » (Mogenson et al., 1980, 1993) et jouerait un rôle clé dans la sélection des actions, facilitant ainsi le comportement orienté vers un but en le rendant plus efficace (Pour revue : Floresco, 2015). Le noyau accumbens reçoit des afférences glutamatergiques du cortex préfrontal et des régions limbiques (hippocampe, amygdale), qui fournissent différentes informations pour promouvoir des comportements différents. Ces entrées glutamatergiques peuvent ensuite être modulées par des afférences dopaminergiques provenant de l'aire tegmentale ventrale, pour augmenter l'influence des entrées les plus saillantes et supprimer celle des plus faibles (O'Donnell, 2003; Broadbent et al., 2007; Floresco, 2007). Le noyau accumbens serait donc particulièrement impliqué dans les situations où il existe une ambiguïté, lorsqu'un ensemble de stimuli ou d'actions concurrents rendent difficile l'identification de la manière la plus appropriée de diriger un comportement d'approche ou

## Introduction

d'évitement. Le noyau accumbens pourrait moduler la direction et/ou l'intensité du comportement pour augmenter la probabilité que certaines actions soient commises. Cette fonction est probablement associée à ses afférences vers les régions motrices (Zahm and Heimer, 1990; Groenewegen et al., 1999; Floresco, 2015).

Au niveau anatomique, le noyau accumbens est constitué de deux parties, le « core » (noyau) et le « shell » (coquille). Une dichotomie est observée dans la nature de leurs projections et leur diversité cellulaire et neurochimique (Pour revue : Castro and Bruchas, 2019), suggérant une fonction différente du core et du shell dans l'affinement du choix de l'action. En effet, des études montrent que le core joue un rôle plus important dans l'instauration d'un comportement d'approche vis-à-vis des stimuli signalant une récompense, de manière à l'atteindre plus rapidement. En revanche, lorsque la récompense est atteinte ou lorsque le comportement est en route pour l'atteindre, le shell supprime les actions non pertinentes ou non récompensées pouvant nuire à la recherche de l'objectif, de manière à atteindre le but plus efficacement (Stopper and Floresco, 2011; Saunders and Robinson, 2012; Dalton et al., 2014; Floresco, 2015).

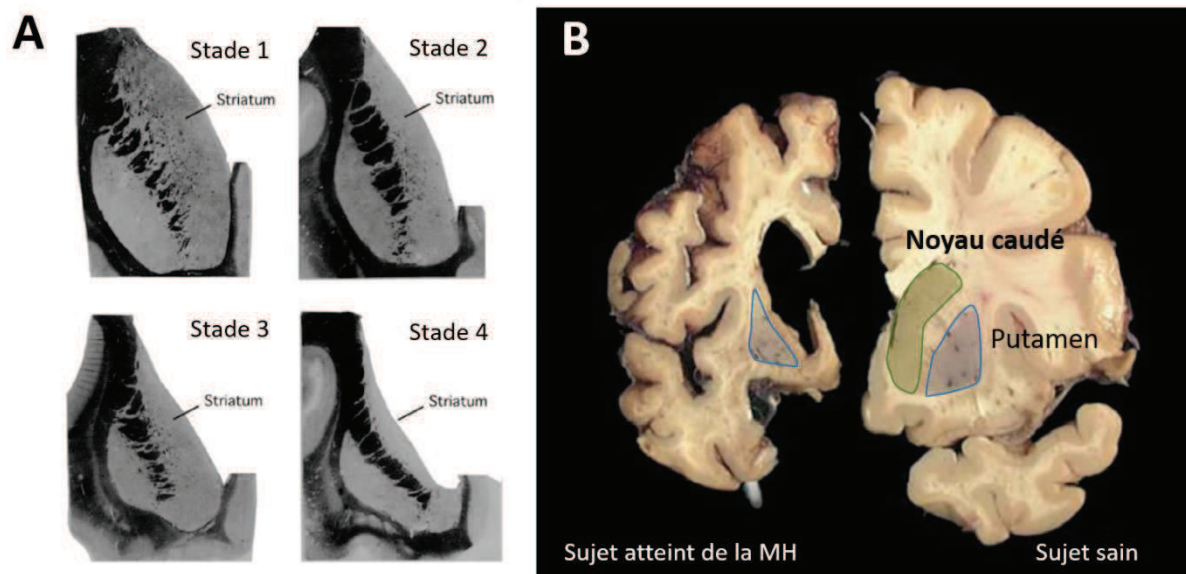
### 1.3.2. [Le striatum dans la MH](#)

#### 1.3.2.a. [L'atrophie striatale](#)

Chez les patients atteints de la MH, la dégénérescence neuronale maximale et l'atrophie la plus sévère sont observées au niveau du noyau caudé et du putamen ([Figure 7](#)). De plus, l'atrophie striatale corrèle très bien avec la progression des symptômes de la MH et est détectable de façon très précoce, bien avant le début des premiers symptômes (Tabrizi et al., 2013). Une classification des différents grades neuropathologiques a été réalisée sur cette base pour évaluer les différents stades de la maladie par le neuropathologiste Jean-Paul Vonsattel et ses collaborateurs ([Figure 7A](#)). Cette classification comporte 5 stades, pondérés de 0 à 4 selon le degré de sévérité de l'atteinte, en se basant sur des critères macroscopiques et microscopiques (Vonsattel et al., 1985). Ainsi les patients au stade 0 ne présentent aucune altération associée à la MH. Au stade 1, les patients présentent des changements anatomopathologiques à l'échelle microscopique, avec une astrogliose modérée au niveau de la partie médiane de la tête du noyau caudé. Aux stades 2 et 3, l'atrophie striatale est de plus en plus marquée avec en parallèle une dégénérescence neuronale jusqu'à atteindre 95% de

## Introduction

mort neuronale au stade 4, lorsque le noyau caudé et le putamen apparaissent presque entièrement atrophiés (Vonsattel et al., 1985).



**Figure 7 : Neuropathologie de la MH chez l'Homme.**

(A) La MH est caractérisée par une atrophie préférentielle du striatum, qui progresse au cours de la pathologie selon les stades définis par Vonsattel en 1985. (B) Coupes coronales d'un cerveau sain et d'un patient atteint de la MH illustrant l'atrophie du striatum (noyau caudé et putamen) mais également des autres structures cérébrales comme le cortex. (D'après Reiner et al., 2011).

Au niveau cellulaire, les MSNs GABAergiques sont particulièrement affectés et dégénèrent progressivement, tandis que les interneurons cholinergiques et GABAergiques sont relativement préservés (Ferrante et al., 1985; Vonsattel et al., 1985; Reiner et al., 1988; Albin et al., 1992; Richfield et al., 1995). En plus de cette distinction, il a été observé au cours de la progression de la MH une perte différentielle des deux populations de MSNs exprimant les récepteurs D1 ou D2 (MSNs-D1 et MSNs-D2 respectivement). Des études sur des cerveaux *post-mortem* de patients ont en effet révélé une perte préférentielle des MSNs-D2 et de leurs projections dans les stades précoces de la pathologie, tandis que les MSNs-D1 sont relativement préservés et dégénèrent au cours des stades plus tardifs (Reiner et al., 1988; Albin et al., 1992; Richfield et al., 1995; Deng et al., 2004). De plus, une analyse longitudinale par tomographie à émission de positons avec les traceurs [ $^{11}\text{C}$ ]SCH23390 (récepteurs D1) et [ $^{11}\text{C}$ ]Raclopride (récepteurs D2) chez les porteurs du gène muté, renforce ces résultats (Wilson et al., 2017; Niccolini et al., 2018). Chez les modèles murins de la MH en revanche, cette progression n'est pas si claire : les travaux de André et collaborateurs (2011) ont montré que la fréquence des potentiels post-synaptiques excitateurs (PPSE) des MSNs-D1 est augmentée

## Introduction

à un stade précoce de la pathologie de modèles murins de la MH, puis diminuée à un stade plus tardif, tandis que les PPSE des MSNs-D2 ont une fréquence inchangée (André et al., 2011). Une autre étude en microscopie électronique a démontré que les entrées cortico-striatales sur les épines dendritiques des MSNs-D1 sont perdues dans le neuropile striatal de souris modèles de la MH à un stade tardif de la pathologie, alors que celles des MSNs-D2 sont épargnées (Deng et al., 2014). Plus récemment, des études ont montré que les propriétés électrophysiologiques et structurelles des MSNs-D1 présentaient des modifications significativement plus robustes et étendues que celles des MSNs-D2 au même âge chez plusieurs modèles murins de la MH (Barry et al., 2018; Goodliffe et al., 2018). Finalement, les études transcriptomiques suggèrent que les MSNs-D1 et -D2 ne semblent pas différenciellement altérés dans la MH (Merienne et al., 2019). Les deux types de MSNs semblent différenciellement affectés par la HTT mutée chez les modèles murins de la MH, mais avec une trajectoire différente de celle observée dans la pathologie humaine.

Par ailleurs, la dégénérescence neuronale et l'astroglie décrites dans la MH, sont observées dans les deux compartiments neurochimiques du striatum. Néanmoins, celles-ci apparaîtraient plus précocement dans les striosomes, suggérant une vulnérabilité de ces neurones par rapport à ceux de la matrice chez l'Homme (Hedreen and Folstein, 1995; Tippett et al., 2007) et chez un modèle murin de la MH (Lawhorn et al., 2008).

### 1.3.2.b. La vulnérabilité du striatum

Bien que le striatum soit la structure préférentiellement affectée dans la MH, cette pathologie n'est pas exclusivement striatale, d'autres structures cérébrales sont touchées à des stades plus ou moins précoces de la pathogénèse. Par exemple, le cortex, l'hypothalamus, le thalamus ou encore l'hippocampe sont également atrophiés avec la progression de la maladie (Figure 7B) (Spargo et al., 1993; Rosas et al., 2003; Kassubek et al., 2005). Cependant, les mécanismes sous-jacents à la dégénérescence préférentielle du striatum sont encore mal compris et plusieurs études ont été menées afin d'identifier des facteurs potentiels à l'origine de cette vulnérabilité (Pour revue : Pérez-Navarro et al., 2006; Morigaki and Goto, 2017).

Plusieurs études montrent que la vulnérabilité striatale pourrait être liée à un manque de facteurs neurotrophiques d'origine corticale, notamment de BDNF (*Brain-derived neurotrophic factor*) (Canals et al., 2004; Zuccato et al., 2005; Zuccato and Cattaneo, 2007; Yu

## Introduction

et al., 2018), qui joue un rôle essentiel dans la survie neuronale, la plasticité synaptique et la maturation des neurones. Or dans le striatum, très peu d'ARN messagers (ARNm) issus du gène codant pour le BDNF sont détectés (Hofer et al., 1990; Schmidt-Kastner et al., 1996) ; l'apport du BDNF aux MSNs est donc essentiellement d'origine corticale (Altar et al., 1997; Baquet et al., 2004). Dans la MH, l'axe cortico-striatal est altéré précocement comme le montrent les études d'imagerie chez des patients à un stade pré-symptomatique (Unschuld et al., 2013; Poudel et al., 2014a, 2014b) et le transport axonal du BDNF est dérégulé par la HTT mutée (Gauthier et al., 2004). Les modifications fonctionnelles et morphologiques du cortex ont donc été proposées comme déclencheurs initiaux de la pathologie du striatum et seraient impliquées dans la progression du phénotype chez l'Homme et les modèles animaux de la MH (Pour revue : Estrada-sánchez and Rebec, 2013).

Pour mieux comprendre la vulnérabilité striatale dans la MH, le rôle du glutamate a été très étudié. En effet, le striatum reçoit de nombreuses afférences glutamatergiques du cortex, et l'hyper-activation des récepteurs glutamatergiques, particulièrement de type NMDA, provoque une entrée massive de calcium dans le cytoplasme. L'augmentation non contrôlée de la concentration intracellulaire de calcium conduit à la mort neuronale. Dans la MH, plusieurs pistes permettent d'expliquer la vulnérabilité des MSNs par rapport à l'excitotoxicité glutamatergique (Pour revue : Roze et al., 2011; Lewerenz and Maher, 2015). Par exemple, la localisation des récepteurs NMDA joue un rôle important dans la pathogénèse. Les récepteurs NMDA extra-synaptiques sont augmentés dans le striatum affecté par la mutation de la HTT (Milnerwood et al., 2010). Or ces récepteurs sont couplés à des voies de signalisation impliquées dans l'activation de protéases ou de protéines pro-apoptotiques entraînant la mort neuronale (Hardingham et al., 2002; Pour revue : Parsons and Raymond, 2014). De plus, la HTT interagit avec la protéine PSD95 (protéine de densité postsynaptique 95 kDa), qui régule l'internalisation des récepteurs NMDA présents à la membrane plasmique. Cependant, lorsque la HTT est mutée son affinité pour PSD95 est diminuée, entraînant une altération de l'internalisation des récepteurs NMDA extra-synaptiques (Sun et al., 2001). La vulnérabilité des MSNs à l'excitotoxicité peut également être liée à une baisse d'expression du transporteur du glutamate GLT1 présent sur les astrocytes, décrite dans le striatum des patients et modèles murins de la MH (Faideau et al., 2010; Estrada-Sánchez and Rebec, 2012). La recapture du



## Introduction

glutamate présent dans la fente synaptique serait donc moins efficace dans la MH, entraînant une augmentation de son effet excitateur.

D'autre part, la pathogénèse de la MH implique un dysfonctionnement mitochondrial (Pour revue : Liot et al., 2017). Les mitochondries sont constamment stimulées par une demande énergétique de base liée à la transmission synaptique glutamatergique. Or leur capacité à gérer le calcium intracellulaire est altérée par la HTT mutée, ce qui pourrait rendre les MSNs très vulnérables à l'entrée de calcium et pourrait ainsi faciliter l'excitotoxicité déclenchée par les récepteurs NMDA dans le striatum (Jacquard et al., 2006). Les études *post-mortem* des cerveaux des patients ont révélé un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale avec une baisse d'activité des complexes II, III et IV, spécifiquement dans le striatum par rapport aux autres structures cérébrales telles que le cortex ou le cervelet (Gu et al., 1996; Fukui and Moraes, 2007; Aidt et al., 2013; Damiano et al., 2013). L'apport énergétique des MSNs étant assuré principalement par les mitochondries, ces résultats suggèrent un parallèle entre ce dysfonctionnement et la dégénérescence préférentielle des MSNs dans la MH.

La HTT mutée perturbe la transcription de nombreux gènes, particulièrement dans le striatum (cf partie **2.3 Protéotoxicité nucléaire de la huntingtine mutée**, p.46). Ainsi, l'expression des gènes préférentiellement exprimés dans le striatum a été étudiée chez les patients et modèles murins de la MH. Ces gènes, aussi appelés marqueurs striataux, peuvent avoir un effet pro-survie (par exemple, *Bcl11*, *FOXP1*, *MSK-1*, *DCLK3*) ou pro-toxique (par exemple, *RGS2*, *Rhes*). La dérégulation de leur expression dans le striatum des patients et modèles murins de la MH pourrait jouer un rôle crucial dans la susceptibilité du striatum à la HTT mutée (Pour revue : Francelle et al., 2014).

Enfin, comme dans la plupart des maladies liées à une expansion de triplets (CAG ou CTG), l'instabilité de la répétition présente une spécificité tissulaire et est particulièrement élevée dans le cerveau, hormis dans le cervelet. Au niveau cérébral, l'instabilité somatique des expansions de triplets est particulièrement importante dans le striatum et le cortex des modèles de la MH (Wheeler et al., 1999; Kennedy and Shelbourne, 2000). Ce phénomène impliquerait notamment des mécanismes liés aux dommages oxydatifs de l'ADN et à leur réparation (Pour revue : Goula and Merienne, 2013) et participerait à la vulnérabilité du striatum face à la mutation de la HTT.

## 1.4. Une triade de symptômes

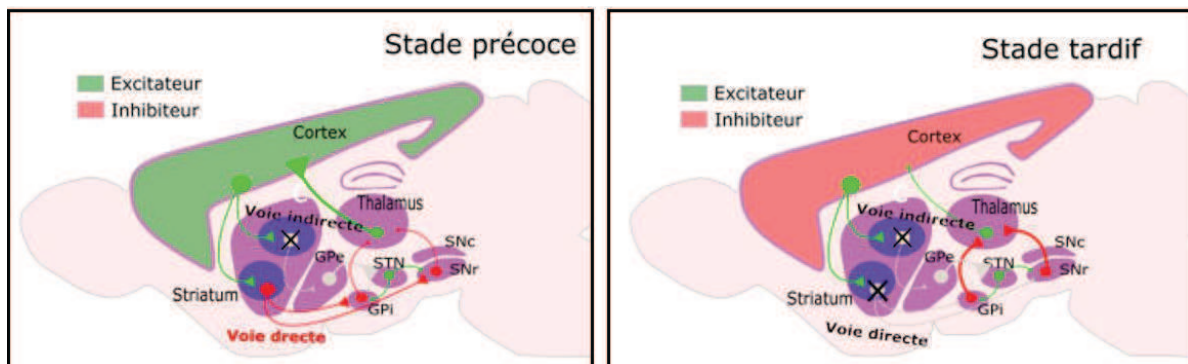
La dégénérescence cérébrale et particulièrement l'atrophie du striatum sont à l'origine d'une triade de symptômes caractéristiques de la MH, regroupant des troubles moteurs, cognitifs et psychiatriques. Bien que la manifestation des symptômes et leurs intensités sont variables d'un patient à l'autre ceux-ci s'aggravent avec le temps, menant inexorablement à la mort du patient 15 à 20 ans après le début des signes caractéristiques de la maladie. Le diagnostic se fait essentiellement sur la base des troubles moteurs, bien que les autres symptômes soient aussi, voire plus importants.

### 1.4.1. Troubles moteurs

Les troubles moteurs dans la MH peuvent être divisés en deux catégories en fonction de leurs caractéristiques et de leur décours temporel. En effet, dans les phases précoces de la pathologie, les patients présentent une hyperkinésie avec des mouvements involontaires, aussi appelées « chorées ». Celles-ci constituent le symptôme le plus caractéristique de la MH, mais pas le plus invalidant. Ces contractions musculaires apparaissent initialement au niveau des extrémités et des muscles faciaux. Elles sont souvent invisibles pour l'entourage ou perçues comme des signes de nervosité. Avec la progression de la maladie, les chorées évoluent et touchent graduellement l'ensemble des autres muscles du corps, devenant ainsi de plus en plus handicapantes dans la vie quotidienne, jusqu'à priver les malades de leur autonomie. Ces mouvements choréiques sont associés à une incoordination motrice à l'origine de troubles de l'équilibre et de la marche. Par exemple, la démarche des patients devient instable et s'apparente à celle d'une personne légèrement ivre, entraînant souvent des chutes. Au cours des stades plus tardifs de la MH, la parole est également altérée, jusqu'à parfois même une perte totale de son usage. Les troubles moteurs se manifestent aussi par des troubles de la déglutition entraînant des fausses routes à l'origine d'étouffement ou de pneumonies. Celles-ci constituent la cause la plus fréquente du décès des patients (Ross, 2010). Plus tardivement, ces symptômes moteurs évoluent vers une bradykinésie, une dystonie et une rigidité musculaire, menant à un ralentissement des mouvements des patients et une difficulté à démarrer une activité.

## Introduction

Ces deux phases successives d'évolution des troubles moteurs peuvent être corrélées à la dégénérescence biphasique des neurones du striatum. En effet, les MSNs-D2 seraient plus vulnérables à la toxicité de la HTT mutée et dégénèreraient plus précocement, impactant la voie indirecte et l'inhibition du mouvement. Ainsi, une altération de cette voie en combinaison avec le rôle activateur de la voie directe explique les mouvements involontaires chez les patients au stade précoce de la maladie (Figure 8). Dans les stades plus tardifs, la bradykinésie est corrélée à la perte générale des neurones striataux, y compris les MSNs-D1, entraînant une perte de contrôle du mouvement (Figure 8) (Plotkin and Surmeier, 2015).



**Figure 8 : Perturbation progressive des voies directe et indirecte du striatum au cours de la MH.**

Au début des symptômes de la MH, les MSNs-D2 de la voie indirecte dégénèrent en premier, inhibant le noyau sous-thalamique (STN), ainsi que le globus pallidus interne (GPI) et la substance noire (SNr). Cette inactivation provoque une désinhibition du thalamus et donc une stimulation du cortex, menant l'activation du mouvement et l'apparition de chorées. Plus tardivement, les MSNs-D1 de la voie directe dégénèrent également, provoquant une désinhibition des GPI et SNr qui inhibent alors le thalamus. Le cortex n'est pas activé, le mouvement est empêché, se traduisant par une bradykinésie. (Figure : Rafael ALCALA VIDA)

### 1.4.2. Troubles psychiatriques

Les symptômes psychiatriques, présents généralement dès les stades précoces de la maladie et souvent avant le début des symptômes moteurs (Tabrizi et al., 2009), sont plus variables d'un patient à l'autre que les troubles moteurs. Ils se manifestent, dans plus de la moitié des cas, par une dépression. Très fréquemment, les patients présentent un comportement apathique dès les stades précoces de la maladie, avec une perte d'enthousiasme, de spontanéité et une indifférence globale leur environnement. Les patients ont également souvent des difficultés à contrôler leurs émotions, une caractéristique qui se traduit par une forte irritabilité. L'ensemble de ces troubles, additionnés d'une perte de poids, d'anxiété et de troubles du sommeil, rendent le quotidien des patients et de leurs familles

difficile à vivre et augmentent le risque de suicide. Celui-ci représente la deuxième cause principale du décès des patients (Ross, 2010).

### 1.4.3. Troubles cognitifs

Les troubles cognitifs ont pendant longtemps été moins étudiés car beaucoup plus discrets au début de la pathologie que les troubles moteurs. Au fur et à mesure des recherches, ceux-ci ont pris de plus en plus d'importance. Premièrement des études ont montré qu'ils sont plus précoces que les symptômes moteurs et peuvent être détectés plusieurs années avant le diagnostic moteur (Lawrence et al., 1998; Paulsen et al., 2008, 2017; Stout et al., 2011). De plus, les déficits cognitifs sont particulièrement corrélés à la progression de la maladie et l'atrophie cérébrale en IRM (Paulsen et al., 2004; Aylward et al., 2011; Nopoulos et al., 2011). Deuxièmement, tout comme les troubles psychiatriques, le déclin cognitif est particulièrement handicapant pour les patients et représente une lourde charge pour leurs familles. Leur vie personnelle est impactée ; la gestion du temps, de l'argent et des enfants par exemple deviennent des tâches compliquées pour les patients. Leur vie professionnelle est aussi impactée ; les patients doivent changer de travail ou adapter leurs missions, jusqu'à parfois même démissionner précocement.

#### 1.4.3.a. Des altérations cognitives multiples

L'un des indicateurs les plus précoces et sensibles de la pathologie est le ralentissement de la pensée et des processus cognitifs des malades. L'achèvement des tâches mentales est plus fatigant et prend plus de temps pour atteindre le même résultat. En effet, des compensations fonctionnelles se mettent en place pour contrebalancer les circuits dysfonctionnels et sont souvent plus coûteuses en énergie, ce qui ralentit la vitesse de traitement des informations qui, autrefois, était plus automatique.

Par ailleurs, les déficits attentionnels et de concentration, qui contribuent également au ralentissement cognitif, sont particulièrement précoces dans le développement de la pathogénèse. Très tôt, les patients présentent également des difficultés à identifier les émotions communiquées au travers d'une expression faciale ou à partir d'une intonation verbale (Pour revue : Paulsen, 2011; Paulsen et al., 2017).

## Introduction

Les déficiences cognitives les plus notables dans un premier temps et les plus étudiées concernent les capacités exécutives permettant d'effectuer des tâches complexes du quotidien : les personnes atteintes de la MH présentent une mémoire de travail altérée et des difficultés pour la prise de décision, l'organisation et la planification. Un déficit de flexibilité cognitive est également observé, empêchant les patients de s'adapter à différentes situations.

### 1.4.3.b. *Des altérations cognitives dépendantes du striatum*

De façon surprenante, bien que le striatum soit la première structure affectée par la HTT mutée, peu d'études ont été menées sur l'altération des fonctions cognitives dépendantes du striatum dans la MH.

La flexibilité cognitive, qui représente la capacité à passer d'une tâche cognitive à une autre et dépend des boucles cortico-striatales, est particulièrement étudiée. Des études montrent qu'elle est altérée précocement dans différentes tâches comportementales chez l'Homme et les modèles murins de la maladie (Lawrence et al., 1999; Rattray et al., 2013b; Farrar et al., 2014; Yhnell et al., 2015; Stefanko et al., 2017). Par exemple, les performances des souris R6/1, modèles de la MH, ont été évaluées à 9 semaines (Harrison et al., 2013) puis à 15 semaines (Rattray et al., 2013b) dans un labyrinthe aquatique en T. Dans une première phase d'apprentissage, les souris devaient retrouver une plateforme immergée, indiquée par une lampe dans un des bras du labyrinthe. Une fois qu'elles avaient réussi la tâche, l'indicateur changeait : la lampe n'était plus au-dessus du bras contenant la plateforme mais au-dessus du bras opposé. Les souris R6/1, dès l'âge de 9 semaines présentaient des performances altérées dans cette tâche, reflétant un déficit de flexibilité cognitive.

En revanche, la mémoire procédurale, dépendante du striatum et nécessaire à l'apprentissage d'automatismes moteurs et cognitifs, a été peu étudiée dans le cadre de la MH, notamment dû au manque de tâches comportementales pour l'évaluer. Seules quelques études ont été réalisées chez l'Homme et chez des modèles murins de la MH (Schmidtke et al., 2002; Voermans et al., 2004; Ciamei and Jennifer Morton, 2009; Cayzac et al., 2011; Kirch et al., 2013).

Chez l'Homme, les résultats à propos de la mémoire procédurale sont hétérogènes : Voermans et collaborateurs (2004) ont évalué l'interaction entre les systèmes de navigation basés sur l'activation du striatum (stratégie procédurale) et de l'hippocampe (stratégie

## Introduction

spatiale) en IRM fonctionnelle (IRMf) chez des patients à un stade pré-symptomatique ou précoce de la MH. Au cours de la tâche de navigation, les patients étaient tout d'abord guidés dans un environnement virtuel contenant plusieurs maisons et 5 points d'intersection. Les sujets devaient mémoriser le trajet indiqué, puis devaient le restituer en l'absence du guidage. Les données d'IRMf indiquaient une altération de l'activité du striatum chez les patients Huntington, alors que leurs performances étaient équivalentes à celles des sujets contrôles. De façon intéressante, ce résultat était associé à une augmentation de l'activité de l'hippocampe pour compenser le déficit d'activation du striatum (Voermans et al., 2004).

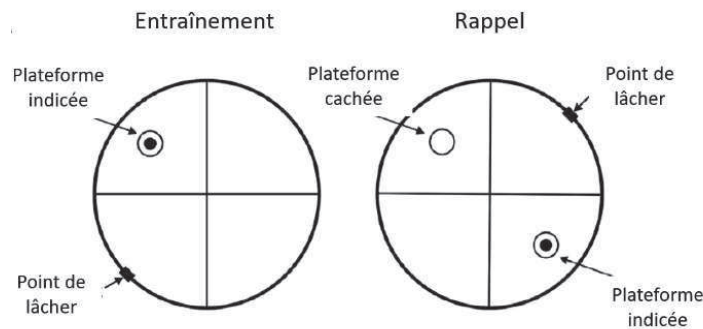
En opposition à cette étude, les travaux de Majerova et collaborateurs (2012) ne montrent aucune différence de performances chez des patients à un stade précoce de la MH, dans une tâche de navigation impliquant le striatum et l'hippocampe, avec un dispositif analogue à la piscine de Morris chez le rongeur (Majerova et al., 2012).

Plus récemment, une étude a évalué la mémoire de travail égocentrique (procédurale) et allocentrique (spatiale) de patients Huntington ne présentant pas encore de troubles moteurs. La tâche consistait à mémoriser l'emplacement de cibles affichées sur un écran sur un délai de 1 seconde. Selon le test effectué, l'emplacement des cibles devait être retenu par rapport à une ligne affichée sur l'écran (stratégie allocentrique/spatiale) ou par rapport au sujet lui-même (stratégie égocentrique/procédurale). Les résultats d'IRM ont révélé que la mémoire de travail égocentrique des patients était altérée par rapport aux sujets contrôles et que leurs performances étaient corrélées à une réduction du volume du noyau caudé des patients (Possin et al., 2017). Cependant, les résultats de ces deux dernières études (Majerova et al., 2012; Possin et al., 2017) ont été obtenus avec des cohortes de petites tailles (19 et 16 patients respectivement), un effectif qui peut impacter la robustesse des résultats.

Chez l'animal par exemple, l'étude de Ciamei et Morton (2009) montre une altération des fonctions cognitives dépendantes du striatum chez une souris modèle de la MH, qui serait compensée par la fonction de l'hippocampe. Pour cela, les auteurs ont utilisé un protocole adapté de la piscine de Morris, durant lequel les souris sont entraînées à retrouver une plateforme indicée. Elles peuvent apprendre la localisation de la plateforme à l'aide des indices visuels (stratégie spatiale dépendante de l'hippocampe) ou mémoriser l'association entre l'indice et la plateforme (stratégie « procédurale » dépendante du striatum) ([Figure 9](#)). La stratégie est ensuite évaluée en positionnant la plateforme indicée dans le quadrant

## Introduction

opposé et en remplaçant une plateforme non indiquée dans le quadrant où la plateforme était positionnée durant l'apprentissage. Ainsi, les souris qui utilisent une stratégie spatiale rejoignent la plateforme non indiquée et celles qui sollicitent une stratégie dépendante du striatum se dirigent vers la plateforme indiquée (Figure 9) (Ciamei and Jennifer Morton, 2009).



**Figure 9 : Illustration du protocole utilisé pour évaluer la mémoire procédurale des modèles murins de la MH en piscine de Morris.**

Protocole adapté de la piscine de Morris, où les animaux doivent apprendre à trouver une plateforme indiquée (entraînement). La stratégie d'apprentissage utilisée par les animaux est évaluée lors d'un test de rappel pendant lequel la plateforme indiquée est déplacée et une plateforme cachée est positionnée à la place de la plateforme indiquée lors de l'entraînement : l'utilisation d'une stratégie spatiale consiste à nager vers la plateforme cachée et l'utilisation d'une stratégie procédurale est reflétée par l'accès à la plateforme indiquée (Ciamei and Jennifer Morton, 2009).

Ce protocole a également été utilisé avec un modèle Rat de la MH (TgHD), hétérozygote et homozygote, mais les résultats obtenus ne sont pas équivalents à ceux observés avec la Souris (Kirch et al., 2013). En effet, les rats tgHD homozygotes ont des performances altérées lors de l'acquisition par rapport aux rats contrôles et tgHD hétérozygotes. De plus, lors du rappel, les résultats montrent l'utilisation d'une stratégie spatiale pour les rats contrôles, tandis que les rats tgHD homozygotes utilisent préférentiellement une stratégie dépendante du striatum (Kirch et al., 2013). Les performances des rats tgHD hétérozygotes sont réparties également entre les stratégies spatiale et procédurale. Les auteurs suggèrent que l'entraînement réalisé n'était pas suffisant pour permettre un apprentissage procédural chez le Rat (8 essais par jour sur 2 jours). La différence de résultats par rapport à l'étude de Ciamei et Morton (2009) chez les animaux transgéniques peut être expliquée par la sévérité du phénotype des souris R6/2 par rapport au modèle tgHD ou par un dysfonctionnement du cortex entorhinal décrit chez les rats tgHD (Kirch et al., 2013).

Une autre étude utilise une tâche de conditionnement nécessitant l'apprentissage d'une stratégie S-R (association d'une action et d'une récompense). Elle montre une altération

électrophysiologique en relation avec les fonctions cognitives dépendantes du striatum (Cayzac et al., 2011).

En conclusion, très peu d'études évaluant la mémoire procédurale ont été réalisées, les résultats sont nuancés et les tâches comportementales utilisées impliquent généralement l'apprentissage d'un comportement dirigé vers un but (R-O) et non d'un réel automatisme (S-R).

### **1.5. Modélisation de la MH**

Depuis la découverte de la mutation de la HTT, de nombreux modèles animaux de la MH ont été créés afin de caractériser les mécanismes moléculaires sous-jacents à la pathologie et de permettre le développement de thérapies. Puisque la MH est causée par une mutation dans un gène unique, de nombreux modèles génétiques ont été créés chez différentes espèces comme le ver, la drosophile, le poisson, la souris, le rat, le primate ou encore le mouton et le cochon. Le potentiel translationnel d'un modèle animal peut être évalué sur la base de sa construction (homologie), son phénotype (isomorphisme) et sa validité prédictive (prédictivité). Ainsi, le choix du modèle de la maladie est dépendant de l'objectif de l'étude, une bonne compréhension des forces et des faiblesses de chaque modèle est donc fondamentale pour effectuer un choix pertinent.

Au vu de la diversité des modèles, je vais plus particulièrement décrire les modèles murins de la MH, d'une part car mes travaux sont basés sur une souris modèle de la MH et d'autre part car ce sont les mammifères les plus utilisés, de par leur efficacité, leur facilité de manipulation et de reproduction et leur forte homologie (99%) au génome humain.

#### **1.5.1. Modèles murins**

Avant la découverte de la mutation de la HTT en 1993, les premiers modèles murins de la MH ont été générés par une approche lésionnelle du striatum induite par différentes neurotoxines. Ces modèles lésionnels étaient basés sur l'observation que le site principal de la neurodégénérescence dans la MH était le striatum et que les injections intrastriatales d'agonistes des récepteurs glutamatergiques entraînaient la perte sélective des MSNs. Les premiers modèles étaient donc générés avec des agonistes tels que l'acide iboténique et



## Introduction

l'acide kaïnique et ont ensuite été remplacés par l'acide quinoléique qui épargnait les interneurons (Coyle and Schwarcz, 1976; McGeer and McGeer, 1976; Schwarcz et al., 1984; Beal et al., 1986). Ces modèles « excitotoxiques » ont été remplacés par des modèles « énergétiques », obtenus par administration périphérique de toxines mitochondriales, comme le malonate ou l'acide 3-nitropropionique (3-NP) qui, en provoquant une déplétion énergétique, entraînaient une lésion bilatérale spontanée préférentielle des MSNs (Beal et al., 1993; Brouillet et al., 1993; Ferrante et al., 1993).

Bien que ces modèles reproduisent les principales caractéristiques histologiques, biochimiques et comportementales de la MH, ils présentent aussi des inconvénients, notamment le caractère aigu des lésions qui contraste avec la mise en place progressive de la dégénérescence striatale et des symptômes de la MH. C'est pourquoi, après la découverte de la mutation de la HTT de nombreux modèles génétiques ont été développés, avec une homologie plus proche de la pathologie humaine.

Les approches utilisées pour générer les modèles génétiques sont très variées et peuvent être regroupées globalement en plusieurs catégories selon : l'utilisation du gène *HTT* muté complet vs un fragment du gène, la longueur de l'expansion de CAG, la composition de la région codante (CAG uniquement vs intégration de codons CAA), l'insertion de la mutation (transgène vs expansion du gène endogène), l'origine du gène inséré (gène *HTT* humain vs gène endogène de l'animal), l'utilisation d'ADN complémentaire ou génomique, ou encore la nature du promoteur utilisé pour réguler l'expression de la HTT.

Plus d'une vingtaine de modèles rongeurs de la MH ont été créés. La liste des modèles présentés dans cette partie n'est donc pas exhaustive et nous allons nous focaliser sur les modèles génétiques qui sont les plus couramment utilisés pour étudier la MH (Pour revue : Pouladi et al., 2013; Chang et al., 2015).

### 1.5.1.a. [Expression du fragment N-terminal de la huntingtine](#)

Tous les modèles exprimant un fragment N-terminal tronqué de la HTT présentent généralement l'avantage d'avoir une apparition rapide des symptômes, notamment au niveau moteur et cognitif, une perte de poids et une réduction de la durée de vie. Le phénotype de ces modèles, exprimant différents fragments N-terminaux de la HTT mutée, supporte la

## Introduction

théorie selon laquelle ce fragment est particulièrement toxique et joue un rôle important dans la pathogénèse (cf partie [2.1.2a De la fragmentation à l'agrégation](#), p.34).

Les premiers modèles murins de la MH générés avec un fragment de la HTT humaine mutée ont été les lignées R6/1 et R6/2 (Mangiarini et al., 1996). Ces lignées expriment un fragment de 1,9kb contenant le promoteur et l'exon 1 de la *HTT* humaine. A l'origine, ce fragment a été microinjecté dans des embryons de souris et s'est ensuite intégré de façon aléatoire dans 5 régions du génome de la souris transgénique. L'analyse de la première génération a révélé que pour les lignées R6/0 et R6/1, le fragment a été inséré en une copie unique, contrairement à la lignée R6/2 qui a intégré trois copies. Une des lignées (R6/T) a intégré un fragment fortement tronqué et enfin, la lignée R6/5 contient 4 copies du fragment. Parmi ces lignées, les R6/1 et R6/2 avaient le phénotype le plus marqué, associé à une expansion de 116 et 144 CAG respectivement et une expression du transgène de 31% de la HTT endogène pour les souris R6/1 et 75% pour les souris R6/2 (Mangiarini et al., 1996).

La lignée R6/2, dont le phénotype est plus sévère que celui de la lignée R6/1, a été plus largement étudiée. Les résultats comportementaux sont parfois très hétérogènes d'une étude à l'autre de par la diversité des tests et protocoles utilisés, ou encore de par la taille de la répétition de CAG de la lignée qui, à l'origine, est de 116 CAG mais qui peut varier en raison de son instabilité (Brooks et al., 2012). Ainsi, certaines lignées de souris R6/2 possèdent plus de 200 CAG. Étonnamment, l'étude de Cummings et collaborateurs (2012) sur des souris R6/2 comportant des expansions de 110 à 310 CAG a révélé que le nombre de CAG et le phénotype affichent une corrélation en forme de cloche : une augmentation du nombre de CAG jusqu'à 160 est associée à une aggravation du phénotype des souris R6/2, tandis que des expansions plus grandes, de 200 à 310 CAG, réduisent la sévérité du phénotype comportemental et moléculaire du modèle R6/2 (Cummings et al., 2012; Sawiak et al., 2016). Cette amélioration est corrélée à une réduction de l'expression de la HTT mutée (Dragatsis et al., 2009) et des agrégats nucléaires (Cummings et al., 2012). Néanmoins, chez les souris R6/2 avec moins de 160 CAG, des déficits cognitifs et moteurs sont observés respectivement dès l'âge de 3,5 et 5 semaines (Mangiarini et al., 1996; Carter et al., 1999; Lione et al., 1999; Hickey et al., 2005; Menalled et al., 2009), tandis que les déficits cognitifs et moteurs des souris R6/1 n'ont été décrits qu'à partir de 8 semaines (Hansson et al., 2001; Brooks et al., 2012). Les souris R6/1 et R6/2 meurent précocement, autour de 32-40 semaines et 10-13 semaines respectivement,

## Introduction

avec une atrophie cérébrale, particulièrement striatale, et des altérations neuropathologiques (Mangiarini et al., 1996; Rattray et al., 2013b, 2013a). Cependant, les pertes neuronales dans les régions touchées par la maladie sont limitées, particulièrement chez les souris R6/2 (Turmaine et al., 2000; Smith et al., 2006; Bayram-weston et al., 2012; Rattray et al., 2013a).

La lignée N171-82Q est également un modèle à fragment de *HTT* très utilisé pour l'étude de la MH. Ce modèle consiste en l'expression d'un ADNc de 171 aminoacides de la *HTT* humaine, avec 82 CAG sous la régulation d'un promoteur prion murin, permettant l'expression des gènes dans pratiquement tous les neurones du système nerveux central (Schilling et al., 1999). Le phénotype des souris N171-82Q est moins sévère que celui des souris R6, les déficits moteurs et les altérations neurologiques sont décrits autour de 3 mois, et une mort prématurée entre 4 et 6 mois (Schilling et al., 1999; Cheng et al., 2011; Li et al., 2017).

### 1.5.1.b. Expression de la forme complète de la huntingtine humaine

Les modèles exprimant la *HTT* complète sont générés soit par knock-in de la mutation dans le gène endogène *Htt* murin (*Hdh*) (Pour revue : Menalled, 2005), soit par insertion du transgène avec le gène complet de la *HTT* humaine grâce à un chromosome artificiel de levure (YAC - *Yeast artificial chromosome*) (Hodgson et al., 1999) ou un chromosome artificiel bactérien (BAC - *Bacterial artificial chromosome*) (Gray et al., 2008).

Les modèles knock-in (KI) sont générés par recombinaison homologue sur des cellules souches embryonnaires murines. L'expansion de CAG peut alors être directement insérée dans l'exon 1 du gène *Hdh* WT murin ou dans une séquence humanisée de l'exon 1. Dans le premier cas, les lignées KI expriment un mutant de la *HTT* murine (Lin et al., 2001; Heng et al., 2010; Sathasivam et al., 2013). Dans le deuxième cas, les souris KI expriment une forme chimérique de la *HTT* avec une partie humaine de l'exon 1 et une partie murine (Wheeler et al., 2000; Menalled et al., 2003, 2012; Abd-elrahman et al., 2017; Stefanko et al., 2017). Ces modèles présentent de nombreux avantages, notamment la possibilité d'obtenir des animaux hétérozygotes avec un allèle *HTT* WT et un allèle *HTT* muté, comme chez les patients. De plus, leur construction génétique est plus proche de la pathologie humaine par rapport aux modèles exprimant un fragment de la *HTT*. Un autre avantage est la possibilité de générer des séries alléliques de souris KI qui diffèrent uniquement par la taille de leur expansion de CAG dans l'exon 1, en raison de l'instabilité intergénérationnelle de la mutation de la *HTT* (Wheeler et

## Introduction

al., 1999; Neto et al., 2017). Ces séries permettent de réaliser des études sur l'influence de la taille de l'expansion CAG sur le phénotype murin de la MH. Ainsi, plusieurs séries alléliques de KI, de 20 à 365 CAG, ont été générées par les groupes de Wheeler et MacDonald (Wheeler et al., 1999) et Lin et Detloff (Lin et al., 2001).

Les souris KI présentent un phénotype beaucoup moins sévère que les lignées R6. Par exemple, la lignée KI CAG 140 exprime un produit chimérique de l'exon 1 de la HTT humaine et murine avec une expansion de 140 CAG. Ces souris présentent des anomalies neuropathologiques autour de 4 mois, des changements comportementaux subtiles entre 1 et 4 mois, mais les phénotypes moteurs et cognitifs ainsi que la perte de poids sont observés autour de l'âge d'un an. De plus, la durée de vie des KI CAG 140 est normale (Menalled et al., 2003; Hickey et al., 2008). La lignée KI z175, qui résulte d'une dérive spontanée de l'expansion de CAG de la lignée KI CAG 140 et comporte 188 CAG, montre un phénotype plus marqué avec des déficits comportementaux dès l'âge de 6 mois et une durée de vie réduite, uniquement pour les homozygotes (Menalled et al., 2012). En raison de la progression lente des déficits comportementaux et des altérations moléculaires et cellulaires, ces modèles sont souvent utilisés pour l'étude d'évènements pathogéniques précoces (Wheeler et al., 2002; Yu et al., 2003).

Comme décrit dans la pathologie humaine, une instabilité somatique et germinale, contribuant à la variabilité des données phénotypiques, est observée dans les modèles R6 et KI (Mangiarini et al., 1997; Wheeler et al., 1999; Gonitell et al., 2008; Goula et al., 2009; Neto et al., 2017). En effet, la taille réelle de l'expansion de CAG a tendance à augmenter au travers des générations, ce qui nécessite de vérifier régulièrement sa taille chez les modèles murins utilisés pour les études de la MH.

Le deuxième groupe de modèles exprime la HTT humaine complète, avec tous les introns et exons, ainsi que les séquences régulatrices jusqu'à 24 kb en amont et 117 kb en aval du gène. Parmi ces modèles, les lignées YAC 128 et BACHD avec, respectivement 128 et 97 CAG, ont été très étudiées. Ces deux modèles présentent des déficits moteurs dès l'âge de 6 mois et une atrophie striatale et corticale entre 9 et 12 mois (Slow et al., 2003; Gray et al., 2008). En revanche, l'instabilité somatique et germinale n'est pas observée chez les souris BACHD car l'expansion de polyglutamines (polyQ) est encodée par une répétition mixte de

## Introduction

codons CAG-CAA qui stabilise la mutation, y compris dans le cortex et le striatum (Gray et al., 2008).

### 1.5.1.c. Des rats pour étudier la MH

En plus des souris, il existe également des rats modèles de la MH, notamment deux modèles : un rat transgénique (TgHD-CAG51n) avec 51 CAG sous le contrôle du promoteur de la HTT endogène (von Hörsten et al., 2003) et un modèle créé avec un BAC contenant la HTT complète avec 97 CAG/CAA et son promoteur (BACHD) (Yu-Taeger et al., 2012).

Les rats TgHD-CAG51n présentent un phénotype neuropathologique, des déficits moteurs et cognitifs entre 6 et 9 mois (Nguyen et al., 2006; Ortiz et al., 2012; Kirch et al., 2013). Ce serait le premier modèle à montrer des mouvements équivalents aux chorées chez l'Homme, c'est à dire des mouvements rapides, irréguliers et brefs au niveau du cou (von Hörsten et al., 2003; Cao et al., 2006). Des déficits moteurs ont été décrits chez les rats BACHD dès l'âge de 1 mois, des déficits cognitifs dès 6 mois et des altérations moléculaires majoritairement vers 12 mois (Yu-Taeger et al., 2012, 2017; Abada et al., 2013).

Bien qu'actuellement les modèles majoritairement utilisés pour étudier la MH restent les souris, les rats présentent de nombreux avantages de par leur taille, la facilité de manipulation pour certaines tâches comportementales et leurs caractéristiques métaboliques et pharmacologiques proches de celles de l'Homme. En revanche le phénotype des rats modèles de la MH est modéré, ce qui limite leur utilisation, et les résultats comportementaux sont variables.

### 1.5.2. Modèles *in vitro* : iPSCs

Les modèles animaux sont très utilisés pour l'étude des maladies neurodégénératives et permettent de nombreuses avancées sur la compréhension des mécanismes pathogéniques qui sous-tendent la dégénérescence. Cependant, ils ont des limites et ne représentent pas la pathologie humaine dans tous ses aspects. Le manque de disponibilité de tissus cérébraux *post-mortem* de patients bien caractérisés rend l'étude des mécanismes pathogéniques chez l'Homme compliquée. Les dernières années, l'avènement des techniques de différenciation cellulaire à partir de cellules souches pluripotentes induites (iPSCs) humaines a permis l'apparition de nouveaux modèles cellulaires de la MH (The HD iPSCs

## Introduction

Consortium, 2012). Ceux-ci permettent l'étude des mécanismes moléculaires altérés par la HTT mutée, mais aussi la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques dont certaines, testées chez l'animal, montrent des résultats encourageants.

Les premières iPSCs ont été générées à partir de fibroblastes de patients contenant 54 à 72 CAG grâce à une induction rétrovirale de facteurs entraînant la pluripotence (Oct3/4, Klf-4, Sox2, c-Myc) (Park et al., 2008). Zhang et collaborateurs (2010) ont ensuite montré que les iPSCs issues de patients pouvaient être différenciées en MSNs (Zhang et al., 2010). De nombreuses lignées existent actuellement, dont la majeure partie a été créée par le HD iPSCs Consortium, avec un nombre de répétitions CAG très varié, allant de 17 à 180 (Pour revue : Tousley and Kegel-Gleason, 2016; Geater et al., 2018).

Plusieurs études montrent que ces cellules présentent une altération métabolique, transcriptionnelle, un défaut de l'adhésion cellulaire et une augmentation de la mort cellulaire (An et al., 2012; The HD iPSCs Consortium, 2012; Ring et al., 2015). Les lignées iPSCs provenant de patients juvéniles (>70 CAG) présentent des altérations moléculaires supplémentaires, au niveau axonal et au niveau de la signalisation calcique (The HD iPSCs Consortium, 2012; Ring et al., 2015).

Les iPSCs et les neurones en dérivant, ont notamment été utilisés pour du criblage de molécules à visée thérapeutique afin d'évaluer leurs effets sur la survie neuronale (Cheng et al., 2013b; Yao et al., 2015; Dickey et al., 2016). Dans d'autres études, ces modèles sont utilisés pour étudier l'impact de la mutation Huntington sur les processus neurodéveloppementaux ou pour étudier les mécanismes précédant la mort neuronale (Nguyen et al., 2013; Molina-Calavita et al., 2014).

Les avancées récentes sur les technologies de modifications génétiques (*Zinc finger nucleases* - ZFN, *Transcription activator like effector nucleases* - TALENS, *Clustered regularly-interspaced short palindromic repeats/Cas9* - CRISPR/Cas9) rendent également possible la modification des iPSCs pour étudier l'effet de SNPs (An et al., 2014). Enfin, au niveau épigénétique, il a été montré que les caractéristiques épigénétiques des iPSCs provenant de leur tissu somatique d'origine, sont perdues lors du passage de la lignée (Kim et al., 2010).

Un des avantages que procurent les iPSCs pour la modélisation de la MH est la possibilité d'étudier la neuropathologie humaine, avant même le début de la maladie, sans dépendre des

## Introduction

tissus *post-mortem* des patients. Cependant, à l'heure actuelle, plusieurs paramètres ne sont pas encore totalement maîtrisés, comme la variabilité génétique des iPSCs (anomalies génétiques, instabilité somatique de l'expansion de CAG), la validation de la pluripotence des iPSCs et des caractéristiques des MSNs issus de leur différenciation. De plus, la conception des études n'est parfois pas optimale car les travaux sont généralement réalisés sur une, voire deux, lignées d'iPSCs et manquent souvent de lignées contrôles adaptées. Des problèmes de reproductibilité au niveau de l'étape de différenciation sont également rencontrés, les protocoles et conditions de culture étant variables entre les laboratoires.

## 2. MECANISMES MOLECULAIRES ET PATHOGENESE DE LA MH

### 2.1. La huntingtine

#### 2.1.1. Biologie et physiologie de la huntingtine

La HTT est une protéine ubiquitaire de 348 kDa, bien conservée au cours de l'évolution et encodée par le gène *HTT* qui comporte 67 exons. Sa partie N-terminale, correspondant à l'exon 1 et contenant une expansion anormale de polyglutamines (polyQ) dans sa forme mutée, a été plus particulièrement étudiée. L'autre partie de la HTT reste moins bien caractérisée bien qu'elle représente 97,8% de la protéine.

#### 2.1.1.a. Domaines d'interaction de la huntingtine

L'expansion de polyQ dans la région N-terminale de la HTT est encadrée par une région de 17 acides aminés et un domaine riche en proline (PRD) (Figure 10). La région des 17 acides aminés est le siège de nombreuses modifications post-traductionnelles qui influencent la localisation cellulaire et la dégradation de la HTT (Atwal et al., 2007; Thompson et al., 2009; Maiuri et al., 2013). Le PRD est, quant à lui, très important pour les interactions protéines-protéines et sa structure secondaire est une hélice proline-proline relativement rigide, qui pourrait jouer un rôle dans la stabilisation de l'expansion de polyQ (Southwell et al., 2008).

En dehors de la région N-terminale, la HTT comporte de nombreuses répétitions HEAT (Figure 10), un motif qui doit son nom aux quatre protéines qui en contiennent (*Huntingtine*, *Elongation Factor 3*, *Protein phosphatase 2A*, *TOR1* - HEAT) et qui forme deux hélices  $\alpha$  reliées par une boucle. Ces domaines HEAT constituent un échafaudage pour de nombreux complexes protéiques, en favorisant les interactions inter- et intra-protéiques (Palidwor et al., 2009). Ainsi, différentes régions de la HTT peuvent interagir entre elles, intégrant parfois d'autres complexes protéiques et menant à plus de 100 conformations structurales différentes (Seong et al., 2010).

#### 2.1.1.b. Les modifications post-traductionnelles de la huntingtine

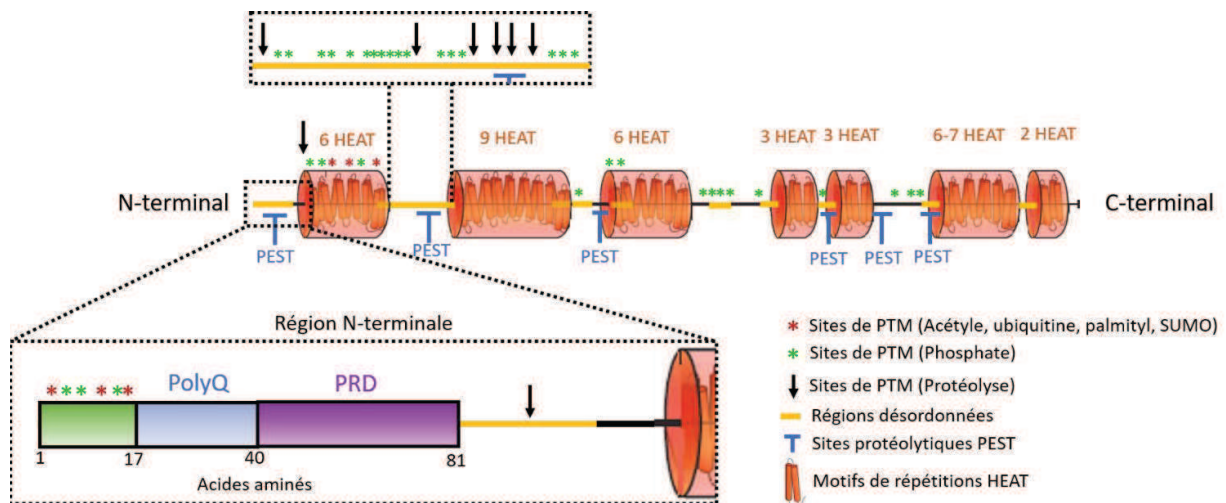
La HTT est sujette à de nombreuses modifications post-traductionnelles (PTM), notamment dans sa partie N-terminale (Figure 10) qui peut être phosphorylée, acétylée,



## Introduction

ubiquitinylée, palmitoylée et sumoylée (Pour revue : Saudou and Humbert, 2016). Le rôle de ces PTMs a été étudié dans le cadre de la mutation de la HTT et pourrait moduler sa toxicité. Par exemple, la dégradation de la HTT mutée peut être favorisée par sa phosphorylation sur les sérines 13, 16 et 421 ou par son acétylation qui va favoriser sa prise en charge par les processus d'autophagie (Jeong et al., 2009; Thompson et al., 2009; Kratter et al., 2016).

De plus, la HTT est sujette au clivage protéolytique par de nombreuses protéases (caspases, calpaïnes, cathepsines, métalloprotéases), dont certaines restent encore à identifier. Les sites protéolytiques sont essentiellement situés dans les domaines PEST (riches en résidus proline -P-, glutamique -E- ou aspartique -D-, sérine -S-, thréonine -T-), principalement présents dans les régions désordonnées de la HTT (Figure 10) (Warby et al., 2008). Le rôle physiologique de ce clivage est encore mal compris, mais ce phénomène arriverait essentiellement dans des conditions pathologiques, souvent associées à une activation des caspases et/ou de la mort cellulaire. Des fragments N-terminaux de la HTT mutée ont été étudiés pour leurs rôles possibles dans la toxicité de la mutation. Néanmoins, Wellington et collaborateurs (2002) montrent que le clivage de la HTT intervient même en condition sauvage (Wellington et al., 2002).



**Figure 10 : Représentation schématique de la séquence de la protéine HTT humaine.**

La HTT comporte plusieurs domaines d'interaction HEAT et, dans sa partie N-terminale, un domaine d'interaction PRD à côté de l'expansion polyQ. La HTT comporte de nombreux sites de PTMs : plusieurs sites sont concentrés dans la région N-terminale de 17 acides aminés qui précède l'expansion polyQ mais d'autres sites sont présents également tout le long de sa séquence protéique. PTM : modifications post-traductionnelles ; HEAT : Huntingtine, Elongation Factor 3, Protein phosphatase 2A, TOR1 ; PEST : Proline, glutamate ou aspartate, sérine, thréonine ; PRD : domaine riche en proline ; polyQ : polyglutamines. D'après Saudou et Humbert, 2016.

### 2.1.1.c. *Interactions et rôles physiologiques de la huntingtine*

La HTT interagit avec de nombreuses protéines impliquées dans la dynamique cellulaire, le métabolisme, le renouvellement des protéines et l'expression des gènes. De par ses interactions, la HTT est donc au centre de nombreuses fonctions cellulaires. Bien que plusieurs de ses fonctions biologiques soient encore en cours de caractérisation, certaines ont été bien décrites (Pour revue : Saudou and Humbert, 2016), notamment son rôle crucial dans le développement du système nerveux. En effet, plusieurs études ont montré que chez la Souris, l'inactivation du gène *Hdh* (*Knock-out* – KO) durant le développement embryonnaire était létal (Duyao et al., 1995; Nasir et al., 1995; Zeitlin et al., 1995). Même avec une baisse d'expression de 50%, les souris meurent rapidement après la naissance et présentent des malformations du cortex et du striatum (White et al., 1997). Ces résultats sont supportés par des études qui ont montré que la HTT serait donc impliquée dans la différenciation des neuroblastes (Reiner et al., 2001) et la migration des neurones (Tong et al., 2011; Barnat et al., 2017).

La HTT aurait également des propriétés anti-apoptotiques et/ou pro-survie. En effet, la HTT bloque l'activation des caspases 3 et 9 (Rigamonti et al., 2001; Zhang et al., 2006), favorise la transcription du BDNF, son transport le long de l'axone et sa libération vésiculaire au niveau des synapses cortico-striatales (Zuccato et al., 2001; Gauthier et al., 2004), un mécanisme particulièrement important car le striatum ne synthétise pas ce facteur neurotrophique (Baquet et al., 2004).

La HTT est ainsi impliquée dans le trafic vésiculaire, par son rôle dans la machinerie des moteurs moléculaires. En interagissant directement avec la dynéine et indirectement avec la dynactine et la kinésine, la HTT contrôle le transport antérograde et rétrograde dans l'axone et les dendrites des neurones (Gauthier et al., 2004; Colin et al., 2008; Twelvetrees et al., 2010; Liot et al., 2013; Wong and Holzbaur, 2014). La HTT facilite également le transport cellulaire en augmentant la vitesse des vésicules et en coordonnant la direction des transports (Gauthier et al., 2004; Colin et al., 2008).

Bien que la HTT soit largement présente dans le cytoplasme, elle est également retrouvée dans le noyau où elle contribue à la régulation de la transcription. En effet, elle peut interagir avec de nombreux facteurs de transcription et régulateurs transcriptionnels (Pour

## Introduction

revue : Saudou and Humbert, 2016) tels que CBP (*cAMP Response Element (CREB)-Binding Protein*), *NeuroD*, Sp1 (*Specificity protein 1*), NF- $\kappa$ B (*Nuclear factor  $\kappa$ B*) et p53 (*Tumor suppressor protein 53*). La HTT interagit aussi avec des activateurs et répresseurs transcriptionnels, par exemple TAFII130, REST/NRSF (*Repressor element-1 transcription factor/neuron restrictive silencer factor*) et NCOR (*Nuclear co-repressor*). Par ses interactions, la HTT peut favoriser l'activation ou la répression de la transcription de certains gènes. Comme nous l'avons mentionné plus haut, la HTT favorise la transcription du gène codant pour le BDNF, dont le promoteur contient un motif NRSE, en séquestrant REST/NRSF dans le cytoplasme, empêchant ainsi la formation du complexe répresseur RE1/NRSE au niveau du gène *BDNF* (Zuccato et al., 2001).

### 2.1.2. La huntingtine mutée

#### 2.1.2.a. De la fragmentation à l'agrégation

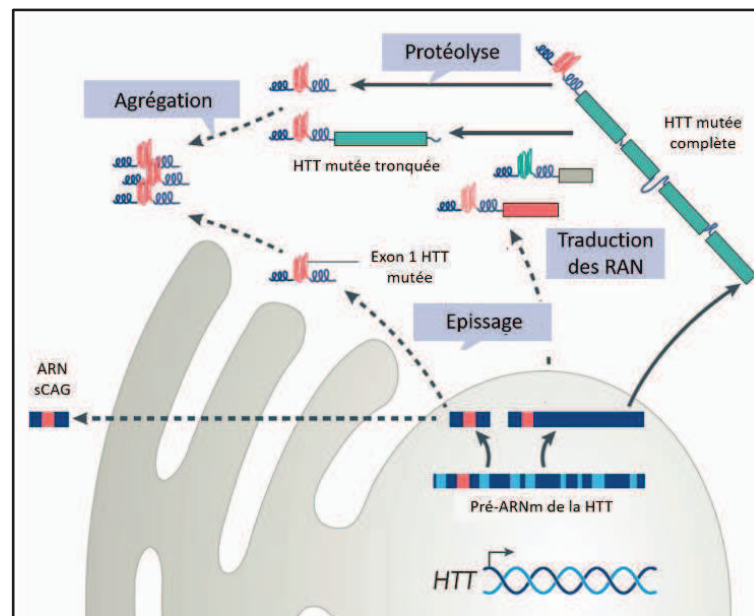
Lorsque la HTT est mutée et comporte une expansion anormalement grande de polyQ dans sa partie N-terminale, ses propriétés changent. Un ensemble considérable de données indique que le clivage de la HTT est une étape clé du mécanisme pathogénique de la MH. En effet, des fragments ont été détectés dans le cerveau *post-mortem* de patients et de modèles murins de la MH (Lunkes et al., 2002; Landles et al., 2010).

Les fragments peuvent être générés par protéolyse de la HTT (cf partie [2.1.1.b Les modifications post-traductionnelles de la huntingtine](#), p.31) ([Figure 11](#)) et regroupés en deux catégories : des fragments N-terminaux toxiques contenant l'expansion de polyQ, et des fragments C-terminaux dont le rôle est mal caractérisé. El-Daher et collaborateurs (2015) ont montré que des clivages spécifiques altèrent les interactions intramoléculaires de la HTT et que les fragments C-terminaux induiraient une toxicité *via* un déclenchement du stress du réticulum endoplasmique menant à la mort cellulaire (El-Daher et al., 2015).

Les fragments N-terminaux toxiques peuvent aussi être générés par un épissage aberrant de l'intron 1 de la *HTT* mutée, dont l'ARNm polyadénylé correspondant est traduit en une protéine contenant seulement l'exon 1 de la HTT ([Figure 11](#)). Ce fragment est particulièrement toxique pour les neurones (Sathasivam et al., 2013). Les fragments N-terminaux de la HTT peuvent être transloqués dans le noyau, interagir avec les mécanismes transcriptionnels,

## Introduction

contribuant ainsi au dysfonctionnement des neurones et à leur dégénérescence (Saudou et al., 1998; Landles et al., 2010; Ross and Tabrizi, 2011; Saudou and Humbert, 2016).



**Figure 11 : Les multiples variants toxiques de la HTT mutée.**

Les fragments de HTT mutée, particulièrement celui issu de l'exon 1, sont toxiques et peuvent être générés de plusieurs manières : par protéolyse de la HTT complète, par un épissage aberrant de l'ARN de la HTT mutée ou encore suite à un décalage du cadre de lecture entraînant la formation de RAN (*repeat-associated non ATG*). Ces fragments peuvent ensuite former des oligomères et des agrégats. L'ARN de la HTT mutée peut aussi former de petits ARNs en épingle à cheveux (ARNs sCAG). D'après Caron et al., 2018.

Des ARNm sens et antisens avec décalage du cadre de lecture et qui ne sont pas ATG dépendant peuvent être produits. Par conséquent, des protéines d'expansion homopolymériques de type polyAla, polySer, polyLeu et polyCys appelées RAN (*Repeat-Associated Non ATG*), sont traduites, s'accumulent et s'agrègent (Figure 11) (Bañez-Coronel et al., 2015). De même, les ARNs de la HTT mutée peuvent former des structures en épingles à cheveux, les ARNs sCAG (Figure 11), qui interfèrent avec la transcription des gènes et les fonctions cellulaires (Bañez-Coronel et al., 2012).

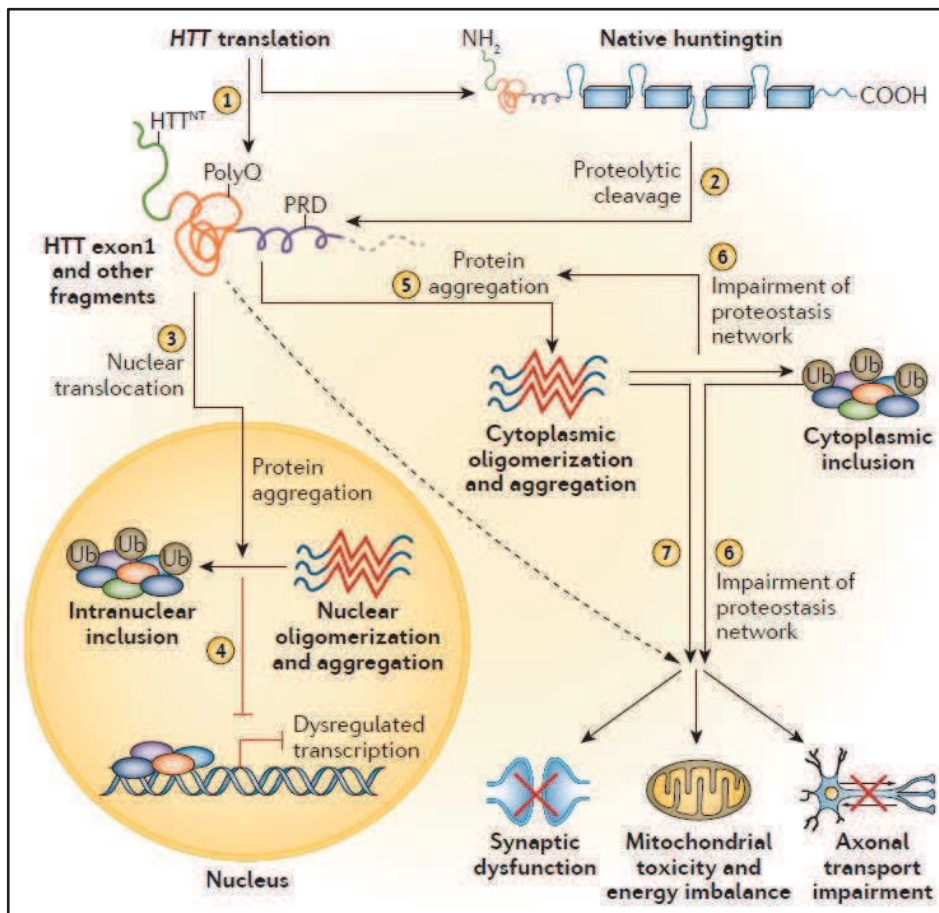
Par ailleurs, la structure tridimensionnelle de la HTT mutée et de ses fragments étant modifiée par l'expansion de polyQ, ceux-ci ont une forte propension à s'associer pour former des oligomères qui s'agrègent dans le noyau et le cytoplasme des neurones, chez les patients comme chez les modèles murins de la MH (Figure 12) (Trottier et al., 1995; Davies et al., 1997; Difiglia et al., 1997; Gutekunst et al., 1999; Ross and Poirier, 2005). L'agrégation de la HTT mutée perturbe de nombreux mécanismes cellulaires conduisant progressivement à la mort

## Introduction

neuronale (Figure 13) : au niveau nucléaire, les agrégats provoquent une dérégulation transcriptionnelle en séquestrant de nombreux facteurs et co-facteurs transcriptionnels (cf partie **2.3.2 Interaction de la huntingtine mutée avec les acteurs de la transcription**, p.51) (Steffan et al., 2000; Nucifora Jr., 2001; Ross and Tabrizi, 2011).

Au niveau cytoplasmique, les agrégats de HTT mutée perturbent la protéostasie en affectant les mécanismes de clairance protéique, le transport axonal ou encore le métabolisme mitochondrial (Pour revue : Ross and Tabrizi, 2011) (Figure 13). De plus, le rôle cytotoxique des agrégats de HTT mutée est démontré par des études visant à réduire l'agrégation, ce qui montrent un effet bénéfique de cette réduction sur les modèles murins et *in vitro* de la MH (Chopra et al., 2007; Popiel et al., 2012; Safren et al., 2014; Takeuchi and Nagai, 2017).

Bien que les évidences en faveur de la cytotoxicité des agrégats de HTT mutée soient nombreuses, certaines études suggèrent qu'ils pourraient également avoir un effet protecteur en réduisant la quantité de HTT mutée soluble particulièrement toxique. Effectivement, la quantité de HTT mutée soluble est corrélée à la mort neuronale. Les travaux de Arrasate et collaborateurs (2004) montrent qu'un grand nombre de neurone dégénère sans même comporter d'agrégats de HTT mutée (Kim et al., 1999; Arrasate et al., 2004). De plus, la suppression de la formation des agrégats augmente la mort neuronale liée à la HTT mutée (Saudou et al., 1998). Enfin, il a été montré que les agrégats de HTT mutée, en réduisant la quantité de HTT mutée soluble, favorisent la survie neuronale (Saudou et al., 1998; Arrasate et al., 2004; Miller et al., 2010).



**Figure 13 : Protéotoxicité de la HTT mutée et de ses fragments.**

Les fragments de HTT mutée sont particulièrement toxiques pour les neurones et sont formés par clivage protéolytique de la HTT (2). Un autre fragment, appelé exon 1 de la HTT, est généré par un épissage anormal (1). Ces fragments toxiques peuvent entrer dans le noyau (3), où ils vont former des oligomères et des agrégats. Ces agrégats, par la séquestration de nombreux facteurs, perturbent la machinerie transcriptionnelle et l'expression des gènes (4). Les fragments toxiques peuvent également s'agréger dans le cytoplasme des neurones (5) et perturber l'ensemble de la protéostasie et des fonctions cellulaires (6, 7). Cette altération globale de la cellule exacerbe davantage l'agrégation de la HTT mutée qui n'est plus éliminée (6) (Bates *et al.* 2015).

### 2.1.2.b. Huntingtine mutée : Perte de fonction ou gain de fonction toxique ?

Le modèle conventionnel des maladies neurodégénératives, comme la MH, a été celui du gain de fonction toxique : les recherches ont été concentrées sur l'identification et la caractérisation des protéines toxiques dans chaque maladie.

Dans la MH, de nombreux arguments supportent l'idée que l'expansion anormale de polyQ confère à la HTT des propriétés toxiques. Premièrement, le mode de transmission dominant de la MH montre un gain de fonction, puisqu'un seul allèle muté est suffisant pour déclencher la maladie (Menalled *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2012b; Bates *et al.*, 2015).

## Introduction

Deuxièmement, l'expansion anormale de CAG est elle-même toxique puisque son expression, seule ou avec fragment de la HTT, provoque des symptômes neurologiques chez la Souris (cf partie [1.5.1.a Expression du fragment N-terminal de la huntingtine](#), p.25). Troisièmement, les fragments produits après clivage ou épissage de la HTT sont eux-mêmes toxiques et s'agrègent. Ils sont détectés très tôt, avant le début de la pathogénèse (Wellington et al., 2002; Van Raamsdonk et al., 2005a).

Cependant, la pathogénèse ne résulterait pas uniquement du gain de fonction toxique de la HTT mutée. Des études montrent qu'elle serait également le résultat d'une perte progressive de la fonction normale de la HTT. Le modèle KO homozygote pour la HTT étant léthal (Duyao et al., 1995; Nasir et al., 1995; Zeitlin et al., 1995), des souris adultes avec un KO conditionnel de la HTT au niveau cérébral ont été générées et présentent une neurodégénérescence progressive ressemblante à la MH (Dragatsis et al., 2000).

De plus, chez les patients, majoritairement hétérozygotes, la HTT non mutée est réduite de moitié. Des études suggèrent qu'une baisse de HTT non mutée a des conséquences importantes à la fois dans les contextes sain et muté : d'une part, les souris hétérozygotes KO pour la HTT présentent des déficits cognitifs et moteurs ainsi qu'une neurodégénérescence dans le STN et le globus pallidus, un phénotype modéré comparable à celui des souris KI modèles de la MH (Nasir et al., 1995; O'Kusky et al., 1999) ; d'autre part, Van Raamsdonk et collaborateurs (2005) ont généré un modèle murin de la MH, la souris YAC128, n'exprimant pas de HTT sauvage mais uniquement de la HTT mutée. Ces souris présentent un dysfonctionnement moteur et une espérance de vie réduite par rapport au modèle YAC128 normal (Van Raamsdonk et al., 2005b). Ces résultats supportent l'hypothèse qu'une partie de la pathogénèse de la MH est liée à la perte de fonction de la HTT sauvage.

En conclusion, plusieurs altérations co-existent, la mutation confère un gain de fonction toxique à la HTT, une caractéristique retrouvée dans toutes les maladies à expansion de polyQ (les ataxies cérébelleuses, ou l'amyotrophie spino-bulbaire par exemple – Pour revue : Orr, 2012), ce qui explique également certaines ressemblances phénotypiques. Mais la mutation altère aussi les fonctions normales de la HTT, et leur dysfonctionnement contribue au mécanisme pathogénique de la MH.

## 2.2. Protéotoxicité cytoplasmique de la huntingtine mutée

La mutation de la HTT est impliquée dans la perturbation de nombreux processus cellulaires, confrontant les neurones à un stress qui peut entraîner leur apoptose. Au niveau cytoplasmique, elle va modifier la clairance des protéines, les interactions protéiques, la fonction des mitochondries, du réticulum endoplasmique, le trafic axonal et aussi l'activation des récepteurs NMDA (Pour revue : Ross and Tabrizi, 2011).

### 2.2.1. Altération de la protéolyse intracellulaire

La protéolyse cellulaire joue un rôle essentiel dans la physiologie de la cellule et le maintien de l'homéostasie cellulaire. Son dysfonctionnement est impliqué dans de nombreuses pathologies, dont la MH. Les cellules ont deux voies distinctes, mais liées, de dégradation des protéines toxiques : l'autophagie et le système ubiquitine-protéasome (UPS).

#### 2.2.1.a. L'autophagie

L'autophagie est divisée en trois catégories en fonction de la manière dont le cargo est adressé aux lysosomes : (1) l'autophagie coordonnée par les chaperonnes adresse des protéines cytosoliques directement aux lysosomes ; (2) la micro-autophagie dégrade des fragments du cytosol par invagination de la membrane des lysosomes ; (3) la macro-autophagie, plus communément appelée autophagie, séquestre des portions importantes du cytoplasme dans des vésicules appelées autophagosomes qui, après maturation, fusionnent avec les lysosomes pour permettre la dégradation.

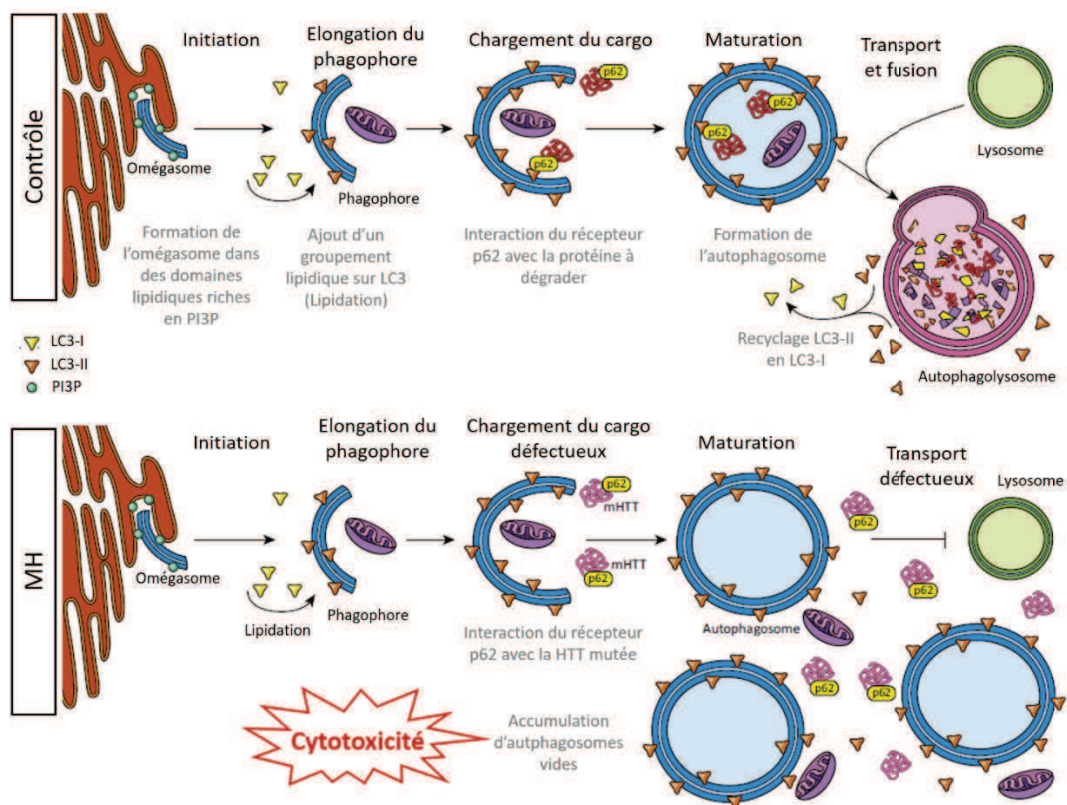
Bien que l'autophagie soit considérée comme un mécanisme de dégradation en masse, il existe des formes d'autophagies sélectives, pour la mitochondrie par exemple, ou pour les protéines agrégées comme la HTT mutée. L'autophagie sélective implique des récepteurs autophagiques tels que p62 ou OPTN. Ceux-ci créent un lien entre le cargo et les protéines ancrées dans la membrane autophagosomale, telle que la protéine LC3-II, et permettent l'adressage sélectif des cargos à dégrader vers l'autophagosome.

Une accumulation des autophagosomes ainsi qu'une augmentation des marqueurs autophagiques LC3-II et p62 ont été reportées dans le cerveau de souris modèles de la MH (Martinez-Vicente et al., 2010; Lee et al., 2012a). De même, la kinase mTOR, inhibant la



## Introduction

formation des autophagosomes, est séquestrée dans les agrégats de HTT mutée, empêchant ainsi son activité (Ravikumar et al., 2004). L'ensemble de ces éléments suggère une augmentation des processus autophagiques dans la MH, mais celle-ci n'est pas accompagnée d'une augmentation de la dégradation protéique. En effet, les travaux de Martinez-Vicente et collaborateurs (2010) montrent que les autophagosomes, bien qu'augmentés, sont vides de contenu en raison d'une altération de la reconnaissance du cargo (Martinez-Vicente et al., 2010). Ainsi, bien que l'initiation de l'autophagie en réponse à la présence d'agrégats de HTT mutée soit augmentée, la HTT agrégée et les organelles endommagées ne sont pas dégradées et s'accumulent dans le cytoplasme, contribuant à la cytotoxicité (Figure 14). Les mécanismes qui sous-tendent ce défaut de reconnaissance du cargo ne sont pas décrits mais pourraient être liés à une interaction aberrante entre le récepteur autophagique p62 et la HTT mutée (Martinez-Vicente et al., 2010). De plus, la HTT mutée amplifie les défauts mécanistiques de l'autophagie dans la MH, en dérégulant la transcription des gènes associés à ces processus et en altérant le trafic vésiculaire (Pour revue : Martin et al., 2015).

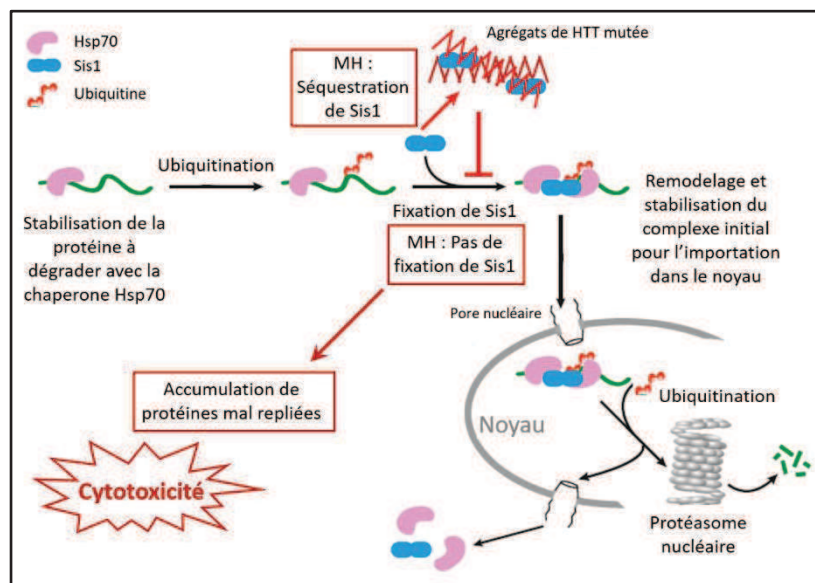


**Figure 14 : Dysfonctionnement autophagique dans la MH.**

L'autophagie implique la formation d'une vésicule avec une double membrane lipidique, l'autophagosome, formée à partir de son précurseur, le phagophore. Le phagophore est lui-même formé par une élongation de l'omégasome, une protusion du réticulum endoplasmique (RE) enrichie en lipide PI3P. Une fois formé, l'autophagosome incorpore les organelles et les protéines à dégrader, nécessitant parfois un récepteur autophagique comme p62. Il fusionne ensuite avec le lysosome pour réaliser la protéolyse. Dans la MH (en bas), le processus de chargement du cargo est défectueux car la HTT mutée interagirait avec le récepteur p62. Ce défaut entraîne une accumulation d'autophagosomes vides et une cytotoxicité. (D'après Martin et al., 2015)

2.2.1.b. Le système UPS

Les cibles du système de dégradation UPS sont marquées par conjugaison de chaînes d'ubiquitine. Ces molécules polyubiquitinylées sont ensuite reconnues par un complexe protéolytique, le protéasome 26S. Le marquage ubiquitine permet une grande précision dans la reconnaissance des substrats, mais le système UPS dégrade généralement les protéines solubles, son efficacité étant plus limitée pour les protéines agrégées comme la HTT (Shaid et al., 2013).



**Figure 15 : Dysfonctionnement du système UPS dans la MH.**

Le système UPS nécessite l'intervention de chaperonnes pour stabiliser les protéines à dégrader. La chaperonne Sis1 joue un rôle très important dans le processus protéolytique puisque sa fixation à la protéine mal repliée est nécessaire pour son import dans le noyau, où elle sera dégradée par le protéasome. Or dans la MH, Sis1 et d'autres chaperonnes sont séquestrées dans les agrégats de HTT mutée, empêchant ainsi la dégradation des protéines mal repliées qui s'accumulent dans la cellule. (D'après Park et al., 2013)

La HTT peut être ubiquitinée sur différents acides aminés pour être dégradée, limitant ainsi la toxicité de la mutation. Cependant, le système UPS est altéré dans la MH et contribue à l'accumulation de la HTT mutée en agrégats insolubles contenant de l'ubiquitine (Sieradzan et al., 1999; Waelter et al., 2001; Mitra et al., 2009). En effet, les agrégats de HTT mutée séquestrent des facteurs du système UPS, les chaperonnes Hsp40, Sis1p par exemple, qui empêchent ainsi la livraison de protéines mal repliées au protéasome (Figure 15) (Park et al., 2013). Les protéasomes eux-mêmes seraient également séquestrés dans les agrégats (Holmberg et al., 2004), mais il a été montré que ce recrutement est réversible et que les protéasomes séquestrés restent actifs et accessibles aux substrats (Schipper-Krom et al., 2014). Une défaillance du système UPS pourrait conduire également à une augmentation de

## Introduction

l'autophagie *via* une communication entre les voies de dégradation pour tenter de maintenir une protéostase normale dans les neurones affectés par la toxicité de la HTT mutée (Pandey et al., 2007; Ding and Yin, 2008).

### 2.2.2. Stress du réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique (RE) est un lieu essentiel de synthèse et de maturation des protéines, où elles sont repliées et assemblées en complexes multiprotéiques. Le repliement de ces protéines implique des protéines chaperonnes, telles que BiP (*Binding immunoglobulin Protein*) ou GRP94, qui préviennent les erreurs de repliement. Les protéines mal repliées ne sont pas transférées vers l'appareil de Golgi mais retenues dans le RE où elles sont soit prises en charge par les protéines chaperonnes pour acquérir une conformation correcte, soit ciblées par la voie ERAD (*Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation*) pour être ubiquitinées et dégradées par le protéasome.

En condition pathologique, comme dans le cas de la MH, la quantité de protéines possédant une conformation anormale augmente dans le RE, jusqu'à saturation des protéines chaperonnes et des protéines de dégradation. Cette accumulation de protéines déclenche un stress du RE qui active la réponse UPR (*Unfolded Protein Response*). Cette réponse a pour but d'éliminer, de replier les protéines endommagées ou de déclencher la mort cellulaire par apoptose si le stress est trop intense ou trop prolongé (Hetz and Papa, 2018).

Plusieurs études ont identifié le stress du RE comme un déterminant crucial de la toxicité cellulaire dans la MH. En effet, le stress du RE a été observé très précocement, avant la formation d'agrégats de HTT mutée, et de façon durable dans des modèles *in vitro* (Duennwald and Lindquist, 2008; Leitman et al., 2013), murins (Carnemolla et al., 2009; Cho et al., 2009; Noh et al., 2009; Vidal et al., 2012) et dans le cerveau *post-mortem* de patients (Carnemolla et al., 2009). Le stress du RE serait déclenché par une inhibition de l'ERAD suite à l'interaction de la HTT mutée soluble avec différents facteurs (Duennwald and Lindquist, 2008; Leitman et al., 2013). Par exemple, les protéines ATPase et chaperonne p97/VCP impliquées dans l'ERAD, ainsi que leurs cofacteurs Npl4 et Ufd1, sont séquestrés par la HTT mutée. Cette interaction entraîne un stress du RE, la réponse UPR et l'apoptose des neurones (Leitman et al., 2013). D'autres facteurs cellulaires sont séquestrés dans les agrégats, tels que USP14 (*Ubiquitin specific protease 14*) ou ATF5 (*Activating transcription factor 5*), un facteur de

## Introduction

transcription favorisant l'expression de gènes anti-apoptotiques. Tous deux jouent un rôle important dans la réduction du stress du RE (Hyrskyluoto et al., 2014; Hernandez et al., 2017). Une des conséquences du stress du RE est l'altération des fonctions mitochondriales avec une augmentation du stress oxydatif, un élément clé de la cytotoxicité de la HTT mutée.

### 2.2.3. Altération du métabolisme énergétique

#### 2.2.3.a. Le dysfonctionnement mitochondrial

Les neurones, par leur forte consommation énergétique, sont davantage susceptibles aux défaillances énergétiques et aux dommages oxydatifs. De plus, le striatum est particulièrement sensible à une altération du métabolisme oxydatif (Beal, 1992; Damiano et al., 2010). Un hypométabolisme a été observé par tomographie par émission de positrons dans le striatum des patients Huntington (Beal, 1992), ainsi qu'une altération globale du métabolisme énergétique (Pour revue : Bonvento et al., 2017). Les mitochondries jouent un rôle central dans la survie cellulaire en contrôlant le métabolisme énergétique, les voies apoptotiques et l'homéostasie du calcium, et de nombreux dysfonctionnements ont été décrits dans la MH (Pour revue : Liot et al., 2017; Zheng et al., 2018).

En effet, les premières études biochimiques sur des échantillons *post-mortem* de striatum de patients ont révélé une baisse de l'activité des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale II/III et IV (Brennan et al., 1985; Butterworth et al., 1985; Gu et al., 1996), du complexe pyruvate déshydrogénase (Sorbi et al., 1983; Butterworth et al., 1985) et de l'aconitase (Tabrizi et al., 1999; Sorolla et al., 2008). Ces dysfonctionnements ont également été retrouvés chez des modèles murins de la MH (Benchoua et al., 2006; Zourlidou et al., 2007; Damiano et al., 2013). En revanche, ces altérations ne sont pas présentes aux stades précoces de la maladie (Guidetti et al., 2001) et constituent probablement un événement relativement tardif associé à la dégénérescence des neurones.

Plusieurs facteurs mitochondriaux sont défectueux en raison de leur interaction directe avec la HTT mutée. Parmi eux, le facteur de transcription PGC-1 $\alpha$ , capable d'activer l'expression de gènes anti-oxydants et nécessaire à la biogenèse et à l'activité mitochondriale, est sous-exprimé dans le cerveau de modèles murins de la MH (Figure 16) (Cui et al., 2006; McGill and Beal, 2006). En effet, la HTT mutée peut directement se lier à PGC-1 $\alpha$ , inhibant ainsi

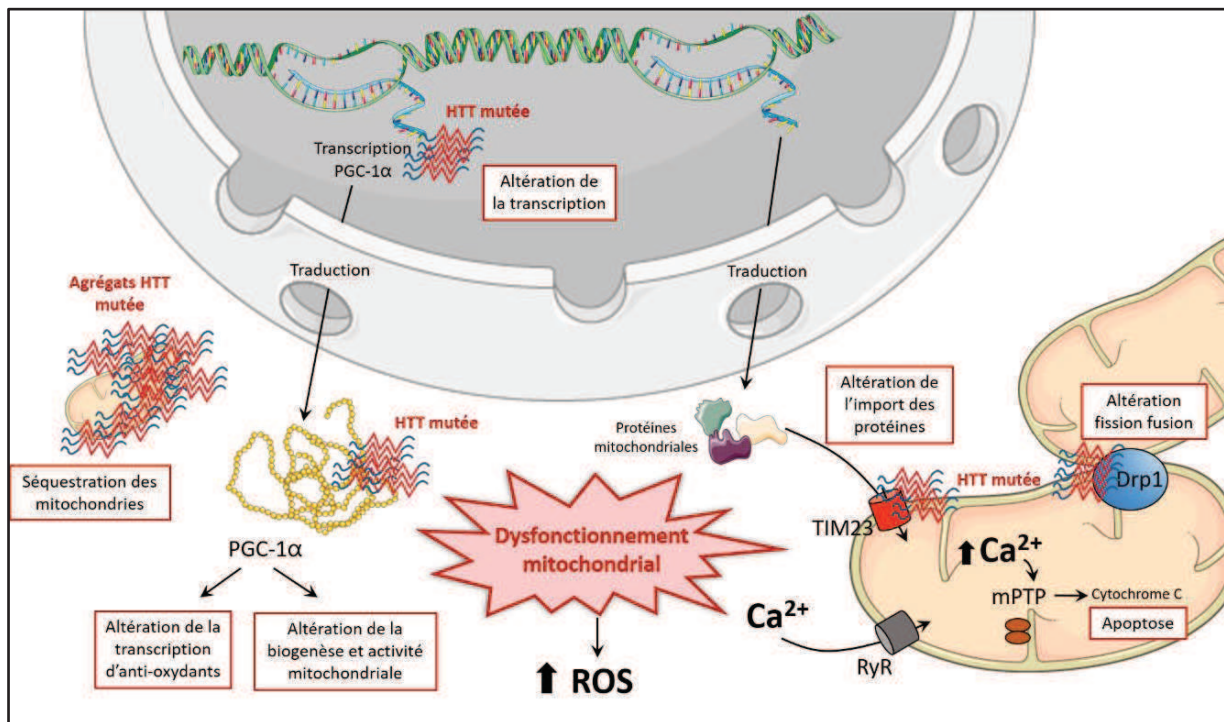
## Introduction

l'activation de ses cibles et la transcription de gènes anti-oxydants tels que *SOD1* et *SOD2* (*Superoxide dismutase 1 et 2*), et de gènes mitochondriaux tels que *Tfam* (*Transcription factor A*) et *CytC* (*Cytochrome c*). Cette inhibition peut également être indirecte : la HTT mutée, en séquestrant le complexe CREB/TAF4, empêche l'activation du promoteur du gène codant pour PGC-1 $\alpha$  et donc sa transcription (Cui et al., 2006). De plus, une interaction entre la HTT mutée et le complexe d'importation de protéines mitochondriales TIM23 a été décrite ([Figure 16](#)). La majeure partie des protéines mitochondriales étant encodée par l'ADN nucléaire, après leur traduction, elles sont transloquées dans la mitochondrie grâce au complexe TIM23. L'inhibition de ce complexe par la HTT mutée provoque alors un défaut d'importation des protéines mitochondriales et induit la mort neuronale (Yano et al., 2014; Yablonska et al., 2019).

En plus de l'altération des fonctions mitochondriales, des défauts dans la dynamique des mitochondries elles-mêmes ont également été observés dans la MH. Les mitochondries peuvent être séquestrées dans les agrégats de HTT mutée, ralentissant leur motilité (Chang et al., 2006; Song et al., 2011; Shirendeb et al., 2012). Par conséquent, le ralentissement de l'incorporation des protéines peut conduire à un dysfonctionnement mitochondrial (Orr et al., 2008). Celui-ci est aussi accentué par une baisse de leur potentiel de membrane observée dans des modèles *in vitro* (Sawa et al., 1999; Panov et al., 2002; Naia et al., 2015) et par une altération de la fission et fusion mitochondriales causées par l'interaction de la protéine Drp1 (*Dynamin related protein*) avec la HTT mutée ([Figure 16](#)) (Shirendeb et al., 2011, 2012; Song et al., 2011). La fission et la fusion mitochondriales constituent un mécanisme impliqué dans le recyclage dynamique des mitochondries, tout comme l'autophagie sélective de la mitochondrie (mitophagie). Celle-ci est importante pour dégrader les mitochondries altérées et maintenir un réseau fonctionnel. Or la mitophagie est également défectueuse dans la MH, la formation des autophagosomes étant bloquée par la HTT mutée (Wong and Holzbaur, 2014) (cf partie [2.2.1.a L'autophagie](#), p.39).

## Introduction

Enfin, les mitochondries contrôlent également l'homéostasie du calcium puisqu'elles permettent son stockage lorsqu'il est trop abondant dans le cytosol et son relargage quand son niveau est trop faible. Cependant, cette propriété « tampon » des mitochondries est réduite dans le cerveau des patients et modèles murins de la MH (Panov et al., 2002; Brustovetsky, 2016). Or un maintien de l'homéostasie calcique est nécessaire pour la survie neuronale, car une surconcentration peut conduire à l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale (mPTP) dans la membrane interne. L'ouverture du mPTP perturbe les niveaux d'ATP dans les mitochondries et entraîne un relargage de cytochrome C pouvant déclencher l'apoptose (Figure 16) (Green and Reed, 1998; Krieger and Duchen, 2002; Halestrap, 2006; Rasola et al., 2010).



**Figure 16 : Dysfonctionnement mitochondrial dans la MH.**

La HTT mutée dans le noyau inhibe la transcription de gènes importants pour la mitochondrie, notamment le gène codant pour la protéine PGC-1 $\alpha$  qui, elle-même a ses fonctions altérées à cause de son interaction avec la HTT mutée cytoplasmique. D'autres processus mitochondriaux sont perturbés par la mutation comme l'import des protéines mitochondriales synthétisées dans le noyau, l'homéostasie du calcium et la propriété « tampon » des mitochondries, qui entraîne l'ouverture du pore mPTP et l'apoptose. De plus, la HTT mutée séquestre des mitochondries et interagit avec Drp1, entraînant un dysfonctionnement de la fission et fusion mitochondriales. Ce dysfonctionnement global des mitochondries dans la MH contribue à augmenter la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), qui perturbe l'ensemble des mécanismes cellulaires.

### 2.2.3.b. *Le stress oxydatif*

Le stress oxydatif est provoqué par une accumulation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) causée par un dépassement des mécanismes cellulaires anti-oxydants. Cette

## Introduction

accumulation endommage les protéines, l'ADN et les lipides, et contribue à la pathogénèse de la MH.

Les ROS endogènes sont produits majoritairement par la synthèse d'ATP dans la mitochondrie. Les dysfonctionnements mitochondriaux dans la MH (cf partie [2.2.3.a Le dysfonctionnement mitochondrial](#), p.43) favorisent alors la production de ROS ([Figure 16](#)). En effet, une augmentation de 8-OHdG (8-hydroxydeoxyguanosine), un marqueur d'ADN oxydé, est retrouvé dans le striatum des personnes atteintes de la MH et des modèles animaux, tout comme une augmentation de MDA (Malondialdehyde), un marqueur de la peroxydation lipidique (Browne et al., 1997; Tabrizi et al., 2000).

L'altération mitochondriale et le stress oxydatif sont étroitement liés et fonctionnent en synergie, mais de multiples voies produisent des ROS endogènes, comme les enzymes du RE, le cytochrome P450 ou encore les oxydases NADPH de la membrane plasmique (Pour revue : Kumar and Ratan, 2016; Zheng et al., 2018).

## 2.3. Protéotoxicité nucléaire de la huntingtine mutée

### 2.3.1. [Dérégulations transcriptionnelles](#)

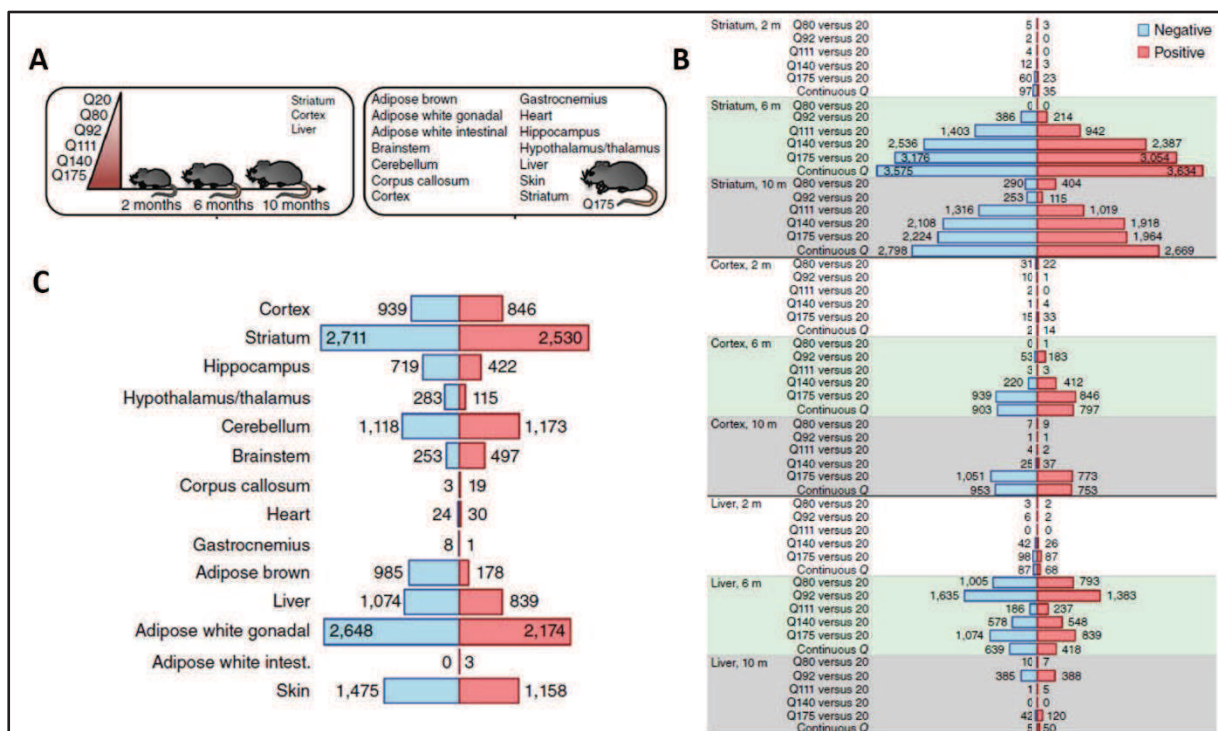
De nombreuses données transcriptomiques ont été générées les 15 dernières années à partir de modèles animaux et cellulaires de la MH, mais aussi de tissus de patients *post-mortem* (Desplats et al., 2006; Hodges et al., 2006, 2008; Kuhn et al., 2007; Seredenina and Luthi-Carter, 2012 ; Valor, 2014). Ces données ont permis de mettre en évidence une dérégulation précoce de la transcription dans la maladie, affectant l'expression de gènes importants pour le fonctionnement neuronal.

#### 2.3.1.a. [Signature transcriptionnelle des ARNm du striatum](#)

La dérégulation transcriptionnelle est très précoce. Elle apparaît avant les premiers symptômes (Luthi-Carter et al., 2000; Hodges et al., 2006; Hervás-Corpión et al., 2018), puis progresse avec le développement de la maladie (Luthi-Carter et al., 2000; Nguyen et al., 2008; Langfelder et al., 2016).

## Introduction

Récemment, une étude transcriptomique de Langfelder et collaborateurs (2016) à partir d'une série allélique de modèles KI (Figure 17A), révèle que l'amplitude des dérégulations transcriptionnelles dépend du nombre de CAG (Figure 17B) (Langfelder et al., 2016) et que ces altérations sont particulièrement étendues dans le striatum par rapport aux autres structures cérébrales (Figure 17C) (Luthi-Carter et al., 2002; Hodges et al., 2006; Langfelder et al., 2016). Par ailleurs, les gènes spécifiquement exprimés dans le striatum, c'est-à-dire les gènes qui définissent l'identité des neurones striataux et qui sont importants pour la fonction striatale (Tableau I), sont tout particulièrement sous-exprimés chez les souris modèles de la MH et chez les patients (Hodges et al., 2006; Kuhn et al., 2007; Seredenina and Luthi-Carter, 2012; Achour et al., 2015; Francelle et al., 2017; Le Gras et al., 2017; Merienne et al., 2019).



**Figure 17 : Caractéristiques de la dérégulation transcriptionnelle dans la MH.**

(A) Langfelder et collaborateurs (2016) ont utilisé une série allélique de modèles KI (Q20 à Q175) et ont évalué l'amplitude de la dérégulation transcriptionnelle dans la MH selon l'âge, la taille de l'expansion de polyQ et le type de tissu. (B) Le nombre de gènes significativement sur-exprimés (rouge) et sous-exprimés (bleu) (FDR < 0,05) chez les KI par rapport aux WT, augmente avec l'âge des souris et avec le nombre de CAG, essentiellement dans les tissus cérébraux. (C) Le nombre de gènes significativement sur-exprimés (rouge) et sous-exprimés (bleu) (FDR < 0,05) dans plusieurs tissus des souris KI Q175 montre que la dérégulation transcriptionnelle est plus importante dans le striatum. (Langfelder et al., 2016)

Parmi les gènes qui définissent l'identité des neurones striataux sont retrouvés des gènes impliqués dans la neurotransmission, tels que ceux codants pour les récepteurs dopaminergiques D1 et D2 (*Drd1* et *Drd2*), ou des gènes régulant les voies de signalisation



## Introduction

(*Darpp32* ou *PPP1R1B* codant pour l'inhibiteur de la protéine phosphatase 1 ; *Pde10a* codant pour la phosphodiesterase 10A). L'expression de ces gènes d'identité est particulièrement affectée par la mutation Huntington.

Pathway or gene group	Examples of genes with altered expression levels
Neurotransmitter receptors	DRD1A; DRD2; TH; CNR1; ADORA2A*; GABRA5; GABRA4; GABRG2; GABRD; GAD1; GLRB; GRIA1; GRIA3; GRM1; GRM2; GRM3; GRIN2A*; GRIN2B*; SLC1A4; HRH3; OPRM1; OPRK1; OPRD1; HRH3
G-protein receptor signalling	PPP1R1B; ARPP21; GNAL; ADCY5; GNG3; GPR88; GPR6; PDE10A; PDE2A; PDE1B; RGS2; RGS4; RGS9; RASD2; RAS; RAPGEF3; PTPN5; GUCY1A3; GUCY1B3; PRKCB1; NGEF; PAK1
Calcium signalling and homeostasis	RYR1; CALB1; PPP3R1; PCP4/PEP-19; HPCA; RASGRP2; CPNE5; STRN; SCN4B; KCNIP2; KCNA1; SLC24A3; PLCB1; ATP2A2; ITPR1; CAMKK2; CABP1; SYNJ1; TESC
Neurotrophin receptor signalling	BDNF; NTRKB; NTRKA
Synaptic transmission, cytoskeletal and structural proteins	PSD95 (DLG4); ACTN1; NEFL; CPLX1; CPLX2; MARCKS; SYT1; SYNPR; SNAP25; RPH3A; CIT; GSN; SNCA
Neuropeptides	PENK; NPY; PDYN; OXT; AVP; CART; POMC; SST; NTS; CRH
Transcription and chromatin remodelling	POLR2A; PC4; SNF-1 RELATED KINASE; BCL11B; FOXP1; MYT1L; KLF16; PPARGC1A*; NR4A1; ID3
Mitochondrial function; energy metabolism	PPARGC1A; CKMT1; CKB; ATP5C1; PGK1; LDHA; SUCLA2; PCTP; ENO2
Ubiquitin-proteasome system	PSME1; HSPB1; HSPA1B; HSP90AA1
Retinoid signalling	RBP4; RARB; RXRG
Lipid metabolism	SCD 2; LPL; ACADVL; SRD5A1; SLC27A1; STARD4
Transport	VAMP; CAMKV; DNC1; VAMP1; SORT1
Inflammation	FKBP4; B2M; C4B; C4A; C3
Misc. signalling	DUSP1; DUSP6; DUSP5; DUSP14; NNAT; PLK2; OLM4; SLC14A1; CD44; AQP1; CSRP2; NDUFB2; PCDH7; DKK3; YWHAZ; ROCK2; nNOS; ARNTL; TMEM90A; FGF13

### Tableau I : Exemples de gènes dérégulés dans le striatum Huntington.

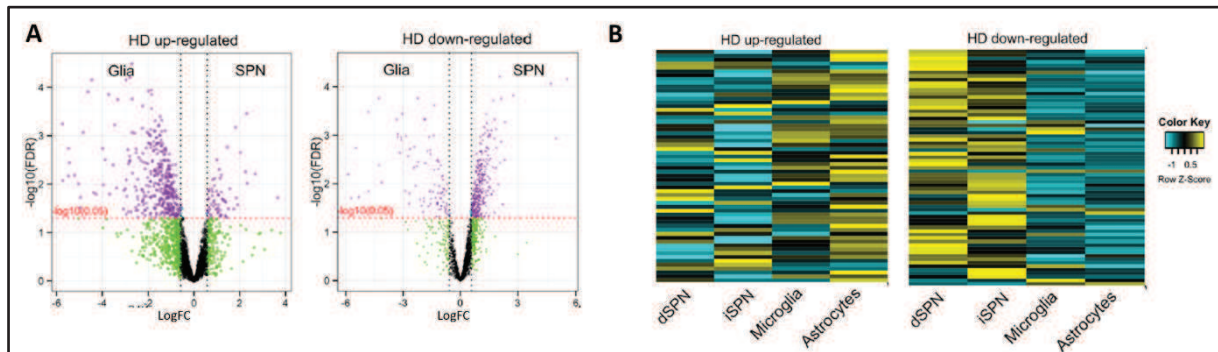
Les gènes sous-exprimés dans le striatum des patients et modèles de la MH partagent une signature fonctionnelle neuronale (neurotransmission, signalisation, neuropeptides, transmission synaptique, homéostasie calcique, transcription). En revanche, les gènes sur-exprimés dans le striatum sont impliqués dans le métabolisme, le neurodéveloppement et l'adhésion cellulaire. (D'après Seredenina and Luthi-Carter, 2012).

Ainsi, les gènes sous-exprimés dans le striatum Huntington par rapport au striatum sain sont impliqués dans des processus fonctionnels neuronaux (*Drd1*, *Drd2*, *Pde10a*, *Darpp32*) (Tableau I). Les gènes sur-exprimés quant à eux, sont moins nombreux et la signature fonctionnelle qui leur est associée est moins robuste. Ils semblent impliqués dans des processus biologiques plus variés tels que l'adhésion cellulaire, le neurodéveloppement, la différenciation neuronale et des fonctions métaboliques (Tableau I) (Iannicola et al., 2000; Hodges et al., 2006; Achour et al., 2015; Valor, 2015; Labadorf et al., 2016; Le Gras et al., 2017; Merienne et al., 2019). Une analyse des gènes dérégulés spécifiquement dans les neurones et les cellules gliales du striatum révèle que les gènes sous-exprimés sont essentiellement neuronaux, tandis que les gènes sur-exprimés proviennent de façon prédominante des cellules gliales (Figure 18) (Merienne et al., 2019). Ces données suggèrent que des mécanismes différents sont impliqués dans la sur- et la sous-expression des gènes dans le striatum Huntington.

Ces signatures transcriptomiques sont retrouvées également dans d'autres structures cérébrales comme le cortex et l'hippocampe, mais elles sont moins robustes (Figure 17C) (Vashishtha et al., 2013; Langfelder et al., 2016).

## Introduction

L'ensemble de ces résultats montre que les processus moléculaires impliqués dans le maintien de l'identité neuronale, particulièrement du striatum, sont altérés dans la MH.



**Figure 18 : Enrichissement spécifique des gènes dérégulés dans les neurones et les cellules gliales du striatum.** (A) Volcano plots représentant l'enrichissement différentiel des gènes sur-exprimés (à gauche) et sous-exprimés (à droite) dans les cellules gliales (Glia) et les neurones du striatum (SPN) (Merienne et al., 2019). (B) Carte de densités représentant la classification hiérarchique de l'expression des 100 gènes les plus sur-exprimés (à gauche) et sous-exprimés (à droite) dans les différents types cellulaires du striatum Huntington (dSPN : MSN-D1 ; iSPN : MSN-D2 ; Microglie ; Astrocytes). L'échelle de couleur correspond aux z-scores des gènes, le jaune et le bleu reflétant une forte et une faible expression respectivement. Une proportion importante de gènes sur-exprimés sont enrichis dans la microglie et les astrocytes par rapport aux neurones, tandis qu'un plus grand nombre de gènes sous-exprimés sont enrichis dans les MSNs-D1 (dSPN) et les MSNs-D2 (iSPN) (Merienne et al., 2019).

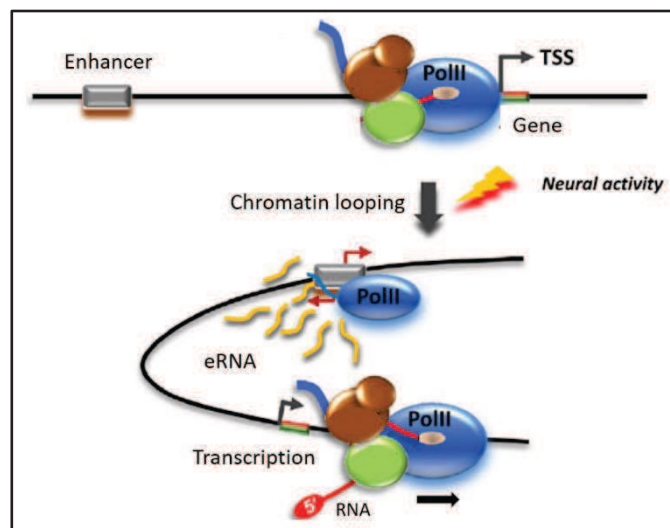
### 2.3.1.b. *Signature transcriptionnelle des ARNs non codants du striatum*

Des changements transcriptionnels sont également observés au niveau des ARNs non codants (Seredenina and Luthi-Carter, 2012; Francelle et al., 2017), tels que les microARNs (miARNs) et les ARNs issus de la transcription des enhancers actifs (eARNs).

Les miARNs sont des facteurs de régulation post-transcriptionnels de l'expression des gènes et ont un rôle important dans le développement, la différenciation neuronale et le maintien des neurones matures (Schratt, 2009; Woldemichael and Mansuy, 2016). L'expression des miARNs est dérégulée dans le striatum de cerveaux de patients et de modèles animaux de la MH (Hoss et al., 2014; Langfelder et al., 2018). En effet, plusieurs études mettent en évidence une augmentation des miRNAs dans les stades précoces de la pathologie du modèle murin YAC128 puis une diminution dans les stades plus tardifs (Lee et al., 2011) (Pour revue : Seredenina and Luthi-Carter, 2012; Kerschbamer and Biagioli, 2016).

## Introduction

Les ARNs « enhancer » (eARN) sont une classe d'ARNs longs non codants, transcrits à partir d'enhancers actifs. Les enhancers sont des régions du génome capables de réguler à distance l'expression des gènes en recrutant, souvent de façon tissu-spécifique, des facteurs de transcription ainsi que l'ARN polymérase II (ARN Pol II) (Plank and Dean, 2014). Cela a pour conséquence la transcription des enhancers en eARNs qui, par des mécanismes encore mal compris, favorisent la transcription de leurs gènes cibles (Figure 19) (Schaukowitch et al., 2014; Arner et al., 2015). L'étude récente de Le Gras et collaborateurs (2017) montre que les eARNs qui régulent les gènes de l'identité striatale sont plus particulièrement dérégulés dans le striatum des souris R6/1, modèle de la MH (Le Gras et al., 2017). Les auteurs ont également montré que la baisse d'expression de ces eARNs serait liée à une baisse de recrutement de l'ARN Pol II (Le Gras et al., 2017).



**Figure 19 : Régulation de la transcription des gènes par les enhancers.**

L'ARN polymérase II (ARN Pol II) est recrutée sous une forme quiescente au niveau du gène. En réponse à une stimulation, l'enhancer du gène est amené à proximité du promoteur par la formation d'une boucle de la chromatine, les eARNs sont alors transcrits et favorisent la transcription du gène. (D'après Schaukowitch et al., 2014)

### 2.3.1.c. Conséquences fonctionnelles de la dérégulation transcriptionnelle

Parmi les changements transcriptionnels décrits précédemment, certains peuvent avoir un rôle compensatoire en contribuant à la réduction du stress protéotoxique dans les neurones, tandis que d'autres contribuent à la vulnérabilité des neurones striataux à la HTT mutée (Pour revue : Seredenina and Luthi-Carter, 2012; Francelle et al., 2014). Par exemple, la baisse d'expression du BDNF, une neurotrophine cruciale pour le développement et le maintien des MSNs, contribue au dysfonctionnement striatal et cortical dans la MH (Zuccato

et al., 2001). La sous-expression de récepteurs nucléaires hormonaux comme PGC-1 $\alpha$  ou PPAR $\gamma$  (Cui et al., 2006) participe à la pathogenèse métabolique de la MH. La dérégulation de la transcription de gènes, tels que *Drd1* et *Drd2*, altère la neurotransmission (Luthi-Carter et al., 2000), tout comme la baisse d'expression des protéines d'ancrage au cytosquelette (PSD95 et ACTN2) (Luthi-Carter et al., 2003), qui régulent la distribution et la fonction des récepteurs NMDA. Par ailleurs, des mécanismes de compensation transcriptionnelle affectant des fonctions métaboliques se mettent en place de façon très précoce pour tenter de faire face aux effets toxiques de la HTT mutée (Francelle et al., 2014). Parmi ces mécanismes compensatoires, RASD2, qui interagit avec la HTT mutée et augmente sa toxicité, est sous-exprimé dans le striatum des patients et modèles murins de la MH (Seredenina et al., 2011). Une sur-expression des sous-unités activatrices du protéasome est également décrite chez les souris R6/2 et serait protectrice contre la toxicité de la mutation (Luthi-Carter et al., 2000; Seredenina and Luthi-Carter, 2012; Moumné et al., 2013; Valor, 2015).

### 2.3.2. [Interaction de la huntingtine mutée avec les acteurs de la transcription](#)

Un des mécanismes à l'origine de la dérégulation transcriptionnelle résulterait de l'interaction anormale de la HTT mutée avec des facteurs et/ou co-facteurs de transcription (Pour revue : Seredenina and Luthi-Carter, 2012; Moumné et al., 2013; Valor, 2015).

CBP et son homologue p300, sont des co-activateurs transcriptionnels qui interagissent avec de nombreux régulateurs transcriptionnels et facilitent l'assemblage de la machinerie transcriptionnelle. CBP et p300 possèdent tous deux une activité histone acétyltransférase et interviennent de manière prépondérante dans la régulation de l'expression des gènes, notamment *via* leur interaction avec le facteur transcription CREB (*cAMP Response Element Binding Protein*). CBP et p300 jouent un rôle dans le développement du système nerveux : le KO embryonnaire des gènes codant pour CBP et p300 entraîne une altération de la fermeture du tube neural et une léthalité des embryons murins (Yao et al., 1998; Tanaka et al., 2000). De même, la délétion ou mutation hétérozygote de CBP est associée au syndrome de Rubinstein-Taybi, une maladie génétique regroupant notamment des altérations développementales, psychomotrices et un retard mental (Pour revue : Korzus, 2017). CBP joue également un rôle important dans le maintien de la plasticité et le processus de mémorisation (Alarcon et al., 2004; Korzus et al., 2004; Wood et al., 2006; Bousiges et al., 2010; Chen et al., 2010; Barrett

## Introduction

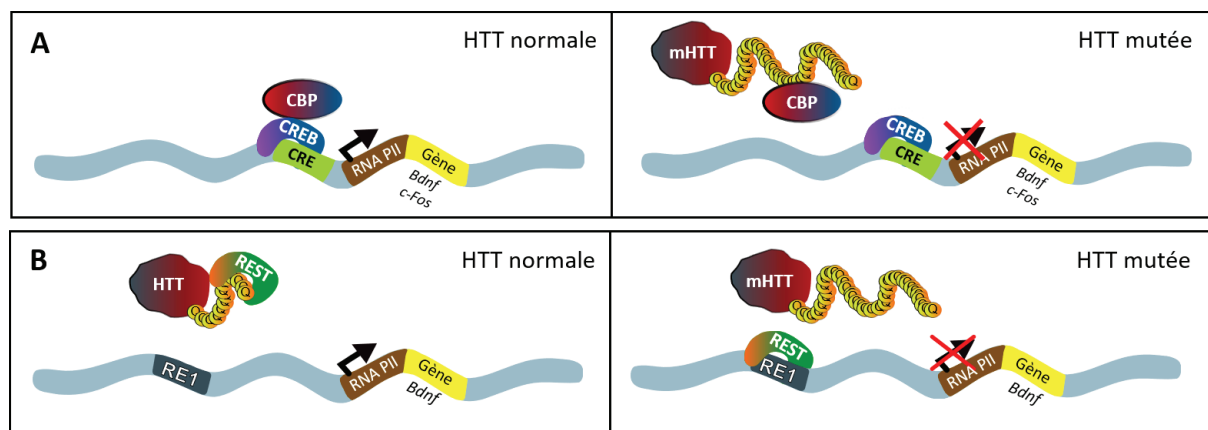
et al., 2011; Valor et al., 2011; Vieira and Korzus, 2015; Bridi et al., 2017). En effet, il va favoriser l'expression des gènes dépendants du facteur CREB. Ces gènes dont le rôle est bien décrit, sont impliqués notamment dans la survie neuronale (*Bcl-2*, *Bdnf*, *Crem* par exemple), l'apprentissage, la mémoire et la plasticité synaptique (*Egr1*, *Fos*, *ATF-3* par exemple) (Figure 20A) (Lonze and Ginty, 2002). Par exemple, Alarcón et collaborateurs (2004) ont mis en évidence que les souris CBP<sup>+/-</sup> présentaient une baisse de l'acétylation de H2B, une baisse de la potentialisation à long terme et une altération des performances cognitives dans le test de localisation d'objets et le conditionnement de peur au contexte (Alarcon et al., 2004). Par ailleurs, Korzus et collaborateurs (2004) ont montré que l'expression de CBP sans son domaine HAT dans l'hippocampe des souris altère le rappel à long terme d'une mémoire hippocampo-dépendante (test de localisation d'objets) (Korzus et al., 2004). La fonction HAT de CBP serait donc également impliquée dans le processus de consolidation d'une mémoire (Korzus et al., 2004; Vieira and Korzus, 2015; Bridi et al., 2017). Dans la MH, la HTT mutée interagit avec le domaine polyQ de l'acétyltransférase CBP (*CREB-binding protein*). Des études montrent que CBP est séquestré dans les agrégats de HTT mutée (Figure 20A) (Kazantsev et al., 1999; Nucifora Jr., 2001; Steffan et al., 2001). La HTT soluble serait également capable d'entraîner la dégradation de CBP (Cong et al., 2005), La fonction de CBP étant altérée, plusieurs processus en aval de CBP peuvent contribuer aux déficits cognitifs observés chez les patients et modèles de la MH.

Les agrégats de HTT mutée séquestrent d'autres facteurs transcriptionnels comme le complexe histone désacétylase mSin3a, le facteur suppresseur de tumeur p53, le co-activateur de transcription CA150 et le facteur de transcription TBP (*TATA-binding protein*) (Boutell et al., 1999; Kazantsev et al., 1999; Steffan et al., 2000; Holbert et al., 2001).

De plus, la forme soluble de la HTT mutée peut également inhiber l'activité de certains régulateurs transcriptionnels comme Sp1 mais aussi CBP et TBP (Li et al., 2002; Cong et al., 2005).

## Introduction

Par ailleurs, le dysfonctionnement de l'activité de certains facteurs transcriptionnels n'est pas lié uniquement à la toxicité de la mutation mais également à la perte de fonction de la HTT. C'est le cas de la protéine REST (*RE1-silencing transcription factor*), un répresseur de la transcription du BDNF, qui est physiologiquement inhibé par sa séquestration dans le cytoplasme par la HTT non mutée (Figure 20B). L'expansion de polyQ de la HTT mutée diminue son affinité pour REST, qui est alors transloqué dans le noyau où il peut se fixer sur la séquence RE1/NRSE située sur plusieurs gènes neuronaux, dont le gène *BDNF* (Figure 20B) (Zuccato et al., 2003).



**Figure 20 : Exemples des altérations transcriptionnelles dans la MH.**

(A) Le co-activateur de CREB, CBP, favorise la transcription des gènes cibles de CREB tels que les gènes *Bdnf* ou *Fos*. Dans la MH, CBP est séquestré dans les agrégats de HTT mutée (mHTT) et entraîne une altération de la transcription des gènes associés au facteur CREB. (B) En condition normale, la HTT interagit avec le facteur répresseur REST, empêchant sa fixation sur la séquence RE1 et donc l'inhibition de la transcription de gènes comme *Bdnf*. En revanche, le dysfonctionnement de la HTT mutée entraîne la fixation de REST et empêche la transcription. (D'après une figure de Rafael ALCALA VIDA).

La perte de fonction de la HTT affecte également l'activité de récepteurs nucléaires incluant les récepteurs LXRs (*Liver X receptors*). Ces récepteurs sont des régulateurs clés du métabolisme du cholestérol indispensable au bon fonctionnement cérébral. Leur transcription est favorisée par leur liaison à la HTT. Or Futter et collaborateurs (2009) ont montré que cette interaction est diminuée lorsque la HTT est mutée (Futter et al., 2009) entraînant une dérégulation du métabolisme du cholestérol comme cela a été observé chez une souris déficiente en récepteurs LXRs (Wang et al., 2002) et dans des études sur la MH (Leoni and Caccia, 2015; Boussicault et al., 2016, 2018; Kacher et al., 2019).

Enfin, d'autres études suggèrent un effet indirect de la HTT mutée qui pourrait affecter les niveaux de facteurs de transcription actifs, en influençant leur dégradation par le protéasome (Cong et al., 2005; Godin et al., 2010). Tandis que Cong et collaborateurs (2005)

## Introduction

suggèrent que la HTT mutée augmente la dégradation de CBP par le protéasome, l'étude de Godin et collaborateurs (2010) indique que la dégradation protéasomique de la  $\beta$ -caténine, un co-activateur transcriptionnel, est inhibée par la HTT mutée, conduisant à une accumulation anormale et toxique de  $\beta$ -caténine dans les neurones.

### 2.3.3. Altérations épigénétiques

Les avancées concernant les techniques de séquençage de nouvelle génération, telles que le séquençage couplé à une immunoprécipitation de la chromatine (ChIP-seq), ont permis d'évaluer l'ensemble des modifications épigénétiques du génome, aussi appelé épigénome. Une dérégulation des modifications épigénétiques a été observée dans le contexte de la MH (Pour revue : Francelle et al., 2017), et pourrait contribuer aux dérégulations transcriptionnelles décrites chez les patients et modèle animaux de la MH.

#### 2.3.3.a. Dynamique épigénétique et transcription

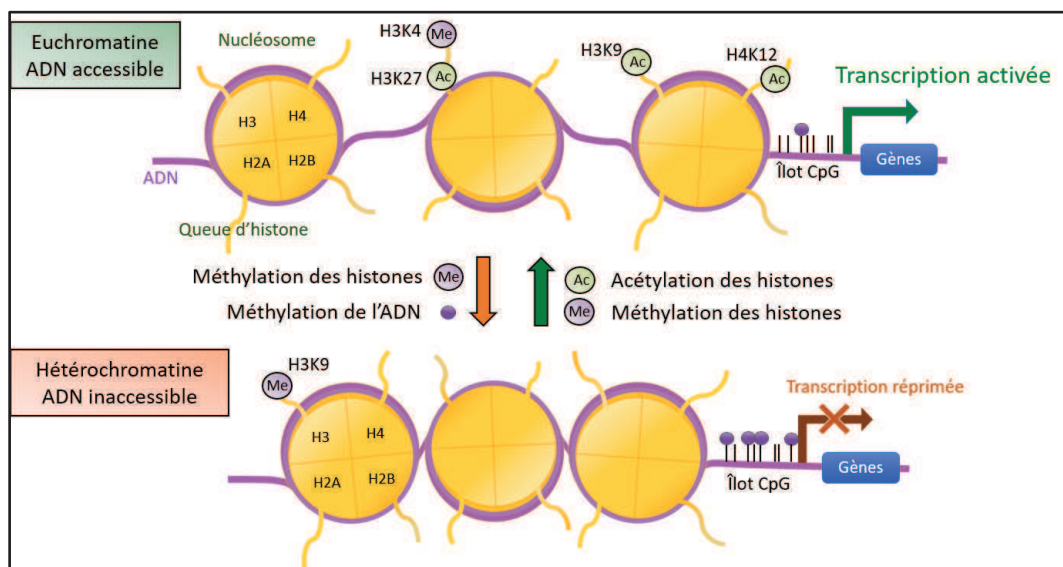
Le terme « épigénétique » regroupe l'ensemble des mécanismes qui provoquent des changements réversibles et héréditaires dans l'expression des gènes, sans en changer la séquence d'ADN. Les mécanismes épigénétiques régulent plusieurs processus médiés par l'ADN et/ou l'ARN, notamment la transcription. Les processus épigénétiques sont très variés (Pour revue : Allis and Jenuwein, 2016), les deux principaux sont les PTMs d'histones et la méthylation de l'ADN. Ces modifications ont des conséquences sur la structure de la chromatine et sur l'expression des gènes.

En effet, l'ADN génomique est enroulé autour des nucléosomes qui sont constitués de 8 histones, dont deux de chaque catégorie (H2A, H2B, H3 et H4) (Figure 21). Ces histones sont sujettes aux PTMs comme l'acétylation, la méthylation, la phosphorylation ou encore l'ubiquitination, qui modulent le degré de compaction des nucléosomes et donc l'accessibilité de la chromatine aux facteurs et cofacteurs transcriptionnels (Jenuwein and Allis, 2001). Certaines modifications d'histones favorisent la décompaction des nucléosomes, induisant ainsi un état relâché de la chromatine (euchromatine) favorable à la transcription, alors que d'autres engendrent une compaction de la chromatine (hétérochromatine) défavorable à la transcription des gènes (Figure 21). L'acétylation des histones, quel que soit le résidu modifié, favorise toujours l'activité transcriptionnelle alors que, selon la nature du résidu ciblé, la

## Introduction

méthylation des histones peut favoriser ou réprimer la transcription des gènes associés. Par exemple, la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9) est associée à une répression tandis que sur la lysine 4 (H3K4), la méthylation active la transcription (Figure 21).

De plus, certaines régions du génome possèdent des modifications d'histones caractéristiques : c'est le cas des promoteurs transcriptionnellement actifs, qui sont enrichis en triméthylation de H3K4 (H3K4me3), tandis que les enhancers actifs sont enrichis en H3K4 monométhylé (H3K4me1). L'acétylation de H3K9 (H3K9ac) est plus particulièrement présente au niveau des promoteurs actifs, alors que l'acétylation de H3K27 (H3K27ac) est plus spécifiquement enrichie au niveau des enhancers actifs.



**Figure 21 : Régulation de la transcription par les modifications épigénétiques de la chromatine.**

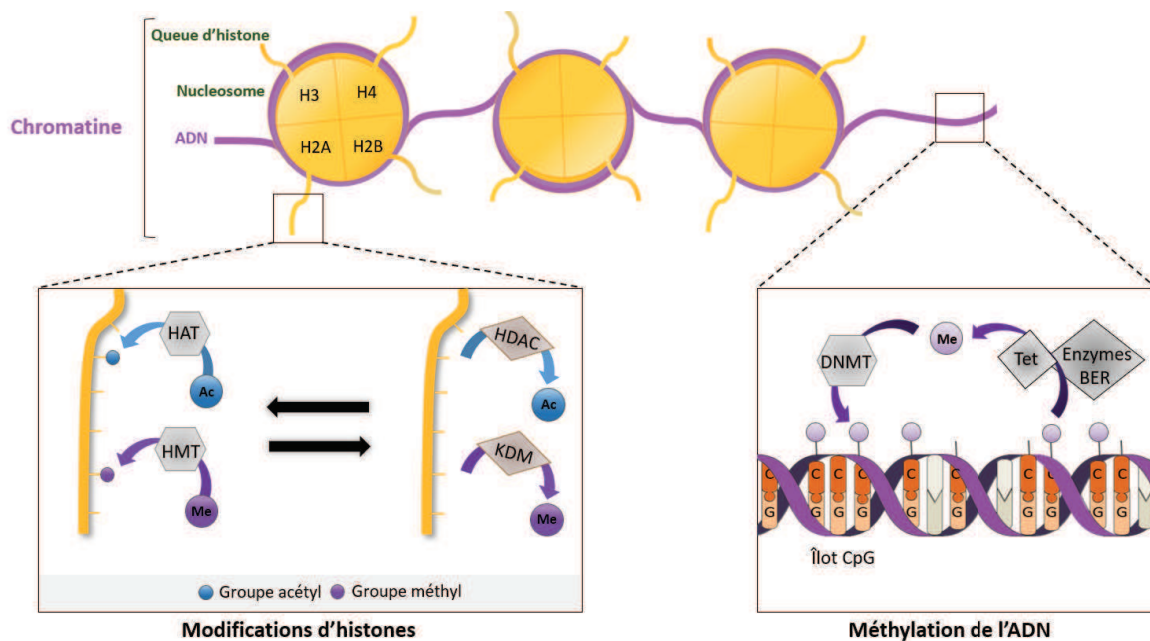
La chromatine est constituée de nucléosomes qui, en se compactant, permettent de réguler la transcription. La chromatine compactée (hétérochromatine) réprime la transcription, tandis que lorsqu'elle est décompactée (euchromatine), les facteurs transcriptionnels peuvent s'y fixer. Cette dynamique est régulée par des processus épigénétiques, comme l'acétylation des queues d'histones qui favorise toujours la transcription, la méthylation des histones ou encore la méthylation de l'ADN. (Modifié d'après Francelle et al. 2017).

Un autre mécanisme épigénétique essentiel est la méthylation de l'ADN, qui concerne principalement l'ajout d'un groupe méthyl sur les cytosines de l'ADN. Les cytosines méthylées sont très souvent retrouvées dans des régions de l'ADN riches en guanine et cytosine, les îlots CpG. Au niveau des promoteurs, généralement enrichis en îlots CpG, la méthylation de l'ADN est un mécanisme important impliqué dans la répression des gènes (Figure 21) (Deaton and Bird, 2011).



## Introduction

Les modifications épigénétiques sont réversibles et ciblées, les acides aminés des histones étant spécifiquement et réversiblement modifiés par différentes enzymes. Ces modifications peuvent se combiner et former un code, le « code histone ». Le décryptage de ce code par des enzymes capables de le lire et de l'interpréter permet de réguler avec une extrême précision les processus dépendants de l'ADN, la transcription en premier lieu, mais aussi les mécanismes de réparation de l'ADN (Jenuwein and Allis, 2001; Bannister and Kouzarides, 2011).



**Figure 22 : Dynamique des modifications épigénétiques de la chromatine.**

L'ADN est enroulé autour des nucléosomes, qui sont constitués de 8 histones et qui modulent la compaction de la chromatine. Les queues des histones peuvent subir des modifications post-traductionnelles, comme l'acétylation ou la méthylation de résidus. Les groupements acétyls et méthyles sont ajoutés par des histones acétyltransférases (HAT) et méthyltransférases (HMT) respectivement et retirés par des histones désacétylases (HDAC) et déméthylases (HDM). La compaction de la chromatine est aussi régulée par la méthylation de l'ADN : les groupements méthyles sont ajoutés par des ADN méthyltransférases (DNMT) sur les cytosines des régions de l'ADN riches en GC, et leur retrait implique les enzymes Tet et les mécanismes de réparation de l'ADN (Enzymes BER). (D'après Francelle et al., 2017)

La nature réversible des modifications épigénétiques implique l'existence d'enzymes pour les ajouter et les retirer des résidus d'histones et de l'ADN (Figure 22). Par exemple, les groupements acétyls et méthyles sont fixés sur les résidus d'histones par des histones acétyltransférases (HAT) et des histones méthyltransférases (HMT) (Figure 22). Ils sont retirés par des histones désacétylases (HDAC) et des histones déméthylases (HDM) (Figure 22). Concernant la méthylation de l'ADN, les groupements méthyles sont ajoutés par des ADN méthyltransférases (DNMT) (Figure 22). En revanche, leur mécanisme de retrait a été pendant longtemps méconnu, la méthylation de l'ADN était donc considérée comme stable.

## Introduction

Récemment, un mécanisme de retrait des groupements méthyles a été identifié et mobilise des protéines TET (*Ten-eleven-translocation*) qui hydroxylent les méthyl-cytosines (Tahiliani et al., 2009; Ito et al., 2010; Ko et al., 2010). Celles-ci sont alors prises en charge par les mécanismes de réparation par excision de base de l'ADN (BER) pour être déméthylées (Figure 22) (Guo et al., 2008; Feng et al., 2015).

### 2.3.3.b. Neuroépigénétique et plasticité

Bien qu'historiquement les mécanismes épigénétiques aient été évalués essentiellement dans un contexte développemental car ils sont très importants pour l'établissement de l'identité cellulaire, aujourd'hui la dynamique de ces régulations est très étudiée pour son rôle dans l'activité neuronale, ce qui conduit à la notion de « neuroépigénétique » (Pour revue : Francelle et al., 2017).

La plasticité neuronale, un processus essentiel de la régulation de l'activité neuronale, permet une adaptation de l'excitabilité des neurones en réponse aux stimuli environnementaux tels que l'apprentissage, la mémorisation, le stress ou l'exposition aux drogues. Des études indiquent que les mécanismes épigénétiques sont importants pour la régulation de la plasticité neuronale, en favorisant la transition entre l'état au repos du neurone et l'état activé (Korzus, 2010; Landgrave-gómez et al., 2015; Meadows et al., 2016).

Par exemple, les processus d'apprentissage et de mémorisation requièrent la formation de nouvelles synapses qui peuvent être renforcées ou perdues dans le temps. Plusieurs études ont décrit des modifications du niveau d'acétylation des histones (H3K14ac, H4K12ac, H2Bac par exemple) et de la méthylation de l'ADN dans l'hippocampe de rongeurs, corrélant avec la dynamique synaptique et les processus de mémorisation lors d'une tâche d'apprentissage hippocampo-dépendante (par exemple, la piscine de Morris, tâche de reconnaissance et de localisation d'objets, conditionnement de peur contextuel) (Bousiges et al., 2013; Chatterjee et al., 2013; Peixoto and Abel, 2013; Zovkic et al., 2013; Benito et al., 2015; Halder et al., 2016). Ces résultats indiquent que lors d'un apprentissage, la chromatine des neurones des structures cérébrales impliquées dans la consolidation et la mémorisation d'un souvenir, est soumise à des modifications épigénétiques. Les données de la littérature montrent également que les modifications induites par un apprentissage peuvent persister durablement, ce qui suggère que, dans le cerveau, il existe une relation de cause à effet entre mémoire

## Introduction

épigénétique et mémorisation d'un souvenir. Les conséquences, transcriptionnelles en particulier, des modifications épigénétiques associées aux processus de mémoire et d'apprentissage, sont encore mal comprises. À court terme, elles semblent corrélées avec l'activation de gènes précoces immédiats (IEG) tels que *Egr1*, *Arc* et *Fos*, connus pour favoriser la plasticité synaptique (Thakurela et al., 2015; Minatohara et al., 2016). Leur impact à plus long terme reste à préciser. Par ailleurs, les études mentionnées ci-dessus utilisent l'hippocampe ou le cortex comme substrat neurobiologique. Il reste à déterminer si des mécanismes comparables sont à l'œuvre lors d'un apprentissage qui requiert le striatum, lequel a fait l'objet d'études épigénomiques et transcriptionnelles, mais dans un contexte de la consommation abusive de drogues et de l'addiction (Ribeiro et al., 2018; Walker et al., 2018). Dans ce contexte en revanche, l'impact de la mutation Huntington sur les régulations épigénétiques associées au processus de mémorisation dépendant du striatum n'a jamais été examiné, alors même que ce type de mécanisme pourrait contribuer aux symptômes comportementaux de la MH.

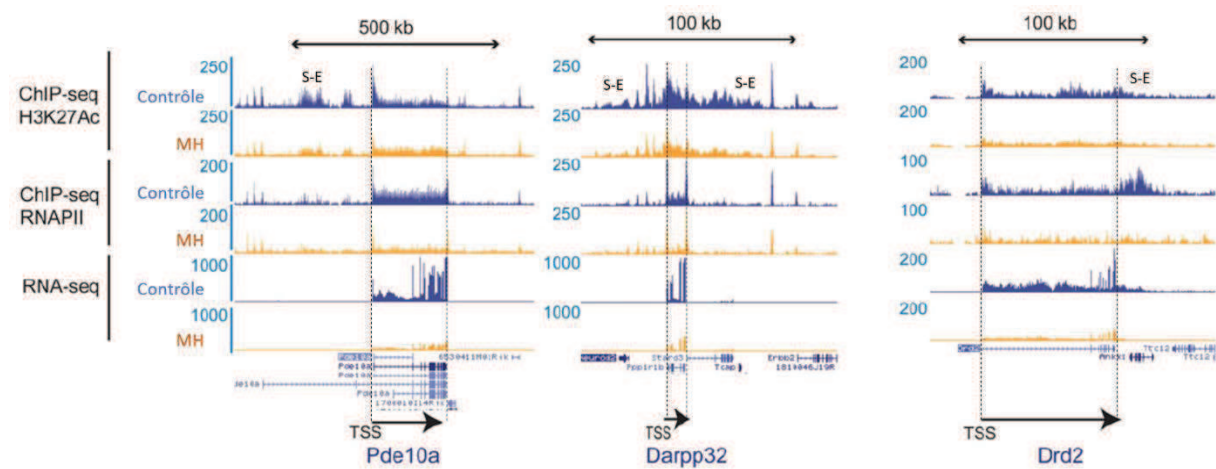
### 2.3.3.c. Caractéristiques de l'épigénome dans la MH

La dérégulation transcriptionnelle associée à la MH pourrait être la conséquence d'une altération des régulations épigénétiques chez les patients et modèles murins de la maladie (Figure 24). Comme décrit dans la partie 2.3.1.a Signature transcriptionnelle des ARNm du striatum (p.46), les gènes sous-exprimés dans le striatum Huntington sont enrichis en gènes qui définissent l'identité des neurones striataux. Il a été montré au laboratoire que ces gènes d'identité possèdent une signature épigénétique spécifique : ils sont régulés par une catégorie particulière d'enhancers appelés super-enhancers (Achour et al., 2015). Les super-enhancers sont de vastes enhancers fortement enrichis en H3K27ac, et couvrant en général les gènes qu'ils régulent (Figure 23) (Achour et al., 2015).

Les résultats de CHIP-seq de Achour et collaborateurs montrent une baisse de H3K27ac et de l'ARN Pol II dans le striatum des souris R6/1 au niveau des super-enhancers des neurones striataux, corrélant avec une baisse d'expression des gènes sous leur contrôle, à savoir les gènes qui définissent l'identité des neurones striataux (Figure 23 & 24). Des résultats comparables ont été récemment obtenus au laboratoire, à partir de striatum *post-mortem* de patients Huntington (Merienne et al., 2019) et du modèle murin KI CAG 140 de la maladie (Alcala Vida et al., en préparation). Ces données suggèrent que la diminution de H3K27ac au

## Introduction

niveau des super-enhancers striataux joue un rôle causal dans le mécanisme de sous-expression des gènes d'identité du striatum.



**Figure 23** : Altération des profils H3K27ac des super-enhancers des gènes striataux dans la MH.

Les données ChIP-seq H3K27ac et ARN Pol II du striatum des souris WT et R6/1 montrent que chez les souris WT, le profil H3K27ac des gènes de l'identité striatale (*Pde10a*, *Darpp32* ou *Drd2*) présente des régions enrichies en H3K27ac autour du TSS (Transcription Start Site) des gènes, correspondant aux super-enhancers (S-E). Ce profil est altéré chez les souris R6/1, avec une diminution de H3K27ac au niveau des S-E et de l'ARN Pol II, corrélant avec une baisse d'expression de leurs gènes cibles. (D'après Achour et al., 2015).

D'autres marques d'acétylation des histones (Pour revue : Francelle et al., 2017), telles que H3K9ac et H3K14ac, pourraient aussi contribuer à ces mécanismes (Figure 24). Ces marques apparaissent diminuées dans le striatum des souris R6/2 et N171-82Q, bien que le lien entre les variations de H3K9ac et H3K14ac et les changements transcriptionnels induits par la mutation Huntington apparaissent peu corrélés (Mcfarland et al., 2012; Valor et al., 2013). De façon plus convaincante, H3K4me3, une marque associée aux promoteurs actifs, pourrait participer au mécanisme de sous-régulation des gènes de l'identité neuronale sous le contrôle d'un super-enhancer. En effet, les données de Vashishtha et collaborateurs (2013) montrent que les gènes de l'identité neuronale possèdent une signature H3K4me3 caractéristique : ils se distinguent par un profil H3K4me3 large, non sans rappeler le profil H3K27ac (Vashishtha et al., 2013). Cependant, il n'est pas clair si H3K4me3 est diminué au niveau des gènes de l'identité neuronale dans le contexte de la mutation Huntington (Vashishtha et al., 2013; Bai et al., 2015).

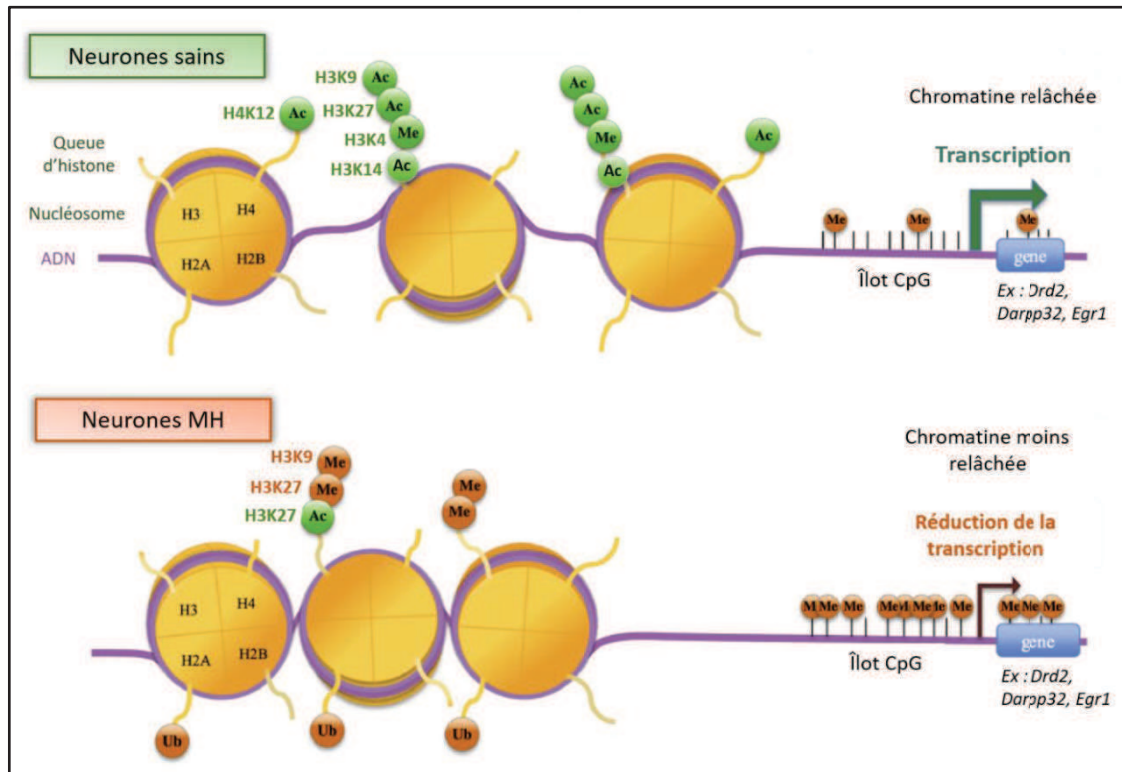
Une cause possible de la diminution de H3K27ac au niveau des gènes de l'identité neuronale serait la séquestration de l'HAT CBP dans les agrégats de HTT mutée ou son interaction anormale avec la HTT mutée soluble (cf partie **2.3.2 Interaction de la huntingtine mutée avec les acteurs de la transcription**, p.51) (Kazantsev et al., 1999; Nucifora Jr., 2001;

## Introduction

Steffan et al., 2001; Li et al., 2002; Cong et al., 2005). En effet, H3K27 est un substrat important de CBP et sa séquestration dans les agrégats pourrait être à l'origine de la réduction d'activité des super-enhancers et par conséquent de la baisse d'expression des gènes de l'identité striatale. Des études montrent qu'une réduction de CBP entraîne une aggravation de la pathogénèse (Steffan et al., 2000; Bates et al., 2006; Klevytska et al., 2010) et des déficits cognitifs (Giralt et al., 2012). Par ailleurs, une surexpression de CBP réduit la toxicité dans des modèles d'expression de polyQ (Mccampbell et al., 2000; Taylor et al., 2003; Jiang et al., 2006). L'hypothèse du rôle de l'altération de CBP dans la signature transcriptionnelle de la MH reste à démontrer, en utilisant en particulier des méthodes d'analyse à l'échelle du génome (ChIP-seq/RNA-seq).

D'autres facteurs épigénétiques ont une activité modifiée par leur interaction avec la HTT mutée (Pour revue : Valor, 2014; Francelle et al., 2017). C'est le cas du complexe PRC2 (*Polycomb Repressive Complex 2*) qui triméthyle H3K27 (H3K27me<sub>3</sub>), une marque associée à de la répression transcriptionnelle, et dont l'activité est augmentée dans la MH (Seong et al., 2010). Plusieurs enzymes de méthylation des histones apparaissent également dérégulées dans les modèles de la MH, comme par exemple les enzymes qui méthylent H3K9 et H3K4 (Ryu et al., 2006; Vashishtha et al., 2013).

Enfin, les niveaux de méthylation de l'ADN seraient perturbés chez les patients et les modèles murins de la MH ([Figure 24](#)) (Thomas et al., 2013; Wang et al., 2013; Horvath et al., 2016). La méthylation de l'ADN est globalement réduite dans les cerveaux des modèles animaux (Thomas et al., 2013; Wang et al., 2013), un résultat qui n'est cependant pas retrouvé dans les tissus *post-mortem* des patients atteints de la MH (De Souza et al., 2016). En revanche, Horvath et collaborateurs (2016) ont estimé l'âge épigénétique des cellules des patients et les analyses des tissus, particulièrement le cortex, ont montré un vieillissement accéléré des neurones dans la MH, un phénomène qui n'est pas retrouvé dans le striatum, probablement en raison de l'abondance de la mort neuronale (Horvath et al., 2016).



**Figure 24 : Résumé de l'altération des modifications d'histones et de méthylation de l'ADN dans les neurones touchés par la HTT mutée.**

Dans la MH, une baisse des modifications d'histones associées à une activation de la transcription, incluant notamment l'acétylation des histones H3K27, H3K9, H3K14 et H4K12 est observée. En parallèle, une augmentation des modifications d'histones associées à la répression de la transcription (H3K9me2, H3K27me3, H2Aub) est observée dans les neurones touchés par la HTT mutée. Ces modifications épigénétiques entraînent la compaction de la chromatine et la baisse de transcription des gènes, particulièrement des gènes de l'identité striatale. (D'après Francelle et al., 2017).

### **3. LES STRATEGIES THERAPEUTIQUES POUR LA MALADIE DE HUNTINGTON**

#### **3.1. Les traitements symptomatiques**

En raison de l'absence de traitement curatif efficace pour la MH, la prise en charge actuelle est centrée sur le traitement des symptômes pour améliorer la qualité de vie des patients et de leurs familles. La FDA (*Food and drug administration*) des Etats-Unis a autorisé l'administration d'un inhibiteur des transporteurs vésiculaires de monoamines de type 2 (VMAT2), la tétrabénazine, pour le traitement spécifique des symptômes des patients atteints de la MH. Cette molécule est utilisée pour traiter les chorées (Huntington Study Group, 2006) et présente l'avantage de ne pas provoquer de dyskinésie tardive, contrairement aux molécules bloquant les récepteurs dopaminergiques, comme l'halopéridol, un neuroleptique autrefois utilisé (Bashir and Jankovic, 2018). Un deuxième inhibiteur de VMAT2 a été approuvé récemment par la FDA, le deutetribenazine. Les effets secondaires de ce composé (sédation, diarrhées, insomnies) sont plus rares qu'avec le traitement à la tétrabénazine (Bashir and Jankovic, 2018). Par ailleurs, la stimulation cérébrale profonde représente une alternative aux traitements pharmacologiques des chorées et montre des résultats positifs (Gonzalez et al., 2014). Les autres symptômes moteurs, comme la rigidité et la dystonie, sont aussi améliorés avec la tétrabénazine (Huntington Study Group, 2016), la lidocaïne ou en réalisant des injections locales de toxines botuliques (Pour revue : Testa and Jankovic, 2019).

Les symptômes psychiatriques sont, quant à eux, améliorés par des traitements médicamenteux standards, utilisés chez les patients non atteints par la MH. Par exemple, les psychoses sont traitées avec des neuroleptiques, la dépression avec des inhibiteurs de recapture de la sérotonine ou des anti-dépresseurs tricycliques. L'humeur est stabilisée par un traitement avec des molécules antiépileptiques, comme le valproate, qui réduit également l'irritabilité des patients, mais aussi avec des anti-dépresseurs tels que les inhibiteurs de recapture de la sérotonine (Pour revue : Testa and Jankovic, 2019).

En revanche, il n'existe pas de traitement médicamenteux pour les troubles cognitifs. Le Donépézil, un inhibiteur de cholinestérase utilisé pour améliorer les déficits cognitifs de la maladie d'Alzheimer, a été testé sur des personnes atteintes de la MH. Cependant, aucune amélioration motrice, cognitive ou de la qualité de vie des patients n'a été observée (Cubo et

al., 2006). Plusieurs études montrent que les interventions non-médicamenteuses peuvent avoir un effet bénéfique sur les troubles cognitifs des patients en ralentissant leur évolution (Andrews et al., 2015). Une amélioration de l'hygiène de vie des patients, par une meilleure alimentation et la pratique d'un sport, permettrait de ralentir les symptômes de la MH, tout comme la gestion du stress ou encore l'engagement social. La prise en charge multidisciplinaire (orthophonie, physiothérapie, ergothérapie, nutritionniste, neurologie, psychiatrie, psychologie) a également un impact positif sur les patients et leurs familles (Simpson and Rae, 2012).

### **3.2. Les traitements curatifs**

Au cours des vingt dernières années, 99 essais cliniques ont été menés sur des patients atteints de la MH avec 41 composés différents (McColgan and Tabrizi, 2018). Cependant, le taux de réussite est faible, avec seulement 3,5% des essais progressant vers l'étape suivante (Travessa et al., 2017). Différentes stratégies ont été testées et 23 essais cliniques sur la MH sont en cours (McColgan and Tabrizi, 2018).

#### **3.2.1. [Les thérapies cellulaires](#)**

Une des approches est la transplantation de cellules fœtales humaines dans le striatum de patients. Les cellules transplantées peuvent se différencier en MSNs, qui expriment le marqueur striatal *Darpp32* (Peschanski et al., 1995), et sont capables d'établir des connexions synaptiques avec les structures cibles du striatum (Wictorin, 1992).

La période de bénéfice de la greffe est généralement assez courte (Pour revue : Bachoud-Lévi and Perrier, 2014), mais un essai clinique en France a abouti à une amélioration cognitive sur des périodes de plus de 6 ans et des améliorations motrices pendant plus de 4 ans chez des patients atteints de la MH (Bachoud Lévi et al., 2006; Aubry et al., 2008; Bachoud-Lévi, 2009). Cependant, les résultats des greffes sont variables entre les études et au sein d'un même centre de transplantation, pour des raisons qui sont encore mal comprises. Effectivement, des sources de variabilité et des complications doivent être prises en compte à chaque étape de la transplantation. La première source est l'origine biologique des cellules transplantées : celles-ci proviennent de fœtus humains issus d'avortements, un approvisionnement limité et



## Introduction

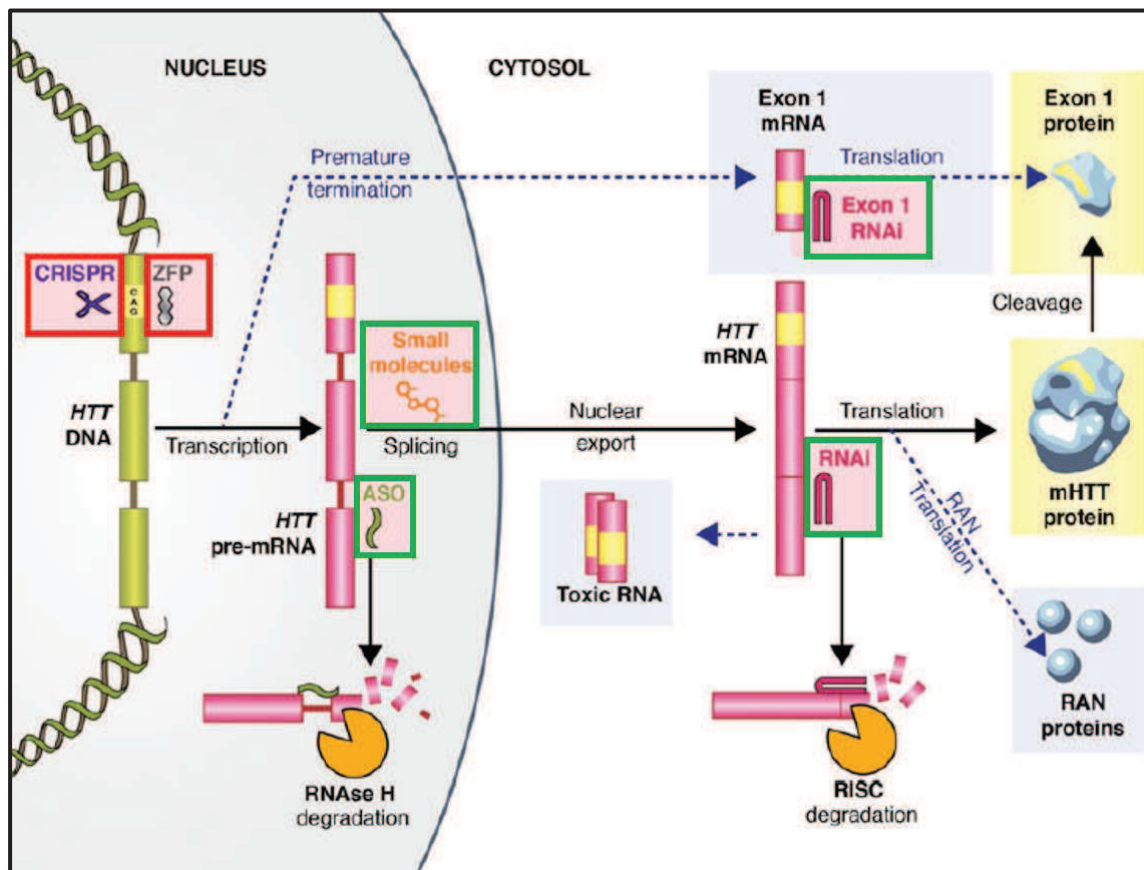
variable, qui complique l'utilisation des greffes pour le traitement de la MH. En parallèle, la standardisation et le contrôle de la qualité des cellules fœtales humaines nécessaires à la thérapie cellulaire sont insuffisants. Il existe en plus un risque de transmission infectieuse, bien que des tests soient réalisés en amont sur le donneur et le patient, et que des antibiotiques soient administrés au receveur du greffon avant la chirurgie (Bachoud-Lévi and Perrier, 2014). Enfin, quelques rares incidents chirurgicaux ont été rapportés, mais les difficultés majeures associées à la réalisation de greffes cellulaires concernent le risque d'allo-immunisation du receveur contre le greffon.

Malgré ces inconvénients, les thérapies cellulaires présentent l'avantage de permettre une amélioration de la pathologie sans qu'il soit nécessaire de déterminer la cause précise de la neurodégénérescence. Contrairement à d'autres approches, elle assure non seulement une neuroprotection, mais elle permet également de restaurer les fonctions perdues chez les patients symptomatiques.

Actuellement, pour limiter la variabilité et les risques associés à cette approche, un intérêt grandissant est porté sur les iPSCs (cf partie [1.5.2 Modèles \*in vitro\* : iPSCs](#), p.29) comme source cellulaire pour les greffes (Pour revue : Liu et al., 2016). Des études pré-cliniques chez le rongeur ont déjà montré une amélioration des déficits, associée à une différenciation des iPSCs en neurones exprimant *Darpp32* (Aubry et al., 2008; Ma et al., 2012; Carri et al., 2013).

### 3.2.2. [La thérapie génique](#)

Le caractère monogénique de la MH rend favorable les thérapies ciblant la cause génétique de la pathologie. Les approches les plus prometteuses actuellement sont les nouvelles thérapies visant à réduire les niveaux de HTT mutée en ciblant l'ADN ou l'ARN du gène muté (Pour revue : Bates et al., 2015; Wild and Tabrizi, 2017; McColgan and Tabrizi, 2018b).



**Figure 25 : Illustration des cibles des thérapies géniques dans la MH.**

Les approches de thérapie génique visent à réduire l'ARN de la HTT mutée (encadrés vert), en utilisant des oligonucléotides anti-sens (ASOs) qui entraînent la dégradation du pré-ARNm de la HTT mutée par la ribonucléase H (RNase H) ou en utilisant des ARNs interférents (RNAi). Ces derniers entraînent la dégradation des ARNm de la HTT complète et de l'exon 1 par la RNase du complexe RISC. Une autre stratégie consiste à cibler directement le gène de la HTT mutée (encadrés rouge) en clivant une séquence spécifique avec les technologies utilisant les protéines à motifs de type doigts de zinc (ZFP) ou le système CRISPR/Cas9. (D'après McColgan et al., 2018 et Wild et al., 2017).

### 3.2.2.a. Les thérapies ciblant l'ARN de la huntingtine mutée

Les ARNm de la HTT mutée sont ciblés essentiellement par des oligonucléotides antisens (ASO) et des ARNs interférents (ARNi) (Figure 25). Contrairement à l'ADN, les ARNs ne sont pas protégés par des mécanismes de réparation, facilitant ainsi la réduction de la traduction des ARNm de la HTT mutée par rapport à la modulation de la transcription ou l'altération directe du gène.

#### Les ASOs

Les ASOs sont des molécules d'ADN simple brin synthétiques, qui peuvent se lier par complémentarité des bases aux pré-ARNm dans le noyau pour entraîner leur dégradation par la ribonucléase H (RNase H) (Figure 25) (Larrouy et al., 1992). Celle-ci, en clivant spécifiquement les hybrides double-brin ARN/ADN (Larrouy et al., 1992), réduit donc la

## Introduction

production d'ARNm toxiques de la HTT mutée. Cependant, l'effet des ASOs sur la formation des ARNm issus de l'exon 1 de la HTT mutée est encore mal caractérisé car ces fragments seraient générés avant la formation des pré-ARNm reconnus par les ASOs. Les ASOs sont administrés de façon répétée par voie intrathécale et permettent une réduction de plus de 80% d'ARNm de la HTT chez plusieurs modèles murins de la MH (Kordasiewicz et al., 2012; Stanek et al., 2013). En 2015, les premiers patients ont reçu un traitement avec l'ASO HTT<sub>Rx</sub>, un ASO de 20 nucléotides ciblant la HTT humaine, dans le cadre d'un essai clinique de phase 2b financé par IONIS et Roche.

### **Les ARNi**

La deuxième stratégie ciblant les ARNm de la HTT mutée implique l'utilisation d'ARNi, c'est-à-dire des petits ARNs (ARNsi - *Short interfering RNA*, microARNs ou encore ARNs en épingle à cheveux) pouvant se lier spécifiquement à la séquence d'ARNm de la HTT mutée. Cette liaison entraîne la dégradation de l'ARNm par l'argonaute 2, la RNase du complexe RISC (*RNA-induced silencing complex*) ([Figure 25](#)) (Hutvagner and Simard, 2008). Contrairement aux ASOs, les ARNi agissent sur les ARNm épissés et peuvent donc impacter les fragments issus de l'exon 1 de la HTT mutée ([Figure 25](#)). En revanche, la diffusion intra-cérébrale des ARNs double brin étant faible, l'administration des ARNi nécessite une intervention chirurgicale par stéréotaxie pour les libérer directement dans la structure cible *via* un vecteur viral. Bien que plus invasif, ce mode d'administration nécessite une seule injection qui assure une réduction permanente de la HTT, contrairement aux ASOs qui nécessitent des injections répétées (Wild and Tabrizi, 2017). Les stratégies thérapeutiques utilisant les ARNi sont actuellement en phase pré-clinique (Pour revue : Wild and Tabrizi, 2017). En février 2019, la compagnie UniQure a montré un effet bénéfique du microARN AMT-130 sur des mini-porcs modèles de la MH et un essai clinique de cette thérapie génique est planifié par la compagnie pour la fin de l'année 2019 aux Etats-Unis.

Ces deux approches présentent un inconvénient majeur : elles entraînent une réduction de l'expression des deux allèles de la HTT, le sauvage et le muté. Comme décrit dans la partie [2.1.1.c Interactions et rôles physiologiques de la huntingtine](#) (p.33), chez les souris, le KO de la HTT sauvage est létal au stade embryonnaire (Duyao et al., 1995; Nasir et al., 1995) et un KO périnatal entraîne d'importantes altérations comportementales et neuropathologies (Dragatsis et al., 2000; Arteaga-bracho et al., 2016). Une réduction de la HTT sauvage

## Introduction

semblerait donc avoir des conséquences graves chez la souris. Or à l'heure actuelle, il est impossible de savoir si la réduction de l'expression de l'allèle sauvage est sans conséquences pour les patients. C'est pourquoi, des recherches sont en cours afin de développer des ASOs sélectifs de l'allèle muté de la HTT. Par exemple, un ASO ciblant une répétition de 7 CAG montre un effet bénéfique sur des modèles murins de la MH (Kourkouta et al., 2017) et l'expression de l'allèle muté est réduite de 83% par ce traitement dans un modèle cellulaire (Evers et al., 2011). Néanmoins, l'expression de l'allèle sauvage est diminuée de 43%, tout comme l'expression d'autres gènes comportant une répétition de CAG (Evers et al., 2011). En 2017, les essais cliniques de deux ASOs ciblant des régions de l'ARNm de la HTT contenant des SNPs particulièrement fréquents dans la MH ont été annoncés. Ces ASOs auraient théoriquement le potentiel de traiter plus de deux tiers des personnes atteintes de la MH (Hersch et al., 2017). Cependant, le développement clinique est tout de même limité car chaque ASO spécifique d'un SNP ne permet de traiter qu'un sous-ensemble de patients.

### 3.2.2.b. Les thérapies ciblant l'ADN de la huntingtine mutée

Les approches ciblant directement l'ADN visant à réduire la transcription de la HTT mutée apportent un nouveau potentiel pour le traitement de la MH. Les deux approches actuelles sont basées sur l'utilisation de protéines possédant des motifs de type doigts de zinc (ZF – *Zinc finger*) et sur le système CRISPR/Cas9 (*Clustered Regulated Interspaced Short Palindromic Repeat/CRISPR associated protein 9*) (Figure 25) (Pour revue : Wild and Tabrizi, 2017; McColgan and Tabrizi, 2018). Chaque approche est basée sur l'utilisation d'un vecteur viral injecté par voie intracrânienne qui permet aux cellules transduites de produire des protéines non natives (les protéines ZF ou les protéines du système CRISPR/Cas9).

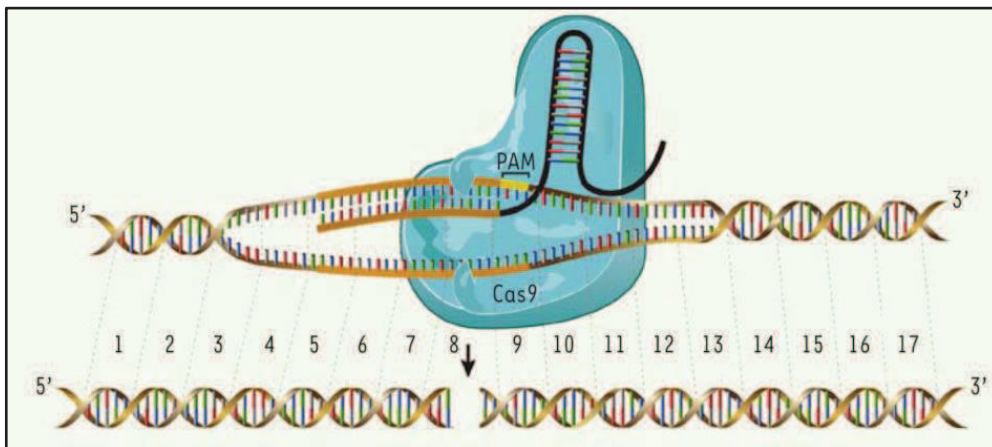
#### **Les protéines ZF**

Les protéines ZF sont générées de façon à reconnaître une région spécifique de l'ADN. Chaque motif ZF reconnaît une courte séquence de 3 nucléotides, ainsi l'association de plusieurs domaines ZF permet de cibler une séquence spécifique. Cette protéine ZF est ensuite fusionnée avec un gène codant pour une nucléase ou pour un facteur de transcription, dans le but de cliver ou réprimer l'expression d'un gène cible (Klug, 2010). Dans le cadre de la MH, des travaux ont montré une diminution de l'expression de la HTT mutée dans des modèles *in vitro* et murins, grâce à une protéine ZF ciblant l'expansion de CAG du gène muté (Garrigan et al., 2012; Zeitler et al., 2019). Cette approche entraîne une amélioration du

## Introduction

phénotype des modèles murins, associée à une réduction de l'expression de l'allèle muté (>95%) tout en préservant l'expression de la HTT sauvage (80% en moyenne) (Garriga-canut et al., 2012; Zeitler et al., 2019). En revanche, la production de protéines non natives peut déclencher des réactions inflammatoires et immunitaires, entraînant la mort neuronale. Ces réactions peuvent limiter la durée du bénéfice de la thérapie, mais celle-ci peut être améliorée par une réduction de la réponse immunitaire (Agustín-pavón et al., 2016).

### Le système CRISPR/Cas9



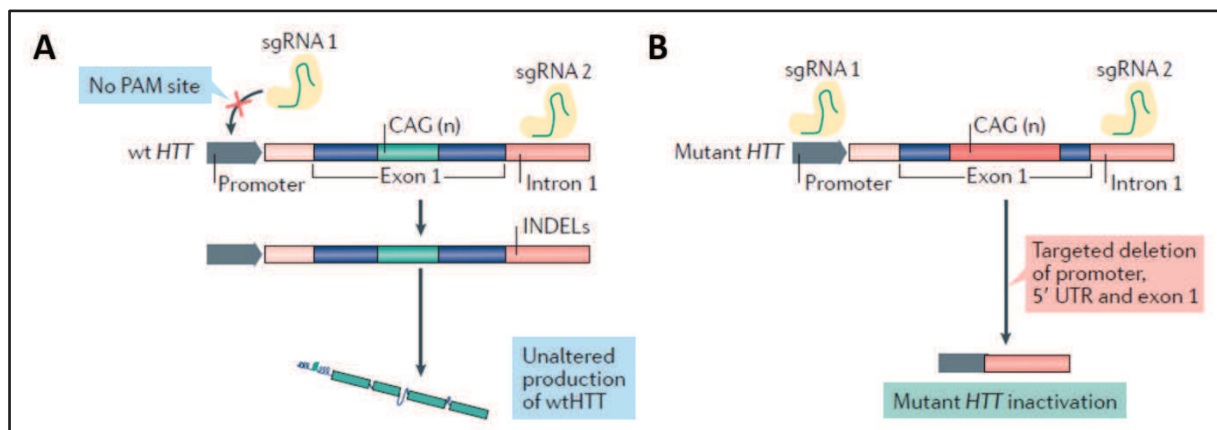
**Figure 26 : Schéma du principe du système CRISPR/Cas9.**

L'ARN guide (sgRNA) contient une séquence complémentaire à la séquence cible (marron) et une séquence permettant de guider la Cas9 (noir). Après fixation du sgRNA, la Cas9 se lie à la séquence PAM (*Protospacer adjacent motif*) et clive la région cible. (D'après Tremblay, 2015).

CRISPR/Cas9 est utilisé par le système immunitaire bactérien afin de cliver de l'ADN étranger. Ce système est un complexe formé de plusieurs éléments : un brin d'ARN guide (sgRNA – *Single guide RNA*) avec une séquence homologue à celle de la région d'ADN à exciser et une endonucléase, la Cas9. Le sgRNA est composé d'une partie spécifique de la séquence à exciser et d'une partie permettant de recruter la Cas9 (Figure 26). La région d'ADN ciblée doit être suivie d'une séquence formée des nucléotides NGG (nucléotide-guanine-guanine) appelée PAM (*Protospacer adjacent motif*). Le sgRNA s'hybride à la séquence cible et guide la Cas9, qui se lie au motif PAM et clive la chaîne d'ADN complémentaire au sgRNA (Figure 26). En plus de l'excision, ce système peut également insérer un nouveau fragment d'ADN à l'endroit du clivage (Savic and Schwank, 2016). CRISPR/Cas9 a initialement été utilisé pour inactiver spécifiquement l'allèle mutant de la HTT (Figure 27) par excision de la séquence d'ADN dans un modèle cellulaire de fibroblastes issus de patients, menant à la réduction presque totale de l'ARN et de la protéine mutée (Shin et al., 2016; Monteys et al., 2017; Xu et

## Introduction

al., 2017). En 2017, Yang et collaborateurs ont testé ce système dans le striatum des souris KI CAG 140. Les auteurs ont montré une suppression permanente de l'expression de la HTT mutée endogène dans le striatum, une réduction de la neuropathologie et une amélioration des fonctions motrices des souris (Yang et al., 2017). Ces résultats suggèrent que l'édition de gène *via* CRISPR/Cas9 pourrait être une stratégie thérapeutique intéressante pour éliminer la toxicité neuronale induite par l'expansion de polyQ dans le gène *HTT* chez les patients atteints de la MH.



**Figure 27 : Inactivation spécifique de l'allèle muté médiée par CRISPR/Cas9.**

(B) Pour cibler l'allèle de la HTT mutée, deux sgRNAs sont créés pour encadrer l'exon 1 du gène. Ces sgRNA 1 et 2 ciblent des SNPs au sein des sites PAM souvent associés à l'allèle muté. Ainsi l'excision de l'exon 1 est effectuée spécifiquement dans l'allèle muté. (A) L'allèle sain ne comportant pas les SNPs, les sgRNA ne peuvent se fixer, la Cas9 n'est pas recrutée et la transcription de l'exon 1 se fait normalement. (D'après Caron et al., 2018)

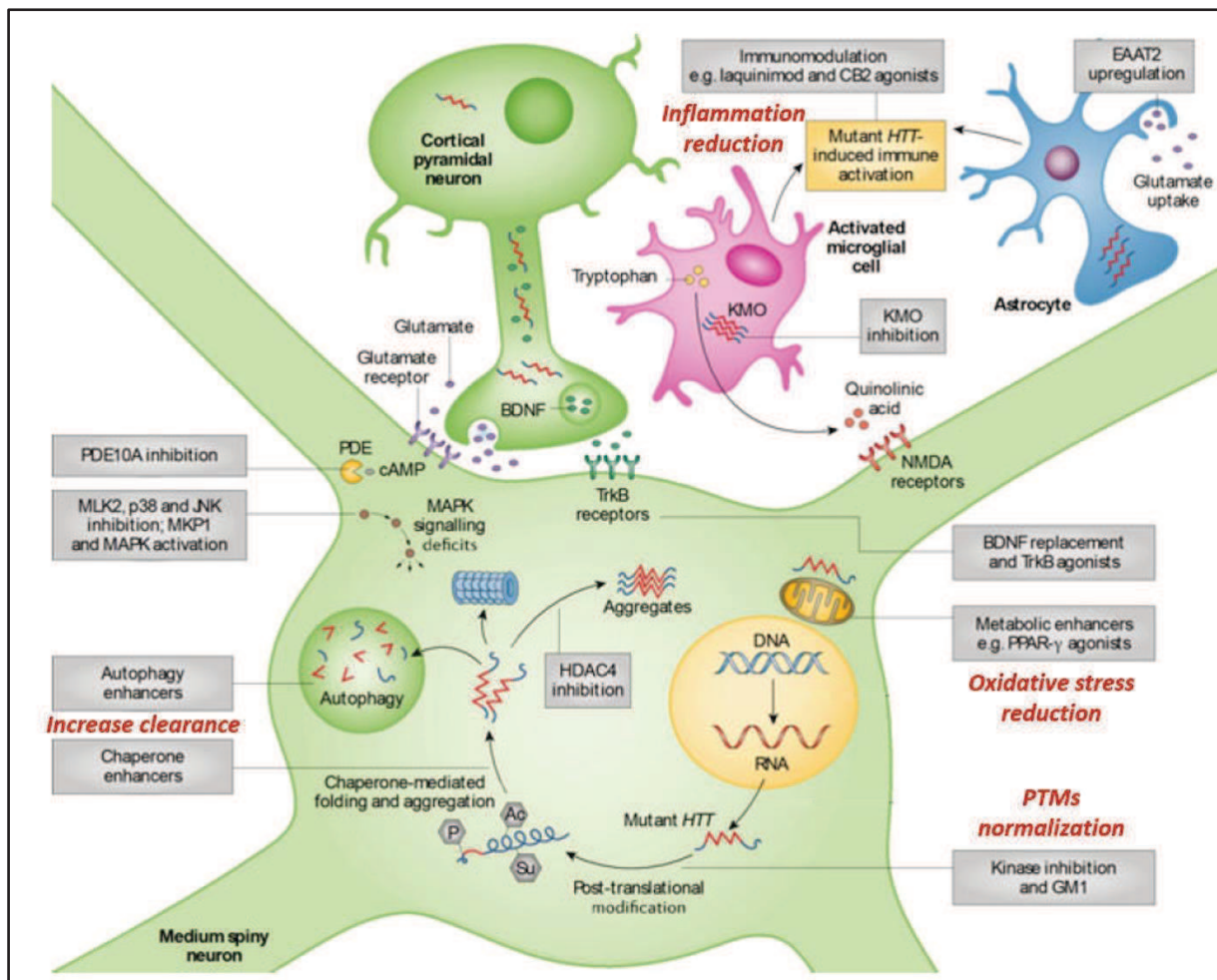
### 3.2.3. Les thérapies pharmacologiques

Il existe un grand nombre de molécules pharmacologiques testées dans le cadre de la MH pour tenter d'améliorer les altérations protéotoxiques cytoplasmiques (Figure 28) et nucléaires causées par la HTT mutée. Bien que les stratégies ciblant l'ADN et l'ARN de la HTT mutée soient prometteuses (Wild and Tabrizi, 2017), elles sont limitées par leur mode d'administration et le manque de recul par rapport à leurs effets secondaires. La simplicité d'administration (par voie orale généralement) et la variété des composés pharmacologiques visant à réduire la toxicité de la HTT mutée sont particulièrement avantageuses. Cependant, la diversité des mécanismes pathogéniques liés à la HTT mutée complique l'identification de cibles pharmacologiques pertinentes et le traitement pharmacologique de la MH nécessiterait probablement une approche avec des cibles multiples.

3.2.3.a. Les thérapies ciblant la protéotoxicité cytoplasmique de la huntingtine

Les cibles cytoplasmiques testées pour améliorer la pathologie sont très variées et résumées dans les revues suivantes : Bates et al., 2015; Caron et al., 2018; Ghosh and Tabrizi, 2018.

La HTT est sujette à de nombreuses PTMs qui sont altérées dans la MH et modulent la toxicité de la protéine mutée (cf partie 2.1.1.b Les modifications post-traductionnelles de la huntingtine, p.31). Ainsi, une approche consiste à cibler les PTMs de la HTT mutée (Figure 28) : par exemple, l'administration du ganglioside GM1 au modèle YAC128 de la MH entraîne une amélioration des déficits moteurs des souris, associée à une augmentation des résidus sérine 13 et 16 de la HTT (Di Pardo et al., 2012).



**Figure 28 : Illustration des cibles pharmacologiques cytoplasmiques testées pour la MH.**

Les molécules pharmacologiques utilisées pour la MH ciblent divers mécanismes pathogéniques : les PTMs de la HTT mutée pour réduire sa toxicité, le dysfonctionnement mitochondrial pour réduire le stress oxydatif, l'altération des processus autophagiques pour augmenter la dégradation de la HTT mutée, le dysfonctionnement de production du BDNF ou encore l'inflammation cérébrale causée par une hyperactivité du système immunitaire des patients. (D'après Ghosh and Tabrizi, 2018).

## Introduction

Les mécanismes de repliement et de clairance des protéines étant altérés dans la MH, une stratégie thérapeutique consiste à réduire le mauvais repliement de la HTT mutée et à augmenter sa dégradation par les mécanismes d'autophagie ([Figure 28](#)). La molécule Selisstat, un inhibiteur de la désacétylase SIRT1 (*Silent information regulator T1*), a un effet neuroprotecteur sur des modèles cellulaires et animaux (Smith et al., 2014). Cet effet est médié par une augmentation de l'acétylation de la HTT mutée qui favorise sa dégradation par les processus autophagiques. Un essai clinique en phase II a testé l'effet de cette molécule qui est bien tolérée chez l'Homme, mais qui n'entraîne pas de changements cliniques majeurs, ni de modification de la quantité de HTT soluble (Reilmann et al., 2014; Süßmuth et al., 2014). Par ailleurs, des effets bénéfiques ont été observés dans des études précliniques visant à réduire l'agrégation de la HTT, en augmentant l'activité des chaperonnes (Labbadia et al., 2012) et en augmentant directement la macroautophagie (Renna et al., 2010) ([Figure 28](#)) (Pour revue : Bates et al., 2015).

D'autre part, plusieurs essais cliniques sont centrés sur l'amélioration du dysfonctionnement mitochondrial avec une réduction du stress oxydant ([Figure 28](#)). Un traitement avec le coenzyme Q10, une molécule antioxydante, n'a pas révélé de changement majeur du phénotype (McGarry et al., 2016) tandis que la créatine, qui augmente la quantité d'ATP dans les cellules, entraîne un ralentissement de l'atrophie cérébrale (Rosas et al., 2014). D'autres essais visant à améliorer le dysfonctionnement mitochondrial ont été réalisés mais aucun effet bénéfique n'a été décrit (Pour revue : Caron et al., 2018).

Les autres approches montrant une éventuelle amélioration ou un ralentissement de la pathologie ont pour objectif d'augmenter la quantité cérébrale de BDNF (Reilmann et al., 2017) et de réduire l'inflammation cérébrale associée à une activation gliale, causée par l'hyperactivité du système immunitaire des patients atteints de la MH ([Figure 28](#)) (Caron et al., 2018).



### 3.2.3.b. [Les thérapies ciblant la protéotoxicité nucléaire de la huntingtine](#)

#### **Les inhibiteurs de HDACs**

Depuis la détection de l'HAT CBP dans les agrégats de HTT mutée (Kazantsev et al., 1999; Nucifora Jr., 2001; Steffan et al., 2001), les stratégies visant à augmenter l'acétylation des histones en utilisant des inhibiteurs de HDAC (HDACi) se sont multipliées pour tenter d'améliorer la pathogenèse de la MH (Pour revue : Valor, 2015). En fonction de leur homologie avec les enzymes chez la levure, les HDACs sont classées en 4 catégories ([Tableau II](#)) : la classe I (HDACs 1, 2, 3, 8) localisée dans le noyau, les classes IIa (HDACs 4, 5, 7, 9) et IIb (HDACs 6 et 10) localisée dans le cytoplasme et le noyau, la classe IV (HDAC 11 uniquement) présente dans le noyau. La classe III de HDACs regroupe les homologues des protéines Sir2 (Sirtuines) de levure (Sharma and Taliyan, 2015). Les HDACi permettent de stopper le cycle cellulaire des tumeurs, d'induire la mort cellulaire et de réduire l'angiogenèse, c'est pourquoi ils ont initialement été utilisés pour le traitement des cancers (Eckschlager et al., 2017). Ils sont classés en 4 familles selon leur structure : les acides gras à chaîne courte, les dérivés d'acide hydroxamique, les benzamides et les tétrapeptides ([Tableau II](#)).

De nombreuses études pré-cliniques ont été menées avec des HDACi à large spectre ciblant de manière non sélective des HDAC de classe I et II. Ces études sont très variées et montrent globalement une amélioration du phénotype des modèles animaux de la MH après traitement (Pour revue : Sharma and Taliyan, 2015; Valor, 2015; Francelle et al., 2017).

Les dérivés de l'acide hydroxamique sont connus pour inhiber les HDACs possédant un domaine catalytique avec un ion zinc, comme les classes I et II (HDACs 1 à 10) ([Tableau II](#)). L'activité des HDACs est inhibée par la fixation des dérivés de l'acide hydroxamique sur l'ion zinc (Villar-Garea and Esteller, 2004).

La trichostatine A (TSA) a été la première molécule caractérisée (Yoshidas et al., 1990) et a montré un effet bénéfique sur le déficit de mémoire de reconnaissance des souris Hdh<sup>Q7/Q111</sup> et sur la transcription de gènes cibles de CREB/CBP (*Arc*, *Fos*) dans l'hippocampe (Giralt et al., 2012). Au niveau fonctionnel, la TSA augmente la survie cellulaire *in vitro* (Mccampbell et al., 2001) et réduit la toxicité de l'expansion de polyQ en agissant notamment sur le transport du BDNF (Dompierre et al., 2007), l'homéostasie du Ca<sup>2+</sup> (Oliveira et al., 2006) et le stress oxydatif (Ryu et al., 2003).

**Tableau II : Sélectivité et classification des HDACi.**  
(Liste non exhaustive)

Classe des HDACi		Dérivés d'acide hydroxamique	Dérivés d'acides gras	Benzamides			Inhibiteurs de sirtuines	
Classe des HDACs	HDAC	SAHA, Trichostatine A	Valproate, butyrate, phénylbutyrate	4b	RGFP966	MS-275, CL-994	Selisistat	Nicotinamide
Classe I	HDAC 1	✓	✓	✓		✓		
	HDAC 2	✓	✓					
	HDAC 3	✓	✓	✓	✓			
Classe IIa	HDAC 4	✓	✓					
	HDAC 5	✓	✓					
Classe IIb	HDAC 6	✓						
Classe IIa	HDAC 7	✓	✓					
Classe I	HDAC 8	✓	✓					
Classe IIa	HDAC 9	✓	✓					
Classe IIb	HDAC 10	✓						
Classe IV	HDAC 11							
Classe III	Sirtuine 1						✓	✓
	Sirtuine 2							✓
	Sirtuine 3							✓
	Sirtuine 4							✓
	Sirtuine 5							✓
	Sirtuine 6							✓
	Sirtuine 7							✓

L'acide subérylanilide hydroxamique (SAHA), un autre dérivé de l'acide hydroxamique, est la première molécule à avoir été approuvée par la FDA en 2006 pour le traitement des lymphomes des cellules T. Dans le cadre de la MH, le traitement avec le composé SAHA améliore les troubles moteurs des souris R6/2 (Hockly et al., 2003; Mielcarek et al., 2011) et les altérations fonctionnelles et moléculaires liées à la HTT mutée : le transport et la transcription du BDNF (Dompierre et al., 2007; Mielcarek et al., 2011), le stress oxydatif (Ryu et al., 2003), la survie cellulaire (Steffan et al., 2001) ou encore l'acétylation des histones (Hockly et al., 2003). De plus, les travaux de Mielcarek et collaborateurs en 2011 montrent que SAHA réduit l'agrégation de la HTT mutée dans le cerveau des souris R6/2, un effet médié par l'activation du protéasome (Mielcarek et al., 2011).

Plus récemment, l'effet d'un autre dérivé de l'acide hydroxamique, le composé LBH589, a été évalué chez plusieurs modèles murins de la MH (Chopra et al., 2016; Siebzehnrübl et al., 2018). Ce traitement a un effet bénéfique au niveau comportemental, moléculaire et épigénétique, avec une hyper-acétylation de l'histone H3 (Chopra et al., 2016). Approuvé par la FDA pour le traitement des myélomes, le LHB589 a été testé en oncologie chez l'Homme en phase clinique

## Introduction

II/III (Atadja, 2009; Garnock-Jones, 2015). Ce composé, qui pourrait être testé sur des patients atteints de la MH, présente l'avantage d'être 10 fois plus efficace que la molécule SAHA, tout en engendrant moins d'effets secondaires (Chopra et al., 2016).

Les acides gras à chaîne courte (SCFA) constituent une seconde catégorie d'HDACi très étudiée dans la MH. En comparaison avec les dérivés d'acide hydroxamique, les SCFAs ont un effet inhibiteur moins puissant, mais peuvent très facilement passer la barrière hémato-encéphalique (BHE) en raison de leur faible poids moléculaire (Xu et al., 2007). Le mécanisme d'action des SCFAs est encore mal compris. Leur potentiel inhibiteur modéré pourrait être lié à leur incapacité à accéder à l'ion zinc dans le site catalytique des HDACs qui apparaît être essentiel à la catalyse de la désacétylation (Lu et al., 2004). Les trois principaux composés des SCFAs sont le butyrate de sodium (SB), le phénylbutyrate (PB) et le valproate. Ils augmentent tous les trois la survie de modèles animaux de la MH et l'acétylation des histones, particulièrement l'acétylation de H3 et H4 (Steffan et al., 2001; Ferrante et al., 2003; Ryu et al., 2003; Gardian et al., 2005; Sadri-Vakili et al., 2007; Zádori et al., 2009; Chiu et al., 2011).

Le SB améliore les performances motrices de souris modèles de la MH et réduit l'atrophie cérébrale (Ferrante et al., 2003; Naia et al., 2017), un effet bénéfique corrélé à une amélioration de la phosphorylation oxydative, du métabolisme mitochondrial, de l'homéostasie du calcium et de la transcription des gènes (Ferrante et al., 2003; Oliveira et al., 2006; Naia et al., 2017).

Les déficits moteurs sont également améliorés par un traitement au valproate chez la souris N171-82Q (Zádori et al., 2009), un effet qui pourrait être lié, en partie, à une augmentation de la transcription du BDNF (Chiu et al., 2011). Testé en clinique sur une petite cohorte de patients, le traitement au valproate a entraîné une réduction de l'hyperkinésie des sujets atteints de la MH (Saft et al., 2006). Récemment, un cas clinique avec un traitement au valproate ayant amélioré les troubles comportementaux et psychiatriques du patient, a été décrit dans la littérature (Chrétien et al., 2018).

En revanche, aucun effet comportemental n'a été décrit pour le traitement au PB. Pourtant, ce composé réduit l'atrophie cérébrale, renforce les systèmes de dégradation protéique en augmentant l'expression de gènes associés au protéasome (gènes codants pour des sous-

## Introduction

unités du protéasome *Psmc3*, *Psmc3*, *Psmc10*) (Gardian et al., 2005) et restore l'expression de gènes sous-exprimés dans le striatum comme *Drd2* et *Penk1* (Sadri-Vakili et al., 2007).

L'effet des dérivés de l'acide hydroxamique et des SCFAs est peu sélectif et ces composés ciblent essentiellement les HDACs de classe I (Tableau II) (Sharma et al., 2015). Les benzamides, une autre catégorie de HDACi qui ciblent essentiellement les HDACs 1 et 3 (Tableau II), sont plus sélectifs (Pour revue : Jia et al., 2012; Thomas, 2014).

Par exemple, Thomas et collaborateurs ont synthétisé un HDACi de type benzamide, le composé 4b, qui a un fort potentiel d'inhibition des HDACs 1 et 3 (Thomas et al., 2008). Les résultats obtenus avec le traitement 4b sont hétérogènes : l'étude de Thomas et collaborateurs (2008) montre une amélioration du phénotype moteur chez les souris R6/2 traitées, une réduction de l'atrophie cérébrale et une restauration de l'expression de certains gènes particulièrement dans le cervelet (*Aqp1* et *Cldn1* codant pour l'aquaporine 1 et la claudine 1 respectivement), associée à une augmentation de l'acétylation de l'histone H3 (Thomas et al., 2008). De même, l'amélioration des performances motrices et cognitives des souris traitées avec le composé 4b est aussi rapportée par Jia et collaborateurs (Jia et al., 2012a). Ils ont également décrit une réduction du nombre d'agrégats de HTT mutée dans le striatum Huntington, en raison d'un renforcement de la protéolyse *via* l'augmentation de l'expression de gènes associés au système UPS (*Ube2k*, *Ube2e3*) et à l'autophagie (*Atg4c*, *Atg9c*) (Jia et al., 2012a). Chen et collaborateurs ont reproduit ces études avec les souris R6/2 et N171-82Q mais n'ont pas retrouvé l'ensemble des effets bénéfiques du traitement HDACi 4b décrits précédemment (Chen et al., 2013).

Plus récemment, l'effet du traitement avec un HDACi spécifique de HDAC3, RGFP966, a été évalué en pré-clinique et a montré une amélioration de l'atrophie striatale et des déficits moteurs et cognitifs chez des modèles murins de la MH (Jia et al., 2016; Suelves et al., 2017). Les travaux de Suelves et collaborateurs (2017) décrivent une normalisation de l'expression de gènes associés à la mémoire dans l'hippocampe (*Arc*, *Nr4a2*, *Fos*), mais aussi l'expression de gènes de l'identité striatale (*Darpp32*, *Pde10a*). Les auteurs ont également décrit une stabilisation de l'expansion de CAG et une réduction des oligomères de HTT mutée (Suelves et al., 2017). Ces résultats suggèrent qu'une stabilisation de la répétition de CAG limiterait l'augmentation de la taille de l'expansion de polyQ de la HTT mutée, réduisant sa toxicité et conduisant ainsi à des améliorations de la fonction striatale et des déficits moteurs (Suelves

## Introduction

et al., 2017). Jia et collaborateurs (2016) en revanche, suggèrent que RGFP966 diminue l'activation des cellules gliales dans le striatum des souris N171-82Q, mais ne réduit pas l'agrégation de la HTT mutée comme l'indiquait l'étude de Suelves et collaborateurs en 2017 (Jia et al., 2016).

Il est important de noter que les HDACi décrits ci-dessus n'affectent pas les HDACs de classe III, les sirtuines, en raison de leur différence structurelle et fonctionnelle. En effet, les HDACs III nécessitent la liaison d'une molécule de NAD<sup>+</sup> dans leur site actif pour pouvoir réaliser la désacétylation. Par conséquent, un composé qui inhibe la liaison de NAD<sup>+</sup> dans leur site actif agit comme inhibiteur de classe III. C'est le cas de la nicotinamide par exemple, qui inhibe l'ensemble des sirtuines, ou du composé Selisistat qui inhibe sélectivement la sirtuine 1 et qui a fait l'objet d'un essai clinique sans effet bénéfique majeur (Tableau II) (Süssmuth et al., 2014).

En conclusion, les HDACi permettent une amélioration du phénotype de la MH et certains composés sont testés en clinique. Cependant, ils montrent globalement des réponses fonctionnelles hétérogènes, parfois bénéfiques, parfois sans effets, et semblent souvent cibler l'agrégation de la HTT mutée alors que l'expression des gènes d'identité neuronale dans la MH reste altérée (Coppedè, 2014; Sharma et al., 2015; Valor, 2015; Francelle et al., 2017). De plus, leur mode d'action étant principalement non spécifique et non ciblé, les HDACi peuvent conduire à une cytotoxicité à long terme suite à la désacétylation de promoteurs non spécifiques (Boutillier et al., 2003; Sasakawa et al., 2005; Ganai et al., 2016).

### Les activateurs de HATs

En opposition aux HDACi, une autre approche pour augmenter l'acétylation des histones de façon plus spécifique consiste à activer les HATs. Les molécules activatrices des HATs sont peu utilisées, principalement en raison de leur incapacité à traverser les membranes cellulaires et la BHE contrairement aux HDACi.

La CTPB [N-(4-chloro-3-trifluorométhylphényl)-2-éthoxybenzamide], un dérivé de l'acide anacardique, a été le premier activateur de HAT caractérisé (Balasubramanyam et al., 2003; Souto et al., 2010). L'acide anacardique a été découvert initialement pour ses propriétés anti-tumorales et était isolé à partir du liquide extrait des coquilles de noix de cajou (Kubo et al., 1993). Contrairement à l'acide anacardique qui inhibe l'activité HAT de p300 et PCAF

## Introduction

(p300/CBP-associated factor), CTPB est capable d'activer p300 (Balasubramanyam et al., 2003). En revanche, cette molécule ne passe pas la BHE. Selvi et collaborateurs (2008) ont montré que la liaison de CTPB à une nanosphère de carbone, appelée CSP (Carbon nanosphere), lui permettait de traverser la BHE et donc d'activer l'auto-acétylation de p300 *in vivo* (Selvi et al., 2008). En effet, leur étude montre que CTPB-CSP induit une hyper-acétylation de H3, avec une augmentation du recrutement de l'ARN Pol II menant à une augmentation de la transcription (Selvi et al., 2008).

Une étude sur les polyhydroxybenzophénones, des composés naturels, a conduit à l'identification d'un autre activateur de p300, le nemorosone (Dal Piaz et al., 2010). Cette molécule augmente l'acétylation des histones H3 et H4 dans des lignées cellulaires HeLa, mais cette étude ne permet de pas de juger de son efficacité *in vivo* (Dal Piaz et al., 2010). En 2012, Wei et collaborateurs ont utilisé un autre activateur des HATs, le SPV106 (pentadecylidenemalonate 1b) capable d'augmenter l'activité de l'HAT PCAF et l'acétylation des histones. Son administration a amélioré les capacités mnésiques de souris WT lors d'une tâche de conditionnement de peur (Wei et al., 2012).

Plus récemment, la molécule TTK21 a été développée par la collaboration entre le Dr. Anne-Laurence Boutillier (LNCA, Strasbourg) et le Pr. Tapas Kundu (JNCASR, Bangalore, Inde). TTK21 était à l'origine un dérivé de CTPB, mais a été ensuite synthétisé à partir de l'acide salicylique (Chatterjee et al., 2013; Schneider et al., 2013). Ce composé est plus stable et plus puissant que CTPB et est capable d'activer les HATs CBP et p300 *in vitro*. En revanche, TTK21 ne traverse pas la BHE sans transporteur, il a donc été conjugué à CSP par une liaison covalente (Chatterjee et al., 2013). Ainsi, la molécule CSP-TTK21 est capable de passer la BHE sans entraîner de toxicité. CSP-TTK21, après injection intra-péritonéale chez la souris, induit l'acétylation des histones dans plusieurs régions cérébrales, particulièrement l'hippocampe et le cortex frontal mais aussi plus modérément dans le striatum et le cervelet (Chatterjee et al., 2013). Le traitement avec la molécule CSP-TTK21 favorise la maturation et la différenciation des progéniteurs neuronaux dans le gyrus denté (DG), augmente la transcription du BDNF et du marqueur de différenciation NeuroD1 dans l'hippocampe de souris WT. Au niveau comportemental, dans une tâche de navigation spatiale (piscine de Morris) les performances mnésiques des souris WT traitées avec CSP-TTK21 sont significativement augmentées (Chatterjee et al., 2013). De plus, l'activation de CBP/p300 avec CSP-TTK21 restore les

## Introduction

altérations épigénétiques et transcriptionnelles dans l'hippocampe d'un modèle murin de la maladie d'Alzheimer et permet une amélioration de la plasticité synaptique et des performances comportementales des souris malades en piscine de Morris (Chatterjee et al., 2018). Ces résultats suggèrent que l'augmentation de l'acétylation des histones *via* la stimulation directe des HATs comme CBP et p300, serait une stratégie thérapeutique intéressante pour les maladies neurodégénératives. Or à l'heure actuelle aucun activateur de HAT n'a été testé dans le cadre de la MH.

# OBJECTIFS DE LA THESE

---





## Objectifs

La MH affecte de façon primaire le striatum et plus particulièrement les MSNs : les réponses comportementales sous le contrôle du striatum, de même que les circuits neuronaux et les mécanismes cellulaires et subcellulaires qui régulent l'activité de cette structure, sont altérés très précocement dans la MH. Cependant, les relations de cause à effet qui lient les dysfonctionnements observés à ces différentes échelles d'analyse restent mal comprises, ce qui limite notre capacité à manipuler le striatum pour corriger ces dysfonctionnements dans un but thérapeutique.

Ainsi, la MH est caractérisée par des déficits moteurs, cognitifs et des troubles de la personnalité. Ces symptômes s'accompagnent de dérégulations transcriptionnelles et épigénétiques qui touchent particulièrement le striatum. Mais, étonnement, le rôle de ces altérations moléculaires dans la mise en place des troubles comportementaux n'est pas démontré : les dérégulations épigénétiques et transcriptionnelles jouent-elles un rôle causal dans l'apparition des déficits comportementaux ou en sont-elles une conséquence ? La question reste ouverte.

Au cours de ma thèse, je me suis intéressée à la corrélation entre les altérations moléculaires et comportementales, afin de mieux comprendre à quel point les déficits comportementaux dans la MH sont sous-tendus par les dérégulations transcriptionnelles et épigénétiques décrites dans le striatum.

Pour cela, J'ai utilisé un modèle murin de la MH, la souris R6/1. Les analyses moléculaires ont été réalisées après un apprentissage, de manière à induire dans les neurones des modifications transcriptionnelles et épigénétiques qui favorisent la plasticité synaptique et le processus de mémorisation. Ainsi, nous avons choisi une tâche comportementale impliquant le striatum, le labyrinthe en double-H, un test aquatique qui permet d'évaluer la mémoire procédurale des animaux. Ce nouveau test a été développé au laboratoire, initialement pour le Rat (Pol-Bodetto et al., 2011; Cassel et al., 2012) et nous l'avons adapté à la Souris. Comme pour le test de la piscine de Morris, le test du labyrinthe en double-H est fondé sur une phase d'apprentissage de plusieurs jours et sur une phase de rappel. Cette dernière phase permet d'évaluer la capacité des animaux à apprendre la tâche, ainsi que la stratégie d'apprentissage qu'ils mettent en œuvre.

## Objectifs

Pour évaluer la dynamique des changements moléculaires au cours de l'apprentissage, les tissus cérébraux et/ou cerveaux des souris ont été collectés en condition basale (au repos), après 2 jours d'apprentissage et à l'issue du rappel. Nous avons alors réalisé des analyses histologiques et transcriptomiques (RNA-seq) à partir du matériel collecté.

D'autre part, les tests pré-cliniques basés sur l'utilisation des HDACi, des composés relativement toxiques, ont montré une amélioration partielle des performances motrices chez les souris modèles de la MH (Ferrante et al., 2003; Hockly et al., 2003; Mielcarek et al., 2011; Jia et al., 2016; Suelves et al., 2017). Cependant, les mécanismes moléculaires associés aux bénéfices comportementaux des traitements par les HDACi n'ont pas été caractérisés de manière approfondie et apparaissent peu sélectifs. Plus surprenant, aucune de ces études ne montre que les HDACi entraînent une augmentation de l'acétylation des histones au niveau des gènes de l'identité striatale ou même une activation transcriptionnelle de ces gènes. Une limite majeure de ces études est le manque de données transcriptomiques et épigénomiques pour évaluer l'impact des HDACi sur l'expression des gènes et sur l'acétylation des histones à l'échelle du génome.

Au cours de ma thèse, je me suis intéressée au potentiel thérapeutique d'une stratégie alternative aux HDACi visant à augmenter plus directement l'acétylation des histones en stimulant l'activité HAT de CBP *via* la molécule CSP-TTK21 (Chatterjee et al., 2013, 2018). Les souris R6/1 ont été traitées avec le composé CSP-TTK21 et l'effet de ce traitement a été évalué au niveau comportemental (tests cognitifs, moteurs et d'anxiété), histologique, transcriptionnel (RNA-seq) et épigénétique (ChIP-seq).

Dans l'ensemble, nos analyses permettent de définir pour la première fois avec une extrême précision la relation qui lie les altérations épigénétiques, la dérégulation transcriptionnelle et les déficits comportementaux associés à la MH. Elles permettent également de préciser le mode d'action *in vivo* d'une molécule modulant l'acétylation des histones dans le striatum d'un modèle murin de la MH. Ainsi, une meilleure compréhension des mécanismes sous-jacents aux altérations comportementales permettrait d'ouvrir de nouvelles perspectives quant à l'identification de cibles thérapeutiques pour la MH.

# MATERIEL & METHODES

---



## 1. ANIMAUX

Les souris utilisées au cours de ma thèse ont été hébergées dans des cages de dimensions standards (365 x 207 x 140 mm), par groupe de 5 individus maximum en dehors des expériences de comportement, avec nourriture et eau fournis *ad libitum*. Les paramètres d'éclairage (Cycle jour/nuit de 12h), de température (22°C  $\pm$ 2), d'humidité (55%  $\pm$ 5) et d'ambiance sonore (radio en phase diurne) de l'animalerie ont été contrôlés en continu. Toutes les études animales ont été menées en accord avec les directives européennes concernant l'expérimentation animale (Directive européenne 2010/60/EU – Loi française du code rural R 214-87 à 131). Les protocoles expérimentaux ont été réalisés en respectant les procédures approuvées par le Comité Régional d'Ethique en Matière d'Expérimentation Animale de l'Université de Strasbourg (CREMEAS) et le Ministère Français de la Recherche (Numéros d'autorisation : APAFIS#504, APAFIS#4752, APAFIS#10529).

La lignée R6/1 (Mangiarini et al., 1996) provenant initialement de chez Jackson Laboratory a été maintenue au laboratoire sur un fond génétique C57BL6/J. Le génotypage a été réalisé après extraction de l'ADN génomique des bouts d'oreilles prélevés sur les souris. Une amplification de l'exon 1 de la HTT mutée avec des amorces spécifiques (Sens : ATGAAGGCCTTCGAGTCCCTCAAGTCCTTC ; Anti-sens : GGCGGCTGAGGAAGCTGAGGA) a été réalisée par PCR, puis les produits de PCR ont été déposés sur un gel d'agarose à 1,5% et séparés par électrophorèse. Toutes les souris ont été identifiées par une micro-puce injectée en sous-cutané permettant d'associer un numéro de référence à chaque souris. La taille de l'expansion de CAG des souris R6/1 a été mesurée par PCR : celle-ci était de l'ordre de 150 CAG. Des animaux mâles et femelles ont été utilisés pour nos expériences et les résultats obtenus avec les souris R6/1 ont été comparés à ceux obtenus avec les souris WT provenant des mêmes portées.

## 2. TRAITEMENT PHARMACOLOGIQUE DES SOURIS

### 2.1. Groupes expérimentaux

L'effet de la molécule CSP-TTK21 (Chatterjee et al., 2013, 2018) sur le phénotype comportemental des souris R6/1 dans le labyrinthe en double-H a été évalué à l'aide de quatre groupes expérimentaux : deux groupes de souris WT ont été traités avec une solution saline, dont l'un a été testé dans le labyrinthe en double-H (WT Saline) et l'autre est resté en cage d'élevage (WT HC) ; un groupe de souris R6/1 a été traité avec l'activateur de CBP/p300, TTK21, couplé à des nanosphères de carbone (CSP) (R6/1 CSP-TTK21) (cf partie [3.2.3.b Les thérapies ciblant la protéotoxicité nucléaire de la huntingtine](#), p.71) ; un autre groupe de souris R6/1 a été traité uniquement avec les CSP (R6/1 CSP). Les groupes de souris R6/1 CSP-TTK21 et R6/1 CSP ont tous deux été testés dans le labyrinthe en double-H.

Les molécules CSP-TTK21 et CSP, synthétisées par le Pr Tapas Kundu (Bangalore, Inde), n'étant disponibles qu'en petite quantité, nous avons conçu les expériences avec un nombre limité de groupes expérimentaux. Ainsi, un groupe de souris WT traité avec le composé CSP-TTK21 et un autre traité avec la molécule CSP n'ont pas été inclus dans les expériences, car l'effet de ces traitements sur des souris WT a été testé préalablement dans l'étude de Chatterjee et collaborateurs (2013). La mémoire procédurale des souris WT Saline, R6/1 CSP et R6/1 CSP-TTK21 a été évaluée au cours de plusieurs expériences répétées, dont les résultats ont été regroupés par la suite.

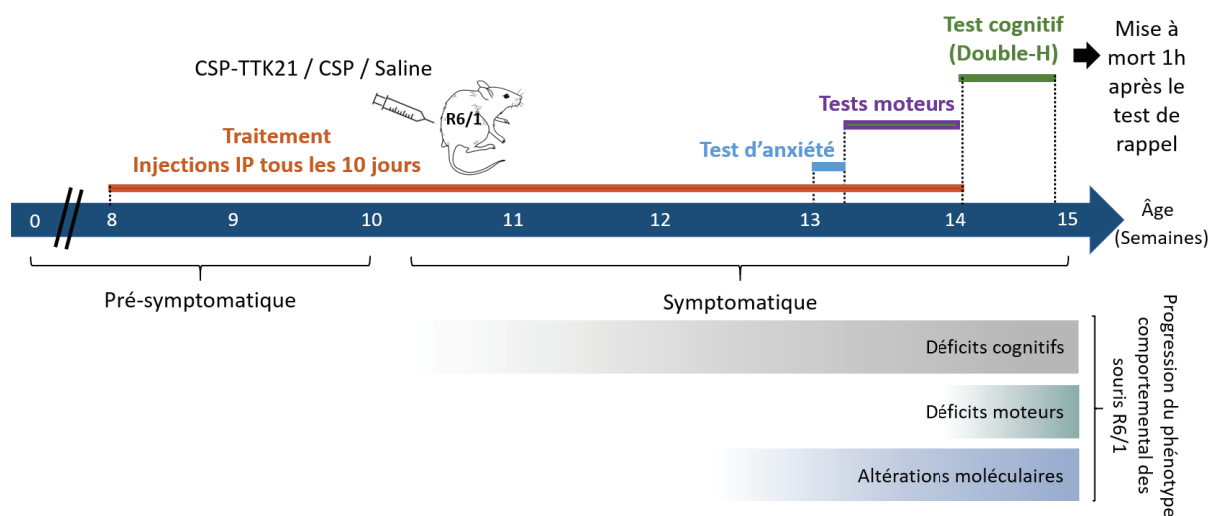
### 2.2. Protocole du traitement pharmacologique des souris

Le protocole de traitement des souris que nous avons utilisé est établi sur la base du protocole utilisé précédemment décrit dans la littérature (Chatterjee et al., 2013, 2018). Les molécules CSP et CSP-TTK21, lyophilisées, ont été aliquotées et stockées à -20°C. Extemporaneément au traitement, les molécules ont été re-suspendues dans de l'eau pure à une concentration finale de 2 mg/ml, puis soniquées avec une amplitude de 30% (Bioblock Scientific Vibra Cell 75041), 2x 10 secondes pour le composé CSP et 2x 6 secondes pour la molécule CSP-TTK21.

## Matériel & Méthodes

Le traitement des souris a été effectué avant les tests comportementaux, à partir d'un stade pré-symptomatique (8 semaines) et jusqu'à un stade symptomatique précoce (14 semaines) (Figure 29). La solution saline, le CSP et le CSP-TTK21 ont été injectés aux souris tous les 10 jours par voie intra-péritonéale à une dose de 20mg/kg.

Le poids des souris a été relevé chaque semaine tout au long du traitement. De 13 à 14 semaines, les performances souris WT Saline, R6/1 CSP et R6/1 CSP-TTK21 ont été testées dans des tâches comportementales évaluant leur anxiété et leurs performances motrices (Figure 29). La mémoire procédurale des souris dans le labyrinthe en double-H a été évaluée à l'âge de 14 semaines (Figure 29).



**Figure 29 : Planning expérimental du traitement pharmacologique des souris avec la molécule CSP-TTK21 et de l'évaluation de son effet comportemental.**

Les souris WT et R6/1 ont été traitées par voie intra-péritonéale (IP) avec les molécules CSP-TTK21, CSP ou une solution saline à partir de l'âge de 8 semaines jusqu'à l'âge de 14 semaines. L'effet du traitement a ensuite été évalué au niveau comportemental de 13 à 14 semaines avec un test d'anxiété et des tests moteurs. A 14 semaines, la mémoire procédurale des souris a été testée dans le labyrinthe en double-H, puis les souris ont été mises à mort 1h après le test de rappel pour réaliser les analyses moléculaires et histologiques sur les tissus cérébraux.

### 3. ANALYSES COMPORTEMENTALES

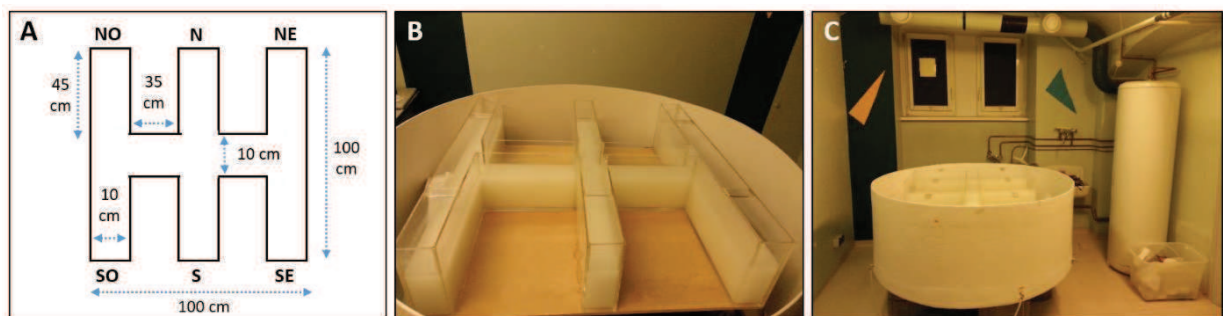
Les tests comportementaux ont été réalisés lors de la phase diurne du cycle jour/nuit des souris. Avant toute première session de comportement, les souris ont été manipulées 3 jours avant le début des tests comportementaux, à raison d'une manipulation de 1 minute par jour.



### 3.1. Evaluation des performances cognitives

#### 3.1.1. [Le labyrinthe en double-H](#)

Les performances cognitives dépendantes du striatum des souris ont été évaluées à l'aide du labyrinthe en double-H. Ce test a été développé au laboratoire initialement pour le Rat (Pol-Bodetto et al., 2011; Cassel et al., 2012) et nous l'avons adapté à la Souris. Le dispositif est constitué de 3 bras parallèles en plexiglas (55x10x25cm) perpendiculaires à une allée centrale (100x10x25cm). Par convention, les extrémités du bras central sont désignées comme le bras Nord (N) et le bras Sud (S). Les extrémités des deux autres bras sont appelées Nord-Ouest (NO), Nord-Est (NE), Sud-Ouest (SO) et Sud-Est (SE) ([Figure 30A](#)). Le double-H est positionné dans le dispositif de piscine de Morris, dans une pièce comportant des indices visuels. Les bras du double-H sont remplis avec de l'eau fraîche (21°C) opacifiée avec 70g de blanc de Meudon ([Figure 30B,C](#)).



**Figure 30 : Dispositif du labyrinthe en double-H.**

**(A)** Schéma des dimensions du dispositif, constitué de 6 bras (NO, N, NE, SO, S, SE) reliés par une allée centrale. **(B)** Les bras sont remplis d'eau fraîche opacifiée par du blanc de Meudon. **(C)** Le dispositif est positionné dans le bassin de la piscine de Morris dans une pièce contenant des indices visuels (formes géométriques au mur, chauffe-eau).

#### 3.1.1.a. [Evaluation de la mémoire procédurale des souris](#)

Le test du labyrinthe en double-H consiste en une tâche de navigation orientée vers un but, impliquant la mémoire procédurale dépendante du striatum et la mémoire spatiale impliquant l'hippocampe. En effet, au cours de la tâche de navigation, les animaux doivent apprendre à retrouver une plateforme immergée dans de l'eau opacifiée, positionnée dans un des bras du dispositif. La plateforme permet aux animaux de sortir du dispositif et d'échapper à la situation aversive que représente l'environnement aquatique.

## Matériel & Méthodes

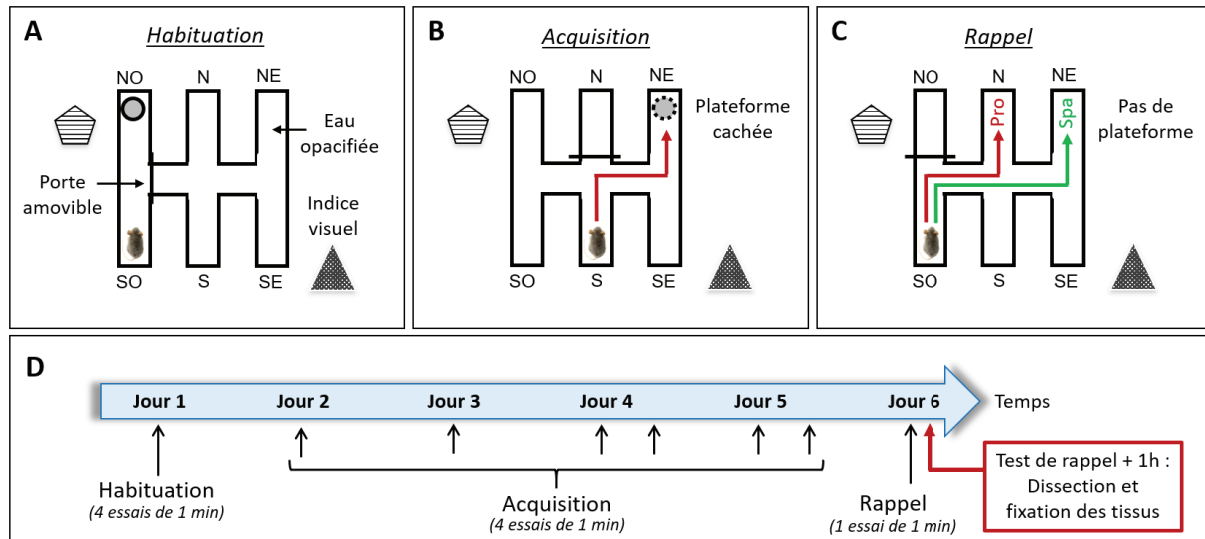
Pour retrouver la plateforme, les souris peuvent solliciter deux stratégies de navigation : une stratégie procédurale (égocentrique) qui consiste à apprendre la séquence de mouvements permettant de rejoindre la plateforme ou une stratégie spatiale (allocentrique) basée sur l'utilisation des indices visuels de la pièce. Au cours de la tâche, le point de lâcher des souris et la position de la plateforme sont constants afin de favoriser l'apprentissage procédural. Un test de rappel est ensuite effectué pour évaluer la stratégie effectivement utilisée par les souris. Pour cela, le point de lâcher est translaté dans le bras voisin et la plateforme est retirée.

Le protocole que nous avons utilisé (Pol-Bodetto et al., 2011; Cassel et al., 2012) comporte une phase d'habituation, une phase d'acquisition et une phase de rappel. L'habituation permet aux souris d'apprendre l'existence de la plateforme immergée leur permettant de sortir du dispositif. Pour cela, le bras NO-SO est isolé grâce à une porte en plexiglas amovible fermant l'accès au reste du labyrinthe ([Figure 31A](#)). L'eau du dispositif n'est pas opacifiée, la plateforme alors visible est positionnée à l'extrémité du bras NO et les souris sont lâchées à l'extrémité du bras SO. Quatre essais discrets d'une durée maximale de 1 minute sont réalisés. Lorsque les souris atteignent la plateforme, un délai de 10 secondes est respecté avant de les sortir du dispositif et de les replacer dans leur cage d'élevage placée sous une lampe chauffante.

Lors de la phase d'acquisition, l'eau est opacifiée et la plateforme est immergée dans le bras NE. Les souris sont lâchées dans le bras S et doivent apprendre la séquence de mouvements (tourner à droite puis à gauche) permettant de rejoindre la plateforme. La porte amovible en plexiglas ferme le bras N ([Figure 31B](#)). Six sessions d'acquisition ont été réalisées sur 4 jours, à raison d'une acquisition par jour les deux premiers jours, puis deux acquisitions par jour les deux derniers jours ([Figure 31D](#)). Chaque acquisition comprend 4 essais discrets, d'une durée maximale de 1 minute. Lorsqu'une souris n'atteint pas la plateforme avant la fin l'essai, elle y était guidée par l'expérimentateur. Comme lors de l'habituation, un délai de 10 secondes est respecté lorsque les souris atteignent la plateforme avant de les sortir du dispositif et de les replacer en cage d'élevage sous lampe chauffante.

Le lendemain du dernier jour d'apprentissage, le test de rappel est réalisé et consiste en un unique essai de 1 minute, pendant lequel la plateforme est retirée et les souris sont lâchées dans le bras SO. Le bras NO est fermé par la porte en plexiglas pour reproduire les conditions de la phase d'acquisition ([Figure 31C](#)). Les souris utilisant une stratégie procédurale pour

trouver la plateforme tournant à droite puis à gauche et atteignent le bras N, aussi appelé bras « procédural ». Les souris utilisant une stratégie spatiale rejoignent directement le bras NE, appelé bras « spatial », dans lequel se trouvait la plateforme lors de l'apprentissage (Figure 31C).



**Figure 31 : Protocole d'évaluation de la mémoire procédurale des souris dans le labyrinthe en double-H.**

(A) Lors de l'habituation, les souris doivent nager dans un bras isolé du dispositif pour atteindre une plateforme visible. (B) Lors de la phase d'acquisition, les souris sont entraînées à apprendre une séquence de mouvements (tourner à droite puis à gauche) pour atteindre la plateforme immergée, cachée dans le bras NE, à partir du bras S. (C) La stratégie d'apprentissage des souris, procédurale vs spatiale, est évaluée lors du test de rappel pendant lequel la plateforme est retirée et le point de lâcher translaté dans le bras SO. Les souris qui mobilisent une stratégie procédurale rejoignent le bras N ou bras « procédural » (Pro), celles qui utilisent une stratégie spatiale atteignent le bras S ou bras « spatial » (Spa). (D) Le protocole dure 6 jours, avec une phase d'acquisition de 4 jours comprenant 6 sessions d'entraînement. Le lendemain le test de rappel est effectué et les souris sont mises à mort 1h après la fin de celui-ci.

Les déplacements des souris ont été enregistrés grâce à une caméra et au logiciel de détection de mouvements ANY-maze. Au cours de l'acquisition, les performances des animaux ont été évaluées par l'analyse de la distance parcourue pour atteindre la plateforme et la latence d'accès à la plateforme. Nous avons également calculé le pourcentage de réponses correctes des souris à chaque essai : un score de 1 a été attribué aux souris allant directement à la plateforme et un score de 0 aux souris commettant une ou plusieurs erreurs.

Lors du test de rappel, le premier et le second bras visités par les souris est relevé, ainsi que la latence pour accéder aux bras cibles (NE et N) et le temps qu'elles y ont passé. Le temps passé dans chaque bras est ensuite comparé au temps « hasard » (8,5 secondes), défini comme le temps de l'essai (60 secondes) divisé par le nombre de bras pouvant être visités (NE, SE, Central Est, N, S, Central Ouest, SO).

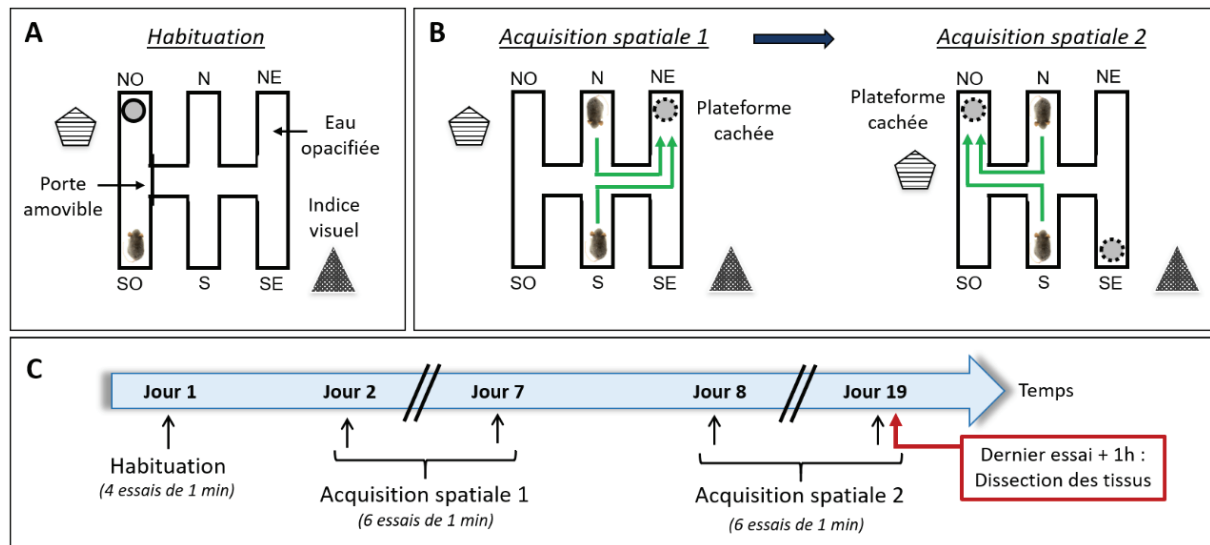
### 3.1.1.b. *Evaluation de la flexibilité cognitive*

Pour approfondir les possibilités du test du labyrinthe en double-H, nous avons développé un protocole qui permet d'évaluer la flexibilité cognitive des souris. Cette fonction cognitive, qui désigne la capacité à passer d'une tâche cognitive à une autre, dépend du striatum et du cortex préfrontal. La flexibilité cognitive des souris a été testée grâce à deux apprentissages successifs dans le labyrinthe en double-H rempli d'eau fraîche opacifiée.

Après une étape d'habituation (Figure 32A), les souris ont été entraînées avec un protocole spatial (Spatial 1) nécessitant l'utilisation des indices visuels de la pièce pour retrouver la plateforme immergée : la plateforme était toujours située dans le bras NE et les souris étaient lâchées de manière aléatoire dans le bras N ou le bras S (Figure 32B). Nous avons comptabilisé le nombre d'erreurs initiales effectuées par les souris et calculé le pourcentage de réponses correctes correspondant.

Lorsque 80% de réponses correctes sont atteints par les souris au cours du premier protocole spatial, la position de la plateforme est modifiée pour tester la capacité des souris à adapter leur comportement à un nouveau protocole. Ainsi, au cours du deuxième protocole spatial, la plateforme est positionnée dans le bras NO (Figure 32B).

Un entraînement de 6 jours à raison d'une acquisition par jour a été nécessaire pour atteindre 80% de réponses correctes lors de l'apprentissage Spatial 1. Nous avons entraîné les souris dans le protocole Spatial 2 pendant 11 jours, dans le but d'observer si les performances des souris R6/1 progressent au cours de l'entraînement (Figure 32C). Chaque acquisition était constituée de 6 essais consécutifs, d'une durée maximale de 1 minute. Lorsqu'une souris n'atteignait pas la plateforme à la fin de l'essai, elle y était guidée. Un délai de 10 secondes était respecté lorsque les souris avaient atteint la plateforme avant de les replacer dans leur cage d'élevage positionnée sous une lampe chauffante. Les déplacements des souris ont été enregistrés grâce à une caméra et au logiciel de détection de mouvements ANY-maze.



**Figure 32 : Protocole d'évaluation de la flexibilité cognitive des souris dans le labyrinthe en double-H.**

(A) Lors de l'habituation, les souris doivent nager dans un bras isolé du dispositif pour atteindre une plateforme visible. (B) Les souris sont entraînées à utiliser une stratégie spatiale pour retrouver la plateforme immergée dans le bras NE, en étant lâchées aléatoirement dans le bras N ou le bras S. Lorsque les souris ont atteint 80% de réponses correctes dans ce protocole, la position de la plateforme change. La plateforme est alors positionnée dans le bras NO et les souris doivent adapter leur stratégie spatiale à la nouvelle position de la plateforme. (C) Le premier entraînement spatial a été réalisé durant 6 jours et le deuxième pendant 11 jours, avec pour chacun, une acquisition de 6 essais par jour.

### 3.1.2. [La piscine de Morris](#)

La piscine de Morris est une tâche comportementale utilisée classiquement pour évaluer la mémoire spatiale des souris qui dépend de l'hippocampe (Morris, 1984). Le dispositif est un bassin circulaire de 120 cm de diamètre, rempli d'eau fraîche (21°C) opacifiée avec du blanc de Meudon. La piscine est virtuellement divisée en 4 quadrants égaux (NE, SE, NO, SO) et une plateforme immergée est placée au centre de l'un d'eux (Figure 33B). La salle d'expérimentation est la même que celle utilisée pour le labyrinthe en double-H et contient de nombreux indices visuels sur les murs (Figure 33A).

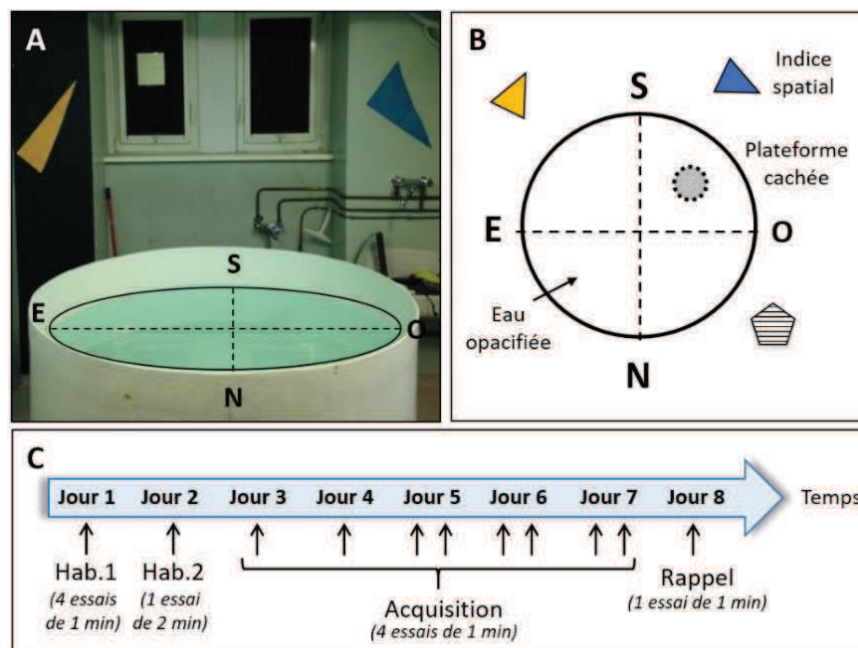
Le protocole comporte une phase d'habituation, une phase d'acquisition et une phase de test. La phase d'habituation commence par apprendre aux souris l'existence d'une plateforme leur permettant d'échapper à la situation aversive que représente l'environnement aquatique dans la piscine. Pour cela, lors de 4 essais discrets d'une durée maximale de 1 minute, les souris sont lâchées au centre de la piscine et doivent rejoindre une plateforme visible, indiquée et non immergée, placée dans le quadrant NO. Le lendemain de cette première habituation, la plateforme est retirée et les souris sont lâchées au centre de la

## Matériel & Méthodes

piscine lors d'un unique essai d'une durée de 2 minutes. Cette étape permet d'une part d'habituer les souris à nager sans trouver de plateforme et d'autre part de vérifier l'absence de biais de préférence pour un des quadrants de la piscine.

Pendant la phase d'apprentissage, la plateforme est immergée sous 0,5cm d'eau opacifiée et positionnée au centre du quadrant SO. Le point de lâcher des souris diffère aléatoirement entre chaque essai (N, S, E ou O) afin que les souris n'utilisent pas une stratégie alternative à la stratégie spatiale pour trouver la plateforme (Figure 33B).

L'entraînement est constitué de 8 acquisitions réalisées sur 5 jours, avec 4 essais d'une durée maximale de 1 minute par acquisition. Une seule acquisition par jour est effectuée les deux premiers jours d'entraînement, puis 2 acquisitions quotidiennes sont réalisées lors des 3 derniers jours d'entraînement (Figure 33C). Lorsqu'une souris n'atteint pas la plateforme avant la fin de l'essai, elle y est guidée. Un délai de 10 secondes est respecté lorsque la souris atteint la plateforme, avant de la replacer dans sa cage d'élevage positionnée sous une lampe chauffante.



**Figure 33 : Protocole d'évaluation de la mémoire spatiale des souris en piscine de Morris.**

(A) La piscine de Morris est un grand bassin rempli d'eau opacifiée, placé dans une pièce comportant des indices visuels. (B) La piscine est virtuellement divisée en 4 quadrants (NE, SE, SO, NO). (C) Au cours de cette tâche, les souris sont entraînées à retrouver une plateforme immergée, placée au centre du quadrant SO, en mobilisant une stratégie spatiale basée sur l'utilisation des indices visuels de la pièce. A chaque essai, les souris sont lâchées aléatoirement sur le bord de la piscine, à la position N, S, E ou O. (C) Après deux habituations (Hab. 1 ; Hab. 2), la phase d'entraînement est constituée de 8 acquisitions de 4 essais chacune, réalisées sur 5 jours. Le lendemain de la dernière acquisition, la mémoire spatiale des souris est testée lors du rappel d'une durée de 1 minute, où la plateforme est retirée du dispositif et les souris sont lâchées au centre de la piscine.

## Matériel & Méthodes

Le lendemain de la dernière acquisition, les performances des souris sont évaluées lors d'un test de rappel. La plateforme est retirée et les animaux sont lâchés au milieu de la piscine au cours d'un essai unique d'une durée de 1 minute.

Les déplacements des souris sont enregistrés à l'aide d'une caméra et du logiciel ANY-maze. Les performances des souris pendant l'acquisition sont évaluées en analysant la distance parcourue pour rejoindre la plateforme, ainsi que la latence nécessaire aux souris pour accéder à la plateforme. Pendant le test de rappel, le temps passé dans chacun des quadrants de la piscine est mesuré et comparé au hasard (15 secondes), temps correspondant à la durée de l'essai divisé par le nombre de quadrants.

### 3.1.3. La tâche de localisation d'objets

La mémoire spatiale des souris a également été évaluée à l'aide du test de localisation d'objets, qui repose sur le caractère naturel et spontané des rongeurs à explorer préférentiellement un objet déplacé parmi d'autres objets inchangés (Ennaceur and Delacour, 1988). Cette tâche permet d'évaluer une mémoire spatiale basée sur la configuration spatiale des objets dans un environnement, impliquant l'hippocampe et le cortex entorhinal.

Ce test est particulièrement sensible au stress des animaux qui pourrait interférer avec leur comportement d'exploration, nous avons donc minimisé le stress lié à la préhension des souris en les manipulant à l'aide d'un cylindre en plastique auquel elles ont été préalablement habituées. L'aspect aversif de l'environnement de test est minimisé par une réduction de la luminosité de la pièce d'expérimentation (50 lux). Une radio émet un fond sonore ( $45 \pm 5$  dB) comme dans la pièce de stabulation pour minimiser l'impact de potentielles perturbations sonores extérieures.

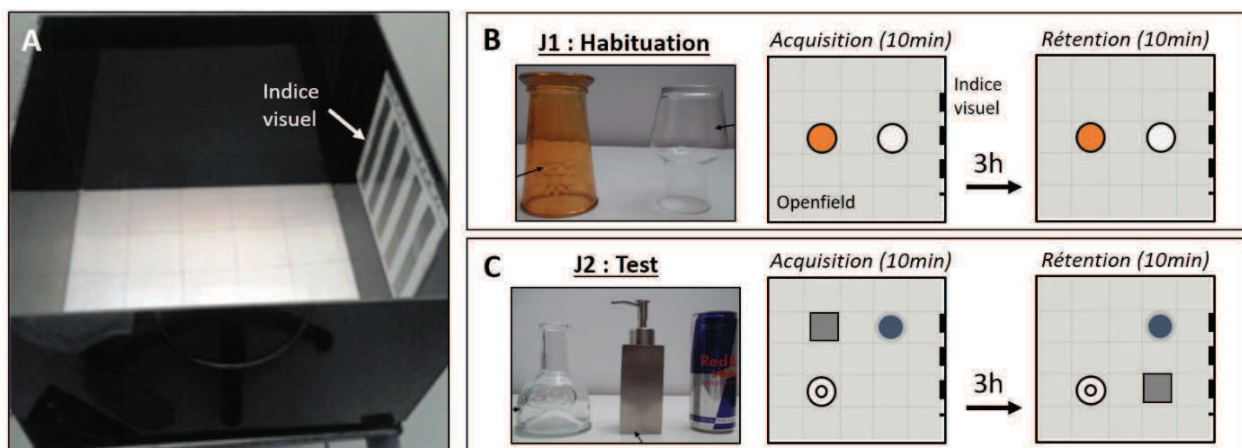
Le dispositif expérimental consiste en un champ ouvert carré (55 x 55 x 40cm) en plexiglas opaque noir, avec plancher quadrillé (carrés de 11 x 11cm) permettant de positionner les objets avec précision dans l'enceinte. Une des parois du dispositif comporte un indice visuel qui sert de point de repère proximal (Figure 34A). Trois objets sont utilisés et diffèrent par leur couleur, leur taille, leur forme et leur texture.

Le test de localisation d'objets comporte une phase d'acquisition et une phase de rétention pendant lesquelles la souris explore les objets.

## Matériel & Méthodes

Le protocole débute avec une habituation au champ ouvert et à la présence d'objets dans l'environnement des souris. Pour cela, deux objets, différents de ceux utilisés pour le test, sont positionnés dans le champ ouvert à deux positions jamais utilisées pour le test. L'habituation se déroule comme le test, avec une phase d'acquisition de 10 minutes suivie d'une phase de rétention de 10 minutes après un délai de 3h (Figure 34B).

Le lendemain de l'habituation, le trio d'objets positionnés dans le champ ouvert comme indiqué sur la figure 34C, est présenté à la souris lors de la phase d'acquisition de 10 minutes. Après un délai de 3h, un objet est déplacé pour la phase de rétention et la souris est à nouveau positionnée dans le champ ouvert pour une deuxième phase d'exploration des objets de 10 minutes (Figure 34C). Une souris ayant mémorisé la position des objets lors de la phase d'acquisition reconnaît qu'un objet a été déplacé pour la phase de rétention et passe plus de temps à l'explorer par rapport aux objets non déplacés.



**Figure 34 : Protocole d'évaluation de la mémoire spatiale des souris dans une tâche de localisation d'objets.**

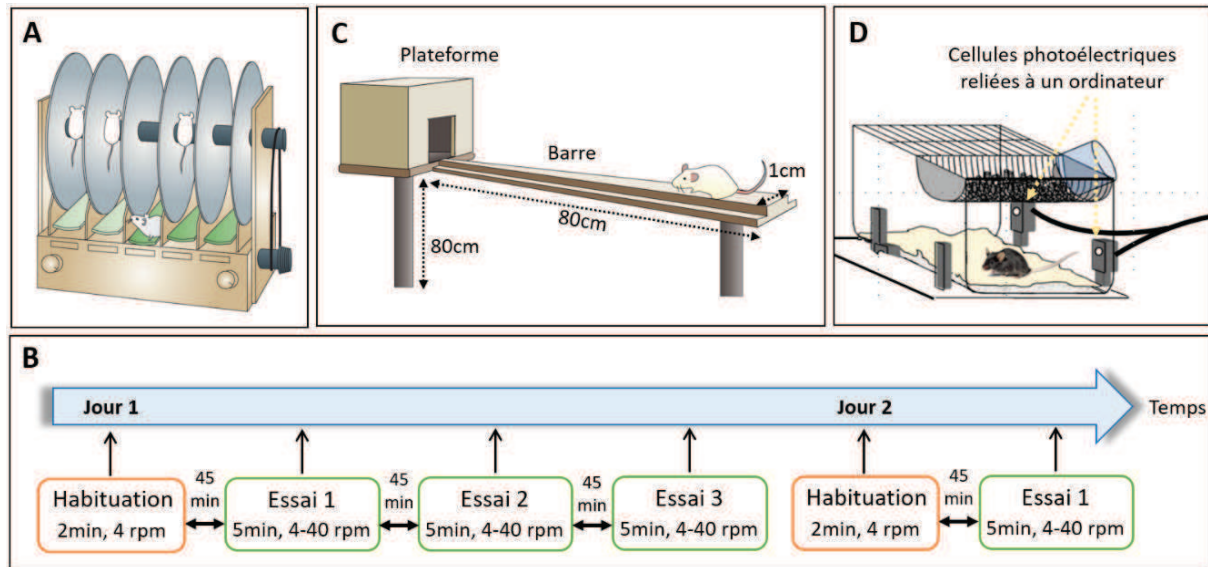
(A) Le test de localisation d'objets est réalisé dans un champ ouvert avec un sol quadrillé et un indice visuel affiché sur un mur du dispositif. (B) Le test débute par une phase d'habituation au champ ouvert avec une paire d'objets (ici un verre orange et une carafe transparente) placés à des endroits non utilisés lors du jour de test. Durant une phase d'acquisition de 10min, les souris sont libres d'explorer les objets dans le champ ouvert. Après un délai de 3h, les mêmes objets placés aux mêmes endroits que lors de l'acquisition, sont ré-exposés aux souris pendant 10min. (C) Le lendemain de l'habituation, 3 objets (ici une bouteille, une cannette et un distributeur à savon) sont présentés aux souris dans le champ ouvert pendant 10min. Après un délai de 3h, les souris sont mises en présence des mêmes objets pendant 10min, à la différence que l'un des objets a été déplacé. Grâce à leur mémoire spatiale, les souris sont capables d'identifier l'objet déplacé et passent plus de temps à l'explorer que les objets non déplacés.

Pendant chaque phase (acquisition et rétention), le temps total d'exploration de chaque objet est mesuré, sachant qu'une exploration d'un objet est considérée lorsque la souris le renifle à une distance maximale de 1cm, le museau dirigé vers l'objet.



Les performances des souris sont évaluées en calculant le ratio entre le temps d'exploration de l'objet déplacé et le temps total d'exploration des trois objets. Ce ratio est ensuite comparé au hasard, correspondant au temps total de l'essai divisé par les trois objets (33%).

### 3.2. Evaluation des performances motrices



**Figure 35 : Tests comportementaux évaluant les performances motrices des souris WT et R6/1.**

(A) Schéma représentant le rotarod (Brooks and Dunnett, 2009). (B) Le protocole du rotarod comporte une habitude de 2min pendant laquelle le cylindre tourne à une vitesse de 4 rotations par minute (rpm), puis 3 essais sont effectués avec une accélération progressive de la rotation de 4 à 40rpm sur 5min. L'habitude et chaque essai sont séparés d'un délai de 45min. Ce protocole est répété sur 3 jours. (C) Schéma représentatif du test de franchissement de la barre (Brooks and Dunnett, 2009). (D) Schéma représentatif d'une cage placée en actographie.

#### 3.2.1. Rotarod

Le test du rotarod permet d'évaluer la coordination motrice et les capacités d'apprentissage moteur des souris (Brooks and Dunnett, 2009). Le dispositif est constitué d'un cylindre rotatif sur lequel les souris doivent marcher (Figure 35A).

Le protocole est réalisé sur 3 jours consécutifs avec une phase d'habitude et une phase d'acquisition quotidiennes (Galvan et al., 2018). L'habitude consiste à faire marcher les souris sur le cylindre tournant à une vitesse de 4 rotations par minutes (rpm) pendant 2 minutes. La phase d'acquisition comporte trois essais d'une durée maximale de 5 minutes, au cours desquels les souris doivent marcher sur le cylindre dont la rotation accélère progressivement de 4 à 40rpm. L'habitude et chaque essai sont espacés de 45 minutes

([Figure 35B](#)). La latence avant la chute des souris et la vitesse de rotation au moment de la chute sont relevées.

### 3.2.2. [Test de franchissement de la barre](#)

La coordination motrice et l'équilibre des souris ont été évalués à l'aide du test de franchissement de la barre (Brooks and Dunnett, 2009). Le dispositif est constitué d'une planche en bois (80x10x1cm) divisée en 8 segments de 10 cm, maintenue à 80 cm du sol par un trépied. Une plateforme menant à la cage d'élevage de la souris est positionnée à l'extrémité de la planche ([Figure 35C](#)).

Lors d'une phase d'habituation, les souris sont entraînées à marcher sur la barre pour atteindre la plateforme et rejoindre leur cage. Pour cela, les souris sont déposées sur la barre à 10 cm de la plateforme et l'accès aux 70 cm restant de la barre est bloqué. L'habituation est stoppée uniquement lorsque les souris rejoignent spontanément leur cage d'élevage. La phase de test est ensuite constituée de 4 essais discrets, d'une durée maximale de 1 min.

Le temps nécessaire pour traverser les 10 premiers centimètres, ainsi que le temps nécessaire pour franchir les 70 cm restants sont relevés et reflètent respectivement le niveau d'anxiété et la coordination motrice des souris.

### 3.2.3. [Actographie](#)

L'activité locomotrice spontanée, reflétant la fonction motrice et/ou la motivation et l'apathie des souris, a été mesurée avec un dispositif d'actographie pendant 2 jours consécutifs. L'enregistrement est réalisé grâce à deux cellules photoélectriques qui émettent un faisceau infrarouge, situées sur la paroi latérale de la cage ([Figure 35D](#)). Le nombre d'interruptions des faisceaux laser effectués par les souris a été relevé toutes les 10 min et a été moyenné sur plusieurs jours et nuits.

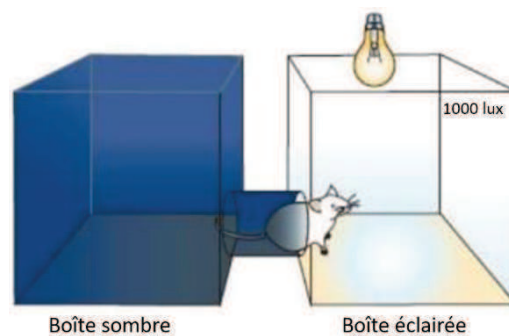
## 3.3. Evaluation de l'anxiété

Nous avons évalué l'anxiété des souris à l'aide du test de transition clair/obscur (Hickey et al., 2008; Pla et al., 2014). Le dispositif comporte 2 boîtes séparées par un couloir de petite taille, l'une étant complètement opaque et obscure et l'autre totalement transparente et

## Matériel & Méthodes

éclairée par une lampe (1000 lux) (Figure 36). Ce test repose sur l'aversion naturelle des souris pour les zones très éclairées, s'opposant à leur comportement exploratoire spontané dans un nouvel environnement. Ainsi une souris avec un niveau d'anxiété normal visite le compartiment éclairé de la boîte sans y rester très longtemps, tandis qu'une souris anxieuse le visitera beaucoup moins, voire aucunement.

Le protocole que nous avons utilisé consiste à placer les souris au milieu de la zone sombre et à mesurer leur activité pendant 5 minutes. Le temps de latence avant leur première entrée dans la zone éclairée, ainsi que le nombre de visites et le temps total passé dans la boîte éclairée sont relevés.



**Figure 36** : Evaluation de l'anxiété des souris avec le test de transition clair/obscur.

La boîte utilisée pour ce test d'anxiété comporte un compartiment sombre et un compartiment aversif éclairé par une lampe (1000 lux). La souris est déposée dans le compartiment sombre et est libre d'explorer les deux compartiments pendant 5 minutes. (D'après la source <https://www.inverse.com/article/46087-microbiome-high-fat-diet-depression>)

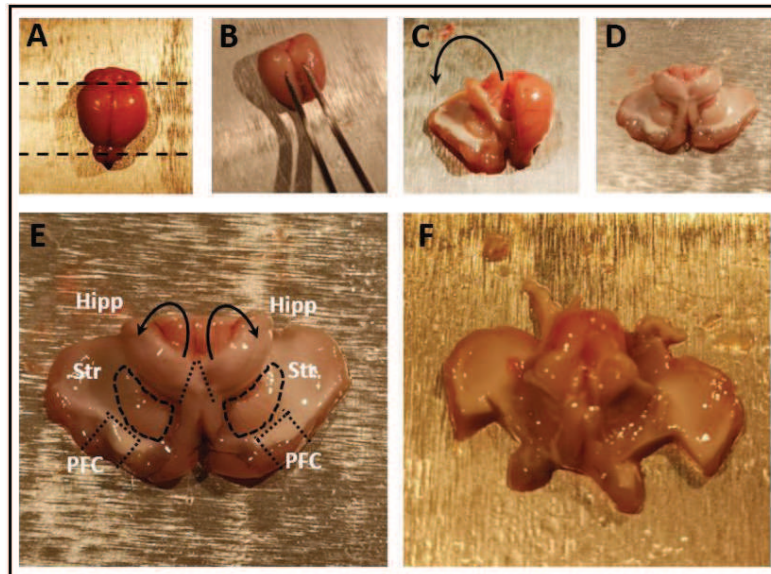
## 4. PRELEVEMENT DES TISSUS

Toutes les souris ont été mises à mort par dislocation cervicale 1h après le test de rappel dans le labyrinthe en double-H (Figure 31D). Le cerveau est rapidement sorti de la boîte crânienne et coupé entre les deux hémisphères avec un scalpel. L'un des hémisphères est disséqué pour réaliser les analyses moléculaires. L'autre hémisphère est fixé en vue des analyses histologiques.

### 4.1. Dissection des cerveaux

L'hémisphère gauche des cerveaux des souris est disséqué sur une plateforme positionnée dans la glace. Le striatum, l'hippocampe et le cortex préfrontal sont disséqués

comme présenté sur la [figure 37](#). Les tissus sont ensuite rapidement congelés dans de l'azote liquide et stockés dans un congélateur à -80°C jusqu'à leur utilisation.



**Figure 37 : Dissection des structures cérébrales des souris pour les analyses moléculaires.**

(A) Le cerveau de la souris est positionné sur une plateforme métallique refroidie par de la glace. Le cervelet et les bulbes olfactifs sont retirés. (B) Le corps calleux est dégagé en écartant le cortex avec une pince, puis légèrement entaillé. (C-D) Le cortex de chaque hémisphère est déplié vers la plateforme avec une pince. (E) Les structures sous-corticales sont alors accessibles. Le striatum (Str), l'hippocampe (Hipp) et le cortex préfrontal (PFC) sont retirés à l'aide du scalpel et de la pince. (F) Illustration du cerveau de souris après dissection des structures d'intérêt.

## 4.2. Fixation des cerveaux

L'hémisphère droit est fixé 6h à 4°C dans une solution de paraformaldéhyde à 4% (en tampon phosphate 0,1M ; pH 7,4 ; 4°C). Il est ensuite cryoprotégé par immersion dans une solution de saccharose à 20% (en tampon phosphate 0,1M ; pH 7,4 ; 4°C) pendant 48h. Le tissu est congelé dans l'isopentane à -35°C et conservé à -80°C jusqu'à son utilisation.

## 5. ANALYSES HISTOLOGIQUES

### 5.1. La stéréologie

La stéréologie est un outil basé sur un ensemble de méthodes mathématiques et statistiques permettant d'extraire des informations quantitatives (volumes, surfaces, longueurs, nombres) sur des éléments présents dans un volume défini. L'estimation quantitative au sein d'une structure en 3 dimensions est faite à partir de coupes en 2

dimensions et constitue une approche non-biaisée. En effet, les techniques classiques de mesures quantitatives en microscopie comportent deux types d'erreurs : les erreurs aléatoires (liées par exemple à la technique, la qualité du matériel) qui peuvent être minimisées en multipliant les mesures, et les erreurs systématiques (les biais) qui dépendent de la conception du protocole et de la méthodologie. La stéréologie permet de réduire les erreurs systématiques en limitant les biais à chaque étape du protocole de préparation des échantillons. Ainsi, l'estimation des éléments à compter est faite à partir d'un échantillonnage systématique, aléatoire et représentatif, dans un volume tissulaire déterminé et sans aucun postulat initial sur la taille, la forme ou la distribution spatiale des éléments à mesurer, afin que chacun ait la même probabilité d'être compté.

Dans le cadre de ma thèse, l'approche stéréologique m'a permis d'estimer quantitativement le nombre de cellules exprimant les protéines Fos, Egr1 et EM48 au sein de nos régions d'intérêt (striatum et hippocampe). Pour cela, j'ai constitué un échantillonnage non biaisé des structures cérébrales d'intérêt à deux niveaux : (1) au niveau des coupes sélectionnées pour le comptage (échantillonnage des coupes) qui permet de prendre en considération l'intégralité de la structure d'intérêt sans pour autant évaluer le nombre de neurones immunomarqués sur la totalité de sections de la structure ; (2) au niveau du volume de chaque coupe dans lequel le comptage est réalisé (dissecteurs optiques).

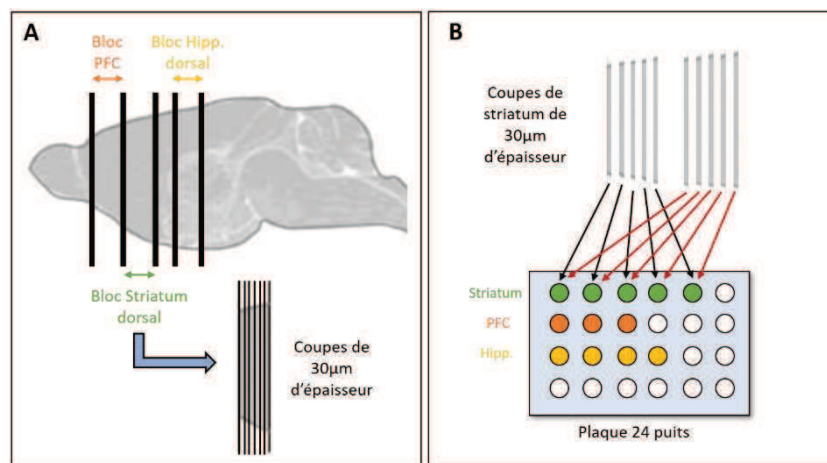
L'échantillonnage des coupes débute au moment de la coupe des cerveaux au cryostat. L'échantillonnage du volume de chaque coupe est réalisé au moment du comptage.

### **5.2. Coupes au cryostat**

Les hémisphères fixés (cf partie **4.2 Fixation des cerveaux**, p.99) sont coupés au cryostat (Microm HM560, Thermo Scientific) pour réaliser des coupes frontales de 30µm d'épaisseur, gardées à -20°C jusqu'à leur utilisation. Dans le but de respecter le principe de l'approche non biaisée par stéréologie et de permettre un échantillonnage des coupes, des blocs contenant les structures d'intérêt ont été définis grâce aux coordonnées stéréotaxiques de Paxinos et Watson (Figure 38A) (Cortex préfrontal : Bregma 2,34 à 1,34 ; Striatum : Bregma 1,34 à 0,02 ; Hippocampe dorsal : Bregma -1,22 à -2,30).

Pour chaque bloc, les coupes ont été récupérées dans un nombre défini de puits d'une plaque 24 puits contenant une solution cryoprotectante (30% glycérol, 30% éthylèneglycol, 40% tampon phosphate 0,1M) (Figure 38B). Ainsi, le cortex préfrontal, le striatum et l'hippocampe ont été récupérés dans 3, 5 et 4 puits respectivement (Figure 38B).

Pour chaque structure, les coupes ont été déposées successivement dans les puits. Plusieurs séries de coupes sont réalisées jusqu'à avoir en moyenne 7 à 10 coupes par puits (Figure X38 B). Ainsi, chaque puits contient un échantillon représentatif de coupes de l'ensemble de la structure cérébrale.



**Figure 38** : Préparation des coupes de cerveaux de souris pour l'immunohistochimie et le comptage par stéréologie.

(A) Des blocs contenant les structures d'intérêt (PFC, striatum, hippocampe) sont coupés au cryostat avec une épaisseur de 30µm. (B) Ces coupes sont ensuite déposées en séries dans une plaque 24 puits. PFC : cortex préfrontal ; Hipp. : Hippocampe.

### 5.3. Immunohistochimie sur coupes flottantes

Les marquages des protéines Fos et Egr1 issues de la transcription des IEGs *Fos* et *Egr1*, sont couramment utilisés pour mettre en évidence les noyaux activés après une stimulation neuronale. La production de ces protéines n'est pas immédiate, leur pic d'expression est maximal entre 60 et 90 minutes après la stimulation neuronale. C'est pourquoi nous avons mis à mort les souris 1h après le test de rappel dans le labyrinthe en double-H.

Les immunomarquages ont été réalisés sur des coupes de striatum et d'hippocampe. Pour chaque animal, les coupes ont été choisies en sélectionnant aléatoirement un seul puits représentatif de chaque structure.

## Matériel & Méthodes

L'ensemble du protocole d'immunomarquage est réalisé à température ambiante et sous agitation. Les coupes ont d'abord été rincées trois fois en PBS (*Phosphate-Buffered Saline*) afin d'enlever la solution cryoprotectrice dans laquelle les coupes étaient conservées. Les peroxydases endogènes ont ensuite été bloquées par une incubation de 20 minutes dans du peroxyde d'hydrogène 1%. Après trois rinçages en PBS, les sites antigéniques sont bloqués en incubant les coupes 1h dans du PBS contenant 5% de sérum de cheval et 0,5% de Triton X-100. Les coupes sont ensuite incubées toute la nuit sous agitation à température ambiante dans une solution d'anticorps primaire (Tableau III). Le lendemain, après trois rinçages en PBS, les coupes sont incubées 1h dans une solution d'anticorps biotinylés (Tableau III). Une amplification du marquage est réalisée par exposition de 45 minutes des coupes à une solution d'avidine-biotine-peroxydase diluée au 1/500 (Vectastain Avidine-Biotine Complex Kit, PK6100, Vector Laboratories). Après deux lavages en PBS et un lavage en tampon TRIS, le marquage est révélé par une incubation de 8 à 10 minutes avec la 3,3'-diaminobenzidine (DAB) (DAB Peroxydase Substrate Kit, SK4100, Vector Laboratories). La réaction est stoppée en retirant la solution de DAB et en effectuant trois lavages en PBS. Les coupes sont ensuite montées sur des lames gélatinées et séchées dans une étuve à 37°C pendant une nuit. Le lendemain, les coupes sont rincées dans de l'eau ultra-pure puis déshydratées dans des bains successifs d'éthanol de concentrations croissantes (70%, 95%, 100%). Les coupes sont ensuite plongées 5 minutes dans un solvant (Clearify, Medtronic) et montées entre lame et lamelle avec du milieu de montage (Diamount).

**Tableau III : Anticorps primaires et secondaires utilisés pour les immunomarquages des coupes de cerveaux**

	Anticorps	Espèce	Dilution	Référence
Primaires	Fos	Lapin	1/4000	226003/3 Synaptic System
	Egr1	Lapin	1/500	sc-110, Santa-Cruz Biotechnology
	EM48	Souris	1/500	MAB5374, Merck Millipore
Secondaires	Anti-Lapin biotinylé	Chèvre	1/500	ZB1007, Vector Laboratories
	Anti-Souris biotinylé	Cheval	1/500	BA2001, Vector Laboratories

## 5.4. Comptage neuronal par stéréologie

Les comptages ont été réalisés avec un microscope optique (Leica DM5500B), une platine motorisée permettant un déplacement dans les trois dimensions (X, Y, Z) et une caméra numérique (Optronics Microfire). Le logiciel utilisé pour la quantification par stéréologie est Mercator (Explora Nova, La Rochelle, France).

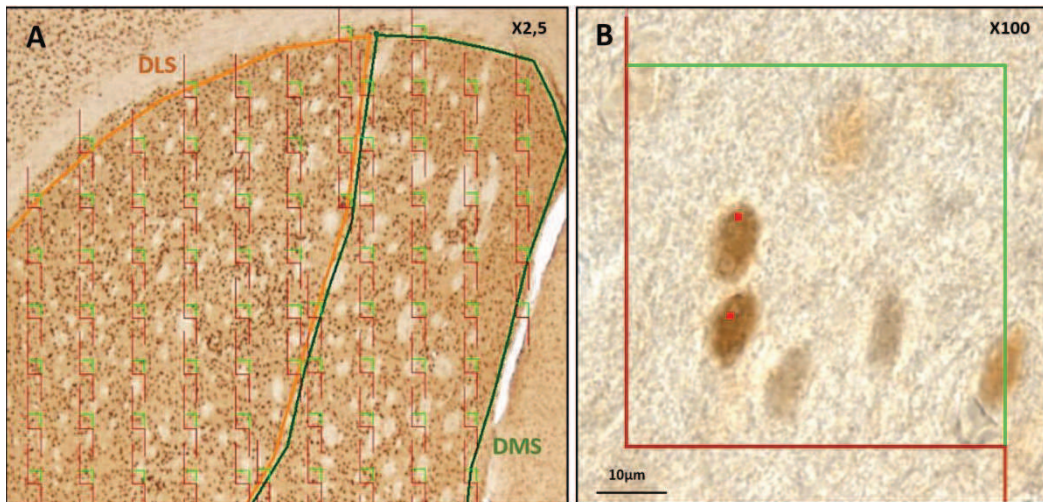
### 5.4.1. [Principe du dissecteur optique](#)

L'échantillonnage du volume des coupes dans lequel les neurones sont comptés est effectué à l'aide des dissecteurs optiques ([Figure 39](#)). Les dissecteurs sont des cubes virtuels permettant le comptage en 3 dimensions à l'aide d'un ensemble de sections optiques dans le plan Z. Le comptage des neurones s'effectue dans les plans X, Y et Z, uniquement à l'intérieur des dissecteurs répartis de manière aléatoire dans les structures d'intérêt grâce au logiciel de comptage Mercator. La taille des dissecteurs et leur espacement est choisi par l'expérimentateur en fonction de la densité du marquage, de la taille des éléments à compter et de la structure cérébrale ciblée. La fiabilité du comptage dépend des paramètres des dissecteurs et est représentée par le coefficient d'erreur (CE) fourni par le logiciel Mercator. Le CE correspond à la variabilité des comptages entre les coupes d'un animal et doit être inférieur à 0,15 pour avoir des résultats fiables. Si les dissecteurs sont trop petits ou trop espacés, un nombre trop faible de neurones est compté et le CE sera élevé. Ainsi, un comptage préliminaire de 2 ou 3 souris est nécessaire pour obtenir des CE représentatifs et valider les paramètres des dissecteurs.

Le comptage à l'aide des dissecteurs nécessite également de déterminer l'épaisseur réelle des coupes. En effet, des coupes de 30 $\mu$ m d'épaisseur sont réalisées au cryostat, mais en réalité l'épaisseur des coupes se situe plutôt autour de 15 $\mu$ m en raison de leur traitement (déshydratation, irrégularité des découpes au cryostat qui nécessite de retirer une marque de 2 $\mu$ m sur le côté inférieur et supérieur de la coupe pour avoir un bloc homogène).



Le nombre de neurones marqués est ensuite estimé dans l'ensemble de la coupe et l'ensemble de la structure cérébrale de chaque animal. Ce calcul est réalisé par la méthode du fractionneur optique du logiciel Mercator et tient compte de l'épaisseur réelle des coupes qui ont été comptées, de l'échantillonnage des coupes et des paramètres des dissecteurs.



**Figure 39 : Exemple de comptage neuronal avec les dissecteurs optiques.**

**(A)** Placement aléatoire des dissecteurs à l'intérieur des régions d'intérêt, ici le striatum dorsolatéral (DLS) et dorsomédian (DMS), au grossissement x2,5 avec le logiciel Mercator. **(B)** Exemple de neurones marqués positivement pour la protéine Egr1 à l'intérieur d'un dissecteur et comptés par pointage des noyaux.

### 5.4.2. Paramètres du comptage

Sur chaque coupe, les régions d'intérêt à compter sont délimitées au grossissement x2,5 (Figure 39A). Le comptage a été effectué à l'objectif x100 à immersion dans l'huile, dans les sous-régions du striatum dorsal, le DLS et le DMS, ainsi que dans les sous-régions de l'hippocampe dorsal, CA1, CA3 et le DG. Les paramètres des dissecteurs utilisés pour le comptage des protéines Fos et Egr1 sont les suivants : 40μm de côté et 120μm d'espacement pour le striatum ; 40μm de côté et 30μm d'espacement pour l'hippocampe. Pour le comptage du marqueur des agrégats de HTT mutée, EM48, les dissecteurs étaient de 25μm de côté et espacés de 120μm. L'épaisseur réelle des coupes mesurée était de 14μm et l'échantillonnage était de 1/5 pour le striatum et 1/4 pour l'hippocampe.

Toute cellule dont l'immunomarquage est au moins deux fois supérieur au bruit de fond est considérée comme immunopositive et est marquée manuellement dans le dissecteur par l'expérimentateur (Figure 39B). Seuls les neurones marqués positivement à l'intérieur du dissecteur ou touchant les lignes vertes de celui-ci sont comptabilisés (Figure 39B). Pour le

comptage du marquage EM48, le nombre de noyaux comportant un agrégat EM48+ a été compté et le diamètre des agrégats de HTT mutée a été mesuré à l'aide du logiciel Mercator (Explora Nova).

## 6. ANALYSES MOLECULAIRES DE L'EXPRESSION PROTEIQUE

### 6.1. Extraction des protéines totales

Pour chaque animal, les protéines ont été extraites à partir d'un striatum provenant de l'hémisphère gauche. Tout d'abord, le tissu a été grossièrement découpé sur glace avec une lame de scalpel puis dissocié à l'aide d'un homogénéisateur en plastique et d'une pipette, dans 150µL de tampon Laemmli 1X (Bio-Rad) contenant du  $\beta$ -mercaptoéthanol (1/40<sup>ème</sup> du volume total). Les lysats sont ensuite vortexés 10 secondes et laissés 30 minutes sur glace, avant d'être à nouveau vortexés et soniqués 2x 15 secondes à 30% d'amplitude (Bioblock Scientific Vibra Cell 75041). Pour faciliter la lyse des cellules, les échantillons sont incubés 5min à 100°C. Enfin, après une centrifugation de 5 minutes à 13000 rpm, le surnageant contenant les protéines est récupéré. Les concentrations protéiques sont mesurées avec l'appareil de quantification Qubit (Invitrogen) et le kit Qubit Protein Assay (ThermoFisher). Les solutions stock de protéines sont conservées à -80°C.

### 6.2. Western blot

Les gels utilisés pour les Western blots sont des gels pré-coulés de poly-acrylamide à gradient (4-20%, Criterion 500 ; Bio-Rad). Les gels sont placés dans une cuve de migration (Criterion Cell ; Bio-Rad) remplie de tampon de migration 1X (TG-SDS 10X, Euromedex). Une quantité définie de protéines (5 à 100µg selon les protéines et l'anticorps primaire utilisé) de chaque échantillon est déposée dans les puits du gel puis la migration des protéines par électrophorèse est lancée à 250V pendant 30min environ, jusqu'à ce que le front de migration soit presque sorti du gel.

Les protéines du gel de poly-acrylamide sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose (Midi-Size Nitrocellulose, TransBlot Turbo ; Bio-Rad) grâce à un appareil de transfert semi-sec (TransBlot Turbo ; Bio-Rad) : la membrane de nitrocellulose, le papier

## Matériel & Méthodes

Whatman et le gel contenant les protéines sont tout d'abord imbibés de tampon de transfert 1X (Trans-Blot Turbo Buffer, Bio-Rad). Dans la cassette permettant le transfert sont déposés successivement : une couche de papier Whatman, puis la membrane de nitrocellulose, le gel et à nouveau une couche de papier Whatman également imbibée de tampon de transfert. La cassette est disposée dans l'appareil de transfert qui applique un courant du haut vers le bas de la cassette pour faire migrer les protéines du gel sur la membrane.

Un blocage des sites antigéniques aspécifiques des protéines de la membrane est réalisé en l'incubant dans du tampon de lavage (50mL de Tris pH 7,4, 30mL de NaCl 5M, 500µL de Tween 20% dans 900mL d'eau distillée) additionné de lait en poudre. Selon les anticorps utilisés, le temps d'incubation varie de 30min à 1h et la concentration de lait varie de 1 à 5%.

La membrane est ensuite incubée une nuit sous agitation à 4°C avec l'anticorps primaire (Tableau IV) dans une solution de tampon de lavage contenant 3% de lait. Le lendemain, trois lavages de la membrane sont réalisés en tampon de lavage puis, l'anticorps secondaire dilué en tampon de lavage contenant 3% de lait (Tableau IV) est déposé sur la membrane pendant 1h sous agitation à température ambiante.

Après trois lavages en tampon de lavage, les protéines immunomarquées sont révélées par une incubation de 1min avec la solution « ECL » -enhanced chemoluminescence- (Clarity Western ECL Substrate ; Bio-Rad) et visualisées par exposition des membranes dans le système d'imagerie ChemiDoc Touch (Bio-Rad). La quantification de l'expression des protéines est réalisée sur les photos des membranes prises par le ChemiDoc Touch, en mesurant la densité optique des bandes de protéines de chaque échantillon grâce au logiciel ImageLab (Bio-Rad).

**Tableau IV : Anticorps primaires et secondaires utilisés pour les western blots**

	Anticorps	Espèce	Dilution	Référence
Primaires	Fos	Lapin	1/2000	226003/3 Synaptic System
	Egr1	Lapin	1/500	sc-110, Santa-Cruz Biotechnology
	EM48	Souris	1/500	MAB5374, Merck Millipore
Secondaires	Anti-Souris + Peroxydase	Chèvre	1/2000	115035003, Jackson Laboratories
	Anti-Lapin + Peroxydase	Chèvre	1/500	111035003, Jackson Laboratories

## 7. ANALYSES MOLECULAIRES DE L'EXPRESSION GENIQUE

Dans le but de comparer l'expression des gènes entre différentes conditions, une analyse transcriptomique a été effectuée à partir des ARNs totaux des tissus des groupes expérimentaux. Nous avons réalisé un premier séquençage des ARNs (RNA-seq) extraits du striatum et de l'hippocampe des souris WT et R6/1, en condition basale et après 2 et 5 jours d'entraînement dans le labyrinthe en double-H (Tableau V A). L'effet du génotype et du processus de mémorisation ont été analysés par les comparaisons présentées dans le Tableau V C. Nous avons réalisé un autre séquençage avec les ARNs du striatum des souris WT et R6/1 traitées avec CSP-TTK21, CSP ou la solution saline (Tableau V B). L'effet du traitement a été évalué avec les comparaisons présentées dans le Tableau V D.

**Tableau V : Informations sur le séquençage des ARNs.**

<b>A</b>			<b>B</b>	
Groupes	Effectifs		Groupes	Effectifs
	Striatum	Hippocampe		
WT HC	3 ♂	3 ♂	WT HC	3 ♂ + 4 ♀
R6/1 HC	3 ♂	3 ♂	R6/1 HC	4 ♀
WT 2J	3 ♂	/	WT Saline	3 ♂ + 5 ♀
R6/1 2J	3 ♂	/	R6/1 CSP	3 ♂ + 6 ♀
WT 5J	3 ♂	3 ♂	R6/1 CSP-TTK21	3 ♂ + 5 ♀
R6/1 5J	3 ♂	3 ♂		

<b>C</b>			<b>D</b>	
Comparaisons			Comparaisons	
Effet du processus de mémorisation		Effet du génotype	Effet direct traitement	Effet du traitement sur la différence de génotype
WT 2J vs WT HC	R6/1 2J vs R6/1 HC	R6/1 HC vs WT HC	R6/1 CSP-TTK21 vs R6/1 CSP	R6/1 HC vs WT HC
WT 5J vs WT HC	R6/1 5J vs R6/1 HC	R6/1 2J vs WT 2J		R6/1 CSP vs WT Saline
WT 5J vs WT 2J	R6/1 5J vs R6/1 2J	R6/1 5J vs WT 5J		R6/1 CSP-TTK21 vs WT Saline

Groupes expérimentaux des échantillons séquencés (**A, B**) et comparaisons réalisées lors de l'analyse d'expression différentielle (**C, D**).

### 7.1. Extraction des ARNs totaux

L'ensemble du protocole a été réalisé à température ambiante. Les échantillons ont été dissociés à la pipette dans 350µL de tampon de lyse (kit RNeasy Plus Mini, Qiagen) contenant du β-mercaptoéthanol, jusqu'à ne plus observer de fragments de tissu. Les colonnes gDNA eliminator du kit QIAshredder (Qiagen) ont été utilisées pour retirer l'ADN génomique. Les ARNs ont ensuite été traités avec les colonnes kit RNeasy Plus Mini (Qiagen) selon le protocole fourni par le kit. L'élution finale a été réalisée avec 30µL d'eau sans RNases

fournie par le kit. Les concentrations en ARNs ont été mesurées à l'aide de l'appareil de quantification Qubit (Invitrogen) et du kit RNA BR Assay (ThermoFisher). Les échantillons ont été stockés à -80°C.

### 7.2. Séquençage des ARNs et analyse des résultats

La qualité des ARNs a été évaluée grâce à leur RIN (*RNA Integrity Number*), qui reflète la dégradation de l'ARN et la présence de contaminations. Les ARNs de bonne qualité ont un RIN supérieur à 8. Le RIN des ARNs a été mesuré à la plateforme de séquençage de l'IGBMC (Strasbourg) et les valeurs obtenues étaient comprises entre 8 et 10 pour tous les échantillons.

Les ARNs ont été séquencés à la plateforme de séquençage de l'IGBMC avec la technologie Illumina Hiseq 4000. Au cours de la préparation des bibliothèques pour le séquençage, les ARNs sont fragmentés et rétro-transcrits en ADNc. La bibliothèque est de type « stranded mRNA-seq/ standard quantity » et le séquençage « Hiseq 4000 1x50 bases ». Les séquences d'ADNc lues lors du séquençage sont par la suite appelées « reads » lors de l'analyse bioinformatique.

Les analyses bio-informatiques ont été réalisées par le Dr. Jonathan SEGUIN (LNCA, Strasbourg) et par la plateforme de séquençage de l'IGBMC (Strasbourg), pour obtenir le nombre de gènes différentiellement exprimés dans les différentes comparaisons (Tableau V). J'ai participé aux analyses fonctionnelles d'enrichissement.

Après avoir contrôlé la qualité du séquençage, les reads ont été alignés par le logiciel Tophat2 (Kim et al., 2013) sur la version GRCm38 (mm10) du génome de la souris, fourni par le Genome Reference Consortium (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/grc>). Les reads alignés par échantillon ont ensuite été comptés grâce à Htseq (Anders et al., 2015) afin de comparer l'expression de gènes dans les différentes conditions expérimentales. Les gènes différentiellement exprimés sont obtenus en utilisant le package R DeSeq2 (Love et al., 2014) et sélectionnés selon une p-valeur ajustée (basée sur le test de Benjamini-Hochberg) inférieure à 5% ou 10% selon les comparaisons. Les analyses fonctionnelles ont été réalisées avec la bibliothèque R ClusterProfiler (Yu et al., 2012) et avec DAVID (Huang et al., 2009a, 2009b), à partir des listes de gènes sur- et sous-exprimés dans les différentes conditions expérimentales. Les termes des bases de

données Gene Ontology (GO) (Ashburner et al., 2000, 2019) et KEGG (Kanehisa and Goto, 2000; Kanehisa et al., 2019) ont été utilisés.

## **8. ANALYSES EPIGENETIQUES**

Nous avons évalué l'épigénome striatal des souris par une approche de CHIP-sequencing (ChIP-seq) pour la marque H3K27ac. Pour cela, les fragments de chromatine présentant la marque H3K27ac ont été sélectionnés avec un anticorps par immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) et ont été séquencés. Ces expériences ont été réalisées par le Dr. Rafael ALCALA VIDA, post-doctorant dans notre équipe.

### **8.1. Préparation des tissus pour le ChIP**

Brièvement, pour chaque ChIP, les striata provenant de 4 animaux par groupe ont été utilisés. Les tissus ont été regroupés et coupés en petits fragments, puis fixés 15 minutes dans du formaldéhyde 1%, à température ambiante (réticulation – « cross-linking »). La réticulation est arrêtée en ajoutant de la glycine à une concentration finale de 0,125 M. Les fragments de tissus sont lavés avec du PBS froid, additionné d'inhibiteurs de protéases. Les expériences de ChIP ont été répliquées.

### **8.2. Protocole de ChIP**

Les expériences de ChIP-seq ont été réalisées comme décrits précédemment dans la littérature (Achour et al., 2015). Les tissus fragmentés sont homogénéisés dans un tampon de sonication. Les lysats sont ensuite soniqués pour obtenir des fragments de taille inférieurs à 500 pb, puis centrifugés. La fraction soluble de chromatine est pré-traitée avec des billes d'agarose associées à des protéines A (protein A Agarose/Salmon Sperm DNA, Millipore), 45 minutes à 4°C. Par la suite, les échantillons sont incubés avec un anticorps anti-H3K27ac (Abcam, ab4729), une nuit à 4°C. Les billes d'agarose associées à des protéines A (Protein A Agarose/Salmon Sperm DNA, Millipore) sont ensuite ajoutées et les échantillons sont incubés 3h à 4°C. Ceux-ci sont ensuite lavées, les complexes protéine-ADN sont détachés des billes d'agarose et élués. L'ADN est purifié à l'aide du kit MiniElute PCR Purification (Qiagen), puis

séquencé. La préparation des librairies et le séquençage de l'ADN purifié ont été réalisés à la plateforme de séquençage de l'IGBMC (Strasbourg), avec la technologie Illumina HiSeq 4000.

### **8.3. Analyse des données CHIP-seq**

Les reads ont été alignés sur la version GRCh38 (mm10) du génome de la souris à l'aide de Bowtie 1.0.0. aligner (Langmead et al., 2009). La détection des "pics" de H3K27ac et l'analyse différentielle d'enrichissement de H3K27ac ont été réalisées à l'aide de SICER v1.1 et du programme GREAT. Les pics de H3K27ac ont été annotés avec le programme AnnotatePeaks fourni par le logiciel HOMER (v4.9.1) (Heinz et al., 2010). Les comparaisons globales des échantillons et leurs métaprofiles ont été générés avec seqMINER v1.2.1 (Ye et al., 2011, 2014).

## **9. ANALYSES STATISTIQUES**

Toutes les données ont été exprimées sous forme de moyenne, plus ou moins l'erreur standard de la moyenne (SEM). Un test t de Student a été réalisé pour des comparaisons par paires entre les groupes. Pour les comparaisons de plus de 2 groupes, une ANOVA a été réalisée : une ANOVA à deux facteurs avec mesures répétées pour les analyses comportementales (génotype x jour) et une ANOVA à un facteur pour toutes les autres analyses (génotype). Si nécessaire, des tests de comparaisons multiples ont été effectués (test de Tukey ou le test de Sidak).

Lorsque les critères de normalité et/ou d'homogénéité de variance n'étaient pas remplis, des tests non paramétriques étaient utilisés : le test du Chi-deux et le test binomial pour la comparaison de deux distributions ; les tests de Mann-Whitney et Kruskal-Wallis pour la comparaison de 2 groupes et plus, respectivement. Les comparaisons multiples ont été effectuées à l'aide du test de Dunn.

# RESULTATS







## **1. CORRELATION ENTRE LES ALTERATIONS COMPORTEMENTALES ET MOLECULAIRES CHEZ LES SOURIS R6/1**

### **1.1. Les altérations comportementales des souris R6/1**

Les déficits cognitifs, particulièrement ceux dépendants du striatum, ont été moins bien caractérisés que les troubles moteurs dans le cadre de la MH. Ils présentent une grande variété inter-individuelle et les fonctions cognitives impliquant le striatum ont été sous-évalués en raison de la difficulté à trouver une tâche comportementale robuste pour leur étude. De plus, les travaux concernant les fonctions cognitives dépendantes du striatum chez les patients et les modèles murins de la MH fournissent des résultats hétérogènes.

Plusieurs études ont montré que les processus d'apprentissage et de mémorisation impliquent de nombreux changements transcriptionnels et épigénétiques (cf partie **2.3 Protéotoxicité nucléaire de la huntingtine mutée**, p.46). Ces études, basées sur des tests comportementaux engageant l'hippocampe et/ou le cortex préfrontal, indiquent la mise en place de signatures épigénétiques et transcriptionnelles très précises dans l'hippocampe, lors du processus de mémorisation (Jaeger et al., 2018; Yap and Greenberg, 2018; Campbell and Wood, 2019; Fernandez-Albert et al., 2019). En revanche, aucune étude comparable visant à caractériser ces signatures dans le striatum n'avait été réalisée quand j'ai commencé ma thèse. C'est pourquoi, afin d'étudier le rôle des régulations transcriptionnelles et épigénétiques dans la mise en place des troubles comportementaux de la MH, nous avons choisi d'utiliser une tâche permettant d'évaluer une mémoire dépendante du striatum. Pour cela, nous avons utilisé le test du labyrinthe en double-H (Pol-Bodetto et al., 2011; Cassel et al., 2012) qui a été développé au laboratoire pour le Rat, mais qui n'avait pas été testé chez la Souris. Ainsi, les premiers travaux que j'ai réalisés ont visé à évaluer la mémoire procédurale des souris R6/1 à l'aide du labyrinthe en double-H.

### 1.1.1. Caractérisation du phénotype cognitif des souris dans le labyrinthe en double-H

Le test du labyrinthe aquatique en double-H a été utilisé afin d'évaluer la capacité des souris R6/1 à mobiliser une mémoire procédurale dépendante du striatum, lors d'une tâche de navigation orientée vers un but (Pol-Bodetto et al., 2011; Cassel et al., 2012).

Nous avons adapté à la Souris ce test de navigation, développé pour le Rat, en réduisant les dimensions du dispositif initial (cf partie **3.1.1 Le labyrinthe en double-H**, p.86). Comme le test de la piscine de Morris, le labyrinthe en double-H comprend trois phases : une phase d'habituation, une phase d'apprentissage (ou acquisition) et une phase de rappel.

Au cours de la phase d'acquisition, que nous avons réalisée sur 4 jours, les animaux ont été entraînés à retrouver une plateforme immergée dans de l'eau opacifiée dans l'un des bras du dispositif constitué de 6 branches parallèles (NO, SO, N, S, NE, SE ; **3.1.1 Le labyrinthe en double-H**, p.86). Pour retrouver la plateforme, les souris peuvent, soit solliciter une stratégie de navigation procédurale qui consiste à apprendre la séquence de mouvements permettant de rejoindre la plateforme, soit solliciter une stratégie de navigation spatiale basée sur l'utilisation des indices visuels de la pièce. Pour favoriser l'apprentissage procédural, le point de lâcher des souris (bras S) et la position de la plateforme (bras NE) (Figure 40A) étaient constants au cours de la tâche. Lors du test de rappel, 24h après la dernière acquisition, nous avons évalué la stratégie d'apprentissage effectivement utilisée par les souris en retirant la plateforme du dispositif et en translatant le point de lâcher dans le bras SO (Figure 40G). Ainsi, une souris mobilisant une stratégie procédurale tourne à droite puis à gauche pour rejoindre la plateforme et atteindre le bras N (aussi appelé bras procédural), alors qu'une souris mobilisant une stratégie spatiale atteint le bras NE (aussi appelé bras spatial) (Figure 40G).

#### 1.1.1.a. Caractérisation du comportement des souris WT dans le labyrinthe en double-H

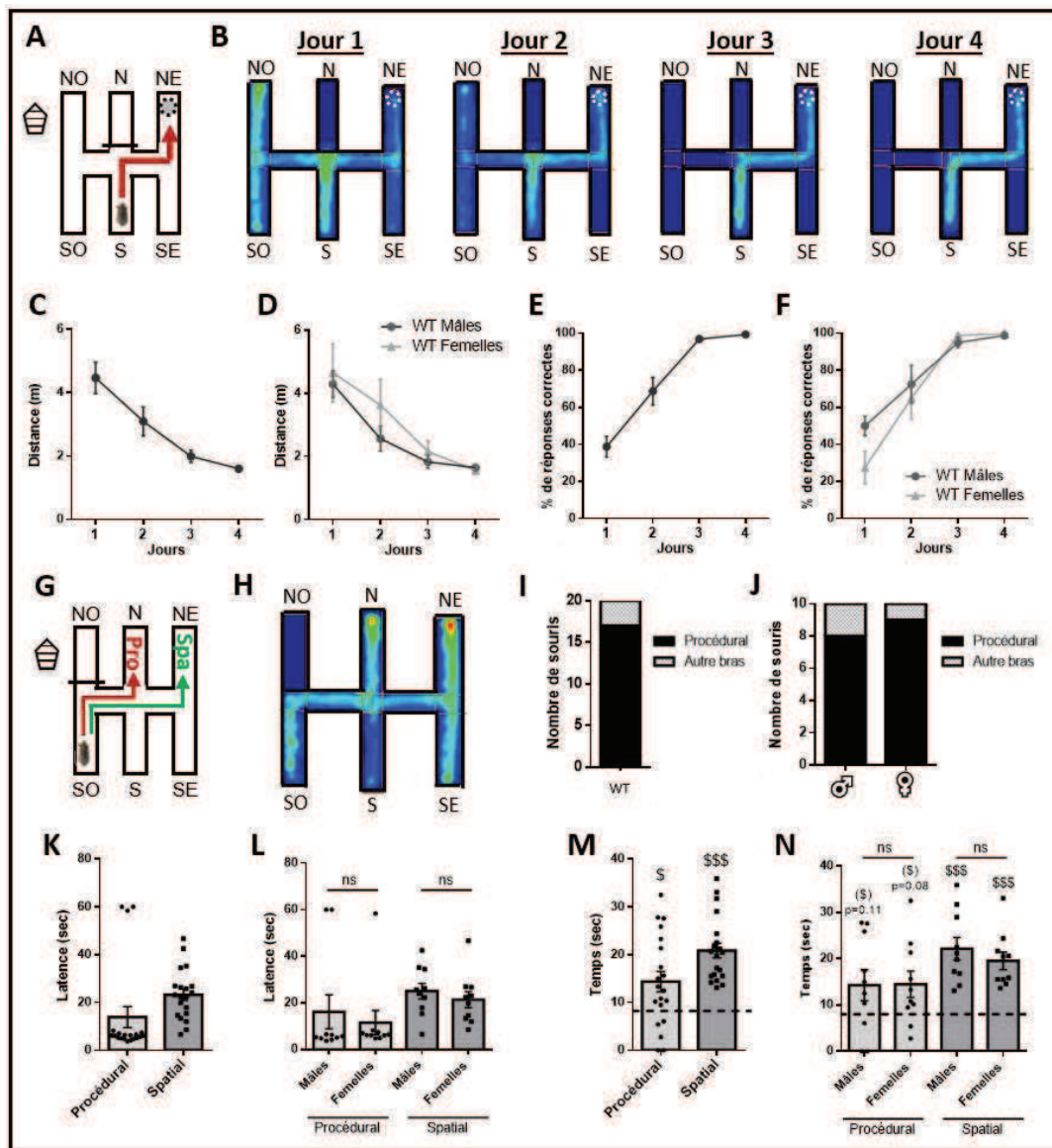
Dans un premier temps, nous avons analysé les performances de souris WT, afin de vérifier que lors du test de rappel, elles mobilisaient en priorité une stratégie procédurale pour rechercher la plateforme cachée présente durant les acquisitions. La distance parcourue par les souris WT pour rejoindre la plateforme diminue progressivement au cours de la phase d'acquisition (Figure 40C) (*Test de Kruskal-Wallis : effet jours  $p < 0,0001$* ) démontrant un

## Résultats

apprentissage de la position de la plateforme, avec des performances similaires entre les souris mâles et femelles (Figure 40D) (*ANOVA à deux facteurs à mesures répétées : effet sexe  $p=0,46$* ). De même, leur pourcentage de réponses correctes augmente au fil des jours (Figure 40E) (*Test de Kruskal-Wallis : effet jours  $p<0,0001$* ), de façon comparable entre les souris mâles et femelles (Figure 40F) (*ANOVA à deux facteurs à mesures répétées : effet sexe  $p=0,29$* ). Les souris WT, faisant moins d'erreurs, vont plus directement à la plateforme au cours des 4 jours d'acquisition (Figure 40B).

Lors du test de rappel (Figure 40G), nous avons analysé le trajet des souris dans le labyrinthe en double-H (Figure 40H) : 85% des souris (17/20 WT, 8/10 mâles et 9/10 femelles) visitent en première intention le bras procédural (Figure 40 I,J). En effet, l'analyse de la latence d'accès au bras procédural montre que la majorité des souris WT l'atteint rapidement (Latence < 10 secondes) tandis que d'autres n'y entrent pas (Latence de 60 secondes) (Figure 40K). Les souris entrées dans le bras procédural y passent un temps significativement supérieur au hasard (Figure 40M), démontrant leur insistance à rechercher la plateforme dans ce bras et l'utilisation d'une stratégie procédurale pour la retrouver. Dans un second temps, les souris WT visitent majoritairement le bras spatial. Elles y entrent avec une latence d'accès relativement courte (Latence d'environ 20 secondes) (Figure 40K) et y passent un temps significativement supérieur au hasard (Figure 40M). Les latences d'accès ainsi que les temps passés dans les bras cibles ne diffèrent pas statistiquement entre les mâles et les femelles (Figure 40L-N). Ces résultats indiquent qu'après avoir visité le bras procédural, les souris WT changent de stratégie et rejoignent le bras spatial (Figure 40H) où la plateforme était présente lors de l'entraînement, faisant ainsi preuve de flexibilité cognitive.

Ainsi, dans le labyrinthe en double-H, les souris WT utilisent en première intention une stratégie procédurale pour naviguer, mais elles sont capables d'adapter leur stratégie au changement de situation en faveur d'une stratégie spatiale. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus chez le Rat (Pol-Bodetto et al., 2011; Cassel et al., 2012) et nous permettent de valider la tâche chez la Souris.



**Figure 40 : Evaluation des performances des souris WT dans le labyrinthe en double-H.**

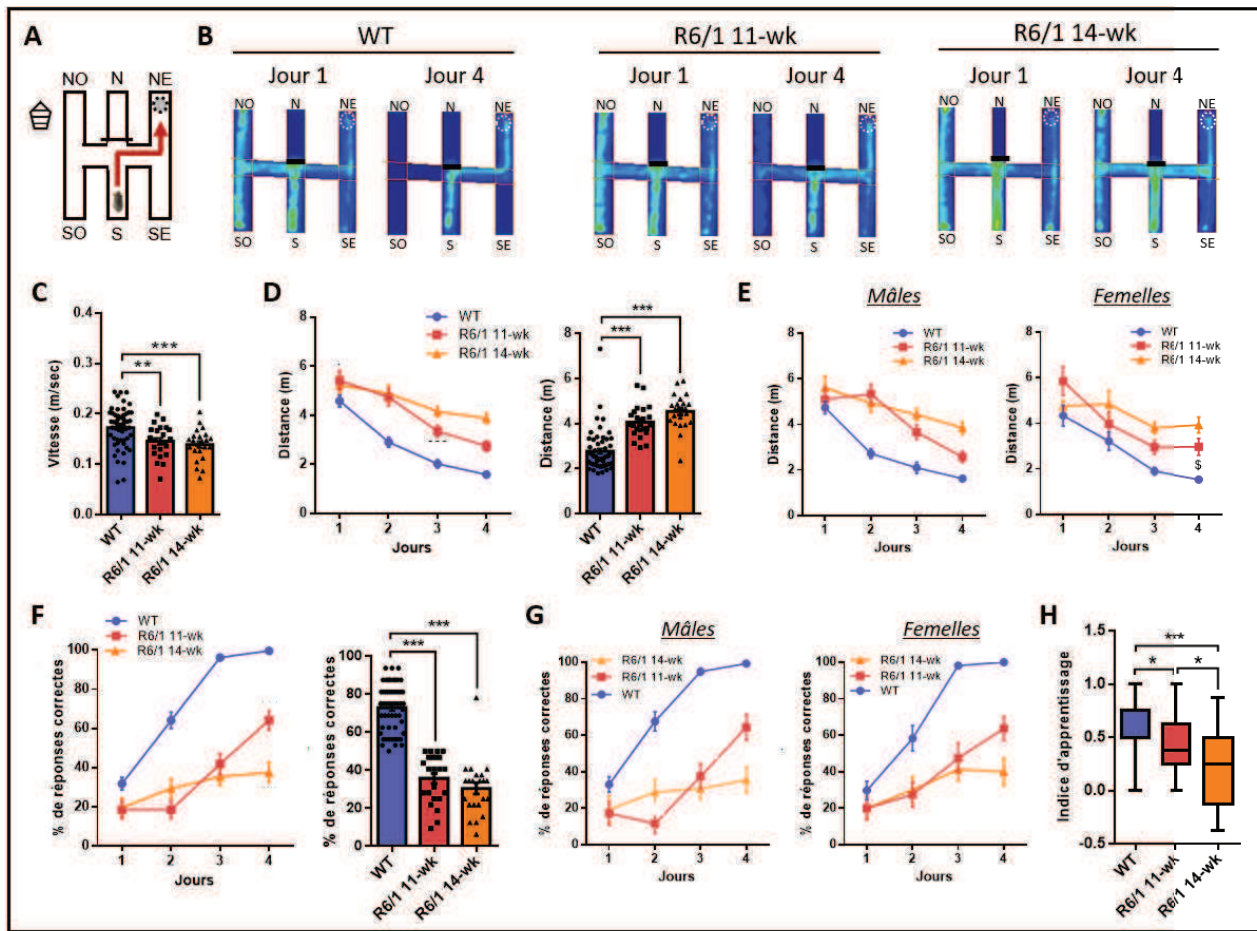
(A) Protocole d'entraînement des souris dans le labyrinthe en double-H : les souris sont entraînées à retrouver une plateforme cachée, immergée dans le bras NE, à partir du bras S. (B) Cartes de densités illustrant le temps passé par les souris dans les différentes zones du dispositif au cours des 4 jours d'acquisition. (C-D) Distance parcourue par les souris WT pour retrouver la plateforme au cours des 4 jours d'acquisition (C) (*Test de Kruskal-Wallis :  $k=40,14, p<0,0001$* ) et par les souris mâles et femelles individuellement (D) (*Test de Kruskal-Wallis : Mâles,  $k=22,29 p<0,0001$  ; Femelles  $k=20,78 p=0,0001$* ). (E-F) Pourcentage de réponses correctes des souris WT au cours des 4 jours d'acquisition (E) (*Test de Kruskal-Wallis,  $k=48,97, p<0,0001$* ) et des souris mâles et femelles individuellement (F) (*Test de Kruskal-Wallis : Mâles,  $k=21,39 p<0,0001$  ; Femelles  $k=27,32 p<0,0001$* ). (G) Protocole du test de rappel dans le labyrinthe en double-H : la plateforme est retirée et les souris sont lâchées dans le bras SO. Les bras cibles, N et NE, sont désignés comme bras Procédural (Pro) et Spatial (Spa) respectivement. (H) Carte de densités illustrant le temps passé par les souris dans les zones du dispositif lors du test de rappel. (I-J) Nombre total de souris WT visitant le bras procédural en première intention lors du test de rappel (I), et de souris mâles et femelles individuellement (J). (K-L) Latence d'accès aux bras cibles lors du test de rappel pour les souris WT (K) et pour les souris mâles et femelles individuellement (L). (M-N) Temps passé par les souris WT dans les bras cibles lors du test de rappel (M) et par les souris mâles et femelles individuellement (N). Le temps passé dans les bras procédural et spatial a été comparé au hasard (8,5 secondes) (*Test de Wilcoxon : Temps procédural vs hasard, WT  $p=0,02$ , Mâles  $p=0,11$ , Femelles  $p=0,08$  ; Temps spatial vs hasard, WT  $p<0,0001$ , Mâles  $p=0,002$ , Femelles  $p=0,002$* ). Les données sont représentées par la moyenne  $\pm$  SEM. Effectifs :  $n=20$  WT (10♂, 10♀). Les performances des mâles et des femelles ne diffèrent pas statistiquement à l'acquisition (*ANOVA à 2 facteurs à mesures répétées : Distance, effet sexe  $F(1, 18)=0,56 p=0,46$  ; Réponses correctes, effet sexe  $F(1, 18)=1,18 p=0,29$* ) ni au rappel (*Test de Mann-Whitney, mâles vs femelles : Latence bras procédural,  $U=37 p=0,34$  ; Latence bras spatial,  $U=39 p=0,42$  ; Temps bras procédural,  $U=49 p=0,95$  ; Temps bras spatial,  $U=41 p=0,51$* ). Statistiques : \$  $p<0,05$  et \$\$\$  $p<0,005$  WT vs hasard.

### 1.1.1.b. Altération précoce de la mémoire procédurale des souris R6/1

Afin d'identifier l'âge de début des premiers symptômes cognitifs dans la MH et de le comparer avec l'âge d'apparition des premières altérations moléculaires dans le striatum, nous avons choisi de tester la mémoire procédurale des souris R6/1 aux âges de 11 et 14 semaines, un stade symptomatique précoce où les souris ne présentent pas encore de déficits moteurs majeurs (Hansson et al., 2001; Brooks et al., 2012).

Les souris WT et R6/1 âgées de 11 et 14 semaines ont été entraînées pendant 4 jours à retrouver la plateforme positionnée dans le bras NE à partir du bras S (Figure 41A). L'analyse de la distance parcourue par les souris (Figure 41C) et du pourcentage de réponses correctes (Figure 41E) met en évidence que les performances d'apprentissage des souris R6/1 sont significativement diminuées par rapport aux souris WT dès l'âge de 11 semaines (Figure 41B) (*ANOVA à deux facteurs à mesures répétées : Distance, effet génotype  $p < 0,0001$ , interaction jours x génotype  $p = 0,0019$  ; Réponses correctes, effet génotype et interaction jours x génotype  $p < 0,0001$* ). Les performances des souris mâles et femelles ne diffèrent pas statistiquement lors de la phase d'acquisition (Figure 41E,G) (*ANOVA à deux facteurs à mesures répétées, effet sexe : Distance, WT  $p = 0,85$ , R6/1 11-wk  $p = 0,45$ , R6/1 14-wk  $p = 0,25$  ; Réponses correctes, WT  $p = 0,53$ , R6/1 11-wk  $p = 0,20$ , R6/1 14-wk  $p = 0,49$* ).

De plus, l'altération des performances d'apprentissage chez les souris R6/1 semble progressive, celle-ci étant plus marquée à 14 semaines qu'à 11 semaines (Figure 41B, D, F) (*ANOVA à deux facteurs et à mesures répétées : Distance, effet âge  $p = 0,034$* ). Pour analyser la progression du déficit, nous avons également calculé un indice d'apprentissage qui consiste à soustraire le pourcentage de réponses correctes des souris du jour 4 à celui du jour 1. L'indice d'apprentissage est significativement diminué chez les souris R6/1 à 11 et 14 semaines par rapport aux souris WT, mais également chez les souris R6/1 de 14 semaines par rapport aux R6/1 de 11 semaines (Figure 41H) (*Test de Kruskal-Wallis : R6/1 11-wk vs WT  $p = 0,01$  ; R6/1 14-wk vs WT  $p < 0,0001$  ; R6/1 14-wk vs R6/1 11-wk  $p = 0,04$* ). Cette observation suggère une progression du déficit des souris R6/1 observé pendant la phase d'acquisition.



**Figure 41** : Evaluation des performances d'apprentissage des souris WT et R6/1 à 11 et 14 semaines dans le labyrinthe en double-H.

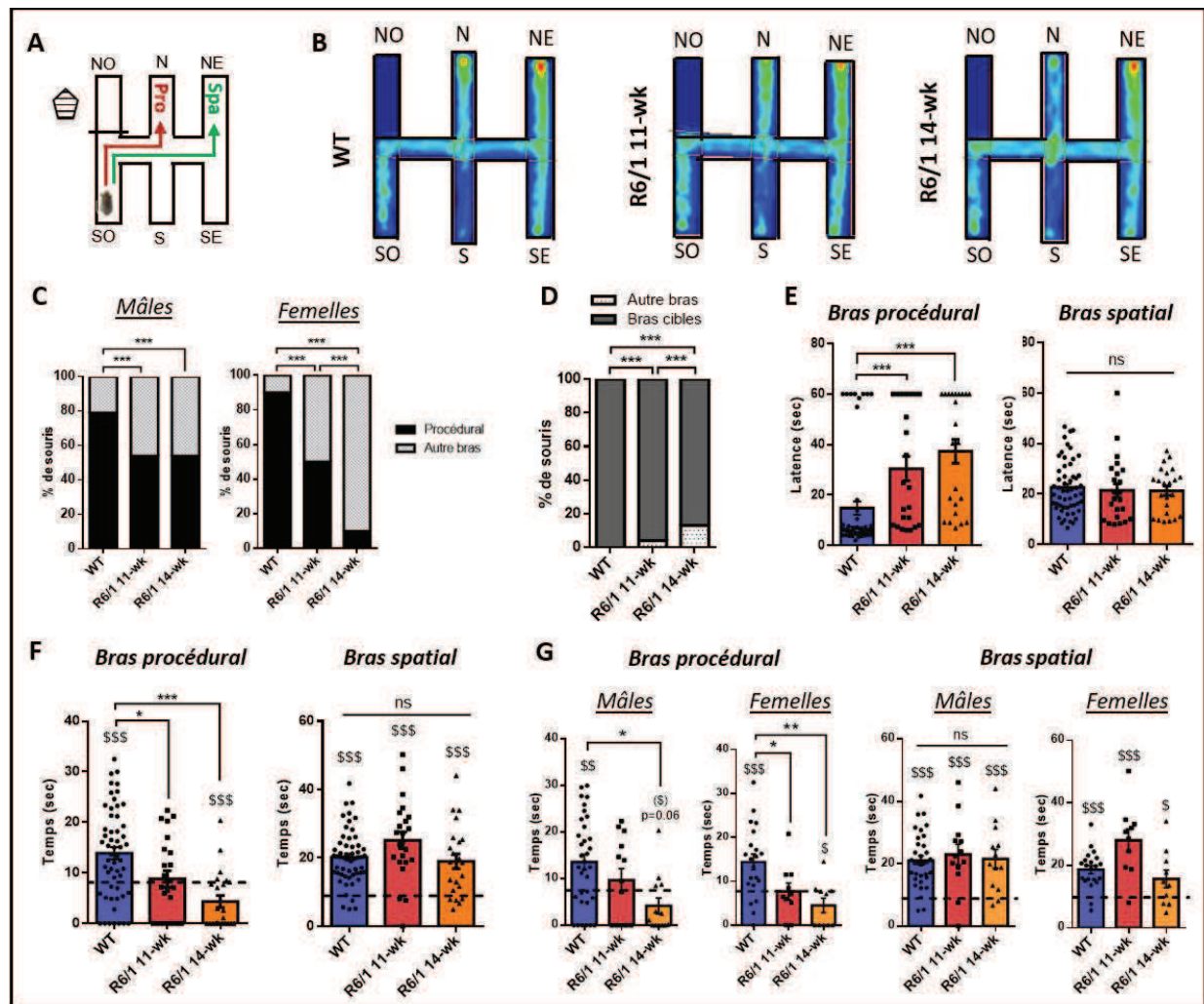
(A) Protocole d'entraînement des souris dans le labyrinthe en double-H : les souris sont entraînées à retrouver une plateforme cachée, immergée dans le bras NE, à partir du bras S. (B) Cartes de densités illustrant le temps passé par les souris WT, R6/1 11-wk et 14-wk dans les différentes zones du dispositif lors de la première acquisition et de la dernière. (C) Vitesse de nage moyenne des souris dans le labyrinthe en double-H (ANOVA à un facteur,  $F(2, 98)=9,01$   $p=0,0003$ ). (D) Distance totale parcourue par les souris pour rejoindre la plateforme au cours de l'apprentissage -à gauche- (ANOVA à 2 facteurs à mesures répétées : effet jours  $F(3, 294)= 60,85$   $p<0,0001$  ; effet génotype  $F(2, 98)= 44,14$   $p<0,0001$  ; interaction jours x génotype  $F(6, 294)= 3,598$   $p=0,0019$ ). Moyenne de la distance parcourue sur les 4 jours d'entraînement -à droite- (Test de Kruskal-Wallis,  $k=54,07$   $p<0,0001$ ). (E) Distance totale parcourue par les souris mâles et femelles individuellement au cours de l'entraînement (ANOVA à 2 facteurs à mesures répétées : Mâles, effet jours  $F(3, 171)=37,13$   $p<0,0001$ , effet génotype  $F(2, 57)=35,02$   $p<0,0001$ , interaction jours x génotype  $F(6, 171)=3,828$   $p=0,001$  ; Femelles, effet jours  $F(3, 114)=26,25$   $p<0,0001$ , effet génotype  $F(2, 38)=11,83$   $p<0,0001$ , interaction jours x génotype  $F(6, 114)=2,262$   $p=0,04$ ). (F) Pourcentage de réponses correctes des souris au cours de l'apprentissage -à gauche- (ANOVA à deux facteurs à mesures répétées : effet jours  $F(3, 294)= 85,35$   $p<0,0001$  ; effet génotype  $F(2, 98)= 119,3$   $p<0,0001$  ; interaction jours x génotype  $F(6, 294)=15,68$   $p<0,0001$ ). Moyenne du pourcentage de réponses correctes sur les 4 jours d'entraînement -à droite- (Test de Kruskal-Wallis :  $k=71,13$   $p<0,0001$ ). (G) Pourcentage de réponses correctes des souris mâles et femelles individuellement au cours de l'entraînement (ANOVA à 2 facteurs à mesures répétées : Mâles, effet jours  $F(3, 171)=45,94$   $p<0,0001$ , effet génotype  $F(2, 57)=71,79$   $p<0,0001$ , interaction jours x génotype  $F(6, 171)=10,37$   $p<0,0001$  ; Femelles, effet jours  $F(3, 114)=39,41$   $p<0,0001$ , effet génotype  $F(2, 38)=48,31$   $p<0,0001$ , interaction jours x génotype  $F(6, 114)=5,96$   $p<0,0001$ ). (H) Indice d'apprentissage (Pourcentage de réponses correctes du jour 4 soustrait à celui du jour 1) des souris WT et R6/1 à 11 et 14 semaines (Test de Kruskal-Wallis :  $K=33,6$   $p<0,0001$ ). Les données sont représentées par la moyenne  $\pm$  SEM. Effectifs :  $n= 55$  WT (31♂, 21♀),  $n=23$  R6/1 11-wk (13♂, 10♀),  $n=23$  R6/1 14-wk (13♂, 10♀). Les performances des mâles et des femelles ne diffèrent pas statistiquement (ANOVA à 2 facteurs à mesures répétées : Distance, effet sexe, WT  $F(1, 53)=0,031$   $p=0,85$ , R6/1 11-wk  $F(1, 21)=0,56$   $p=0,45$ , R6/1 14-wk  $F(1, 21)=1,35$   $p=0,25$  ; Réponses correctes, effet sexe, WT  $F(1, 53)=0,38$   $p=0,53$ , R6/1 11-wk  $F(1, 21)=1,74$   $p=0,20$ , R6/1 14-wk  $F(1, 21)=0,47$   $p=0,49$ ). Statistiques : \*  $p<0,05$ , \*\*  $p<0,01$  et \*\*\*  $p<0,005$  entre les groupes.

## Résultats

Lors du test de rappel ([Figure 42A](#)), le comportement des souris R6/1 âgées de 11 et 14 semaines diffère de celui des souris WT ([Figure 42B](#)). Significativement moins de souris R6/1 visitent le bras procédural par rapport aux souris WT ([Figure 42C](#)) : chez les souris R6/1 11-wk, 54% et 50% des souris mâles et femelles respectivement (7/13 Mâles ; 5/10 Femelles) visitent le bras procédural en première intention ; chez les souris R6/1 14-wk, ce pourcentage est de 54% pour les souris mâles et 10% pour les souris femelles (7/13 Mâles ; 1/9 Femelles) ([Figure 42C](#)). De même, les souris R6/1 mettent significativement plus de temps que les souris WT à entrer dans le bras procédural ([Figure 42E](#)) et y passent un temps non différent du hasard à 11 semaines et inférieur au hasard à 14 semaines ([Figure 42F,G](#)). Ces résultats indiquent que, contrairement aux souris WT, les souris R6/1 n'utilisent pas majoritairement une stratégie procédurale pour trouver la plateforme dans le labyrinthe en double-H. En revanche, les souris R6/1 à 11 et 14 semaines passent un temps significativement supérieur au hasard et non différent de celui des souris WT dans le bras spatial ([Figure 42F,G](#)), indiquant l'utilisation préférentielle d'une stratégie spatiale. D'autre part, une proportion croissante de souris R6/1 ne visitent aucun des bras cibles en première intention : 4% des souris R6/1 à 11 semaines et 13% des souris R6/1 à 14 semaines (1/23 R6/1 11-wk ; 3/23 R6/1 14-wk) ([Figure 42D](#)). Ces souris ne semblent mobiliser aucune stratégie de recherche, reflétant un déficit d'apprentissage croissant dès l'âge de 11 semaines.

En résumé, contrairement aux souris WT qui utilisent majoritairement une stratégie procédurale pour naviguer dans le double-H, les souris R6/1 mobilisent préférentiellement une stratégie spatiale dépendante de l'hippocampe. Ces résultats suggèrent une altération précoce de la mémoire procédurale des souris R6/1 dès 11 semaines, tandis que leur mémoire spatiale, qui semble préservée à cet âge, pourrait compenser le déficit de mémoire procédurale.





**Figure 42** : Evaluation de la stratégie d'apprentissage utilisée par les souris WT et R6/1 à 11 et 14 semaines dans le labyrinthe en double-H.

(A) Lors du test de rappel, la plateforme est retirée et les souris sont lâchées dans le bras SO. Les bras cibles N et NE sont désignés comme bras Procédural (Pro) et Spatial (Spa) respectivement. (B) Cartes de densités illustrant le temps passé par les souris WT, R6/1 11-wk et 14-wk dans les différentes zones du dispositif lors du test de rappel. (C) Pourcentage de souris mâles et femelles visitant le bras procédural en première intention lors du test de rappel (*Test binomial, bras procédural vs autres bras* : Mâles, WT vs R6/1 11-wk  $p < 0,0001$ , WT vs R6/1 14-wk  $p < 0,0001$ , R6/1 11-wk vs R6/1 14-wk  $p > 0,99$ ; Femelles, WT vs R6/1 11-wk  $p < 0,0001$ , WT vs R6/1 14-wk  $p < 0,0001$ , R6/1 11-wk vs R6/1 14-wk  $p < 0,0001$ ). Le nombre de souris visitant le bras procédural diffère entre les mâles et les femelles (*Test binomial, bras procédural vs autres bras* : WT  $p = 0,06$ , R6/1 11-wk  $p = 0,42$ , R6/1 14-wk  $p < 0,0001$ ). (D) Pourcentage de souris n'ayant visité aucun des bras cibles en première intention (*Test binomial, bras cibles vs autres bras* : WT vs R6/1 11-wk  $p < 0,0001$ , WT vs R6/1 14-wk  $p < 0,0001$ , R6/1 11-wk vs R6/1 14-wk  $p = 0,0002$ ). (E) Latences d'accès au bras procédural (*Test de Kruskal-Wallis* :  $k = 34,25$   $p < 0,001$ ) et spatial (*Test de Kruskal-Wallis* :  $k = 0,788$   $p = 0,67$ ). (F) Temps passé par les souris dans les bras cibles, le bras procédural (*Test de Kruskal-Wallis* :  $k = 19,26$ ,  $p < 0,0001$ ) et le bras spatial (*Test de Kruskal-Wallis* :  $k = 6,068$ ,  $p = 0,048$ ), comparé au hasard (*Test de Wilcoxon* : Procédural, WT  $p = 0,0001$ , R6/1 11-wk  $p = 0,97$ , R6/1 14-wk  $p = 0,0025$ ; Spatial, WT, R6/1 11-wk, R6/1 14-wk  $p < 0,001$ ). (G) Temps passé par les souris mâles et femelles dans le bras procédural (*Test de Kruskal-Wallis* : Mâles,  $k = 8,309$   $p = 0,015$ ; Femelles,  $k = 12,07$   $p = 0,002$ ) et spatial (*Test de Kruskal-Wallis* : Mâles,  $k = 0,639$   $p = 0,72$ ; Femelles,  $k = 8,55$   $p = 0,013$ ), comparé au hasard (*Test de Wilcoxon* : Procédural Mâles, WT  $p = 0,005$ , R6/1 11-wk  $p = 0,69$ , R6/1 14-wk  $p = 0,06$ ; Procédural Femelles, WT  $p = 0,004$ , R6/1 11-wk  $p = 0,53$ , R6/1 14-wk  $p = 0,01$ ; Spatial Mâles, WT  $p < 0,0001$ , R6/1 11-wk  $p = 0,001$ , R6/1 14-wk  $p = 0,001$ ; Spatial Femelles, WT  $p < 0,0001$ , R6/1 11-wk  $p = 0,003$ , R6/1 14-wk  $p = 0,03$ ). Les données sont représentées par la moyenne  $\pm$  SEM. Effectifs :  $n = 55$  WT (31♂, 21♀),  $n = 23$  R6/1 11-wk (13♂, 10♀),  $n = 23$  R6/1 14-wk (13♂, 10♀). Les performances des souris mâles et femelles ne diffèrent pas statistiquement pour la latence d'accès aux bras cibles (*Test de Mann-Whitney* : Procédural effet sexe, WT  $U = 314$   $p = 0,46$ , R6/1 11-wk  $U = 57$   $p = 0,63$ ; R6/1 14-wk  $U = 38$   $p = 0,09$ ; Spatial effet sexe, WT  $U = 330$   $p = 0,64$ , R6/1 11-wk  $U = 51$   $p = 0,40$ , R6/1 14-wk  $U = 58$   $p = 0,68$ ) ni pour le temps passé dans les bras cibles (*Test de Mann-Whitney* : Procédural effet sexe, WT  $U = 343$   $p = 0,81$ , R6/1 11-wk  $U = 56$   $p = 0,59$ , R6/1 14-wk  $U = 60,5$   $p = 0,78$ ; Spatial effet sexe, WT  $U = 301,5$   $p = 0,34$ , R6/1 11-wk  $U = 46$   $p = 0,25$ , R6/1 14-wk  $U = 43$   $p = 0,18$ ). Statistiques : \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  et \*\*\*  $p < 0,005$  entre les groupes ; \$\$\$  $p < 0,005$  par rapport au hasard (8.5 secondes).

### 1.1.1.c. Altération de la flexibilité cognitive

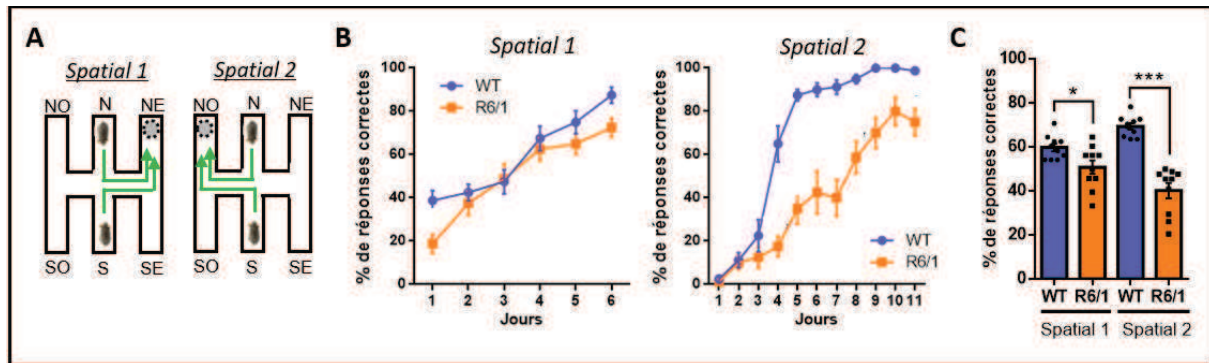
Pour approfondir les possibilités du test du labyrinthe en double-H, nous avons développé un protocole qui permet d'évaluer la flexibilité cognitive des souris. Cette fonction, altérée chez les patients et les modèles murins de la MH (cf partie [1.4.3.b Des altérations cognitives dépendantes du striatum](#), p.20), nécessite un fonctionnement optimal des connexions cortico-striatales. La flexibilité cognitive correspond à la capacité des animaux à s'adapter à un changement de règle d'apprentissage. Pour évaluer cette fonction dans le labyrinthe en double-H, nous avons réalisé une première phase d'apprentissage spatial puis, lorsque les souris avaient atteint 80% de réponses correctes, la règle d'apprentissage changeait en déplaçant la plateforme dans un autre bras. Les souris devaient tout d'abord comprendre que la position de la plateforme était différente, pour pouvoir ensuite adapter leur comportement de recherche à la nouvelle règle d'apprentissage. Lorsque la flexibilité cognitive des souris est altérée, celles-ci sont capables d'apprendre la localisation de la plateforme lors du premier protocole spatial. En revanche elles ont des difficultés à adapter leur comportement au deuxième protocole, entraînant une altération de leurs performances d'apprentissage.

Le protocole que nous avons mis au point dans le labyrinthe en double-H pour évaluer la flexibilité cognitive nécessite 18 jours d'entraînement (cf partie [3.1.1.b Evaluation de la flexibilité cognitive](#), p.89). Afin de tester les performances des souris WT et R6/1 avant l'âge de 11 semaines, âge auquel nous avons observé une altération des performances d'apprentissage des souris R6/1 dans le labyrinthe en double-H, nous avons commencé l'entraînement des souris à l'âge de 8 semaines.

Le test de la flexibilité cognitive des souris débute avec un premier protocole (Spatial 1) au cours duquel la plateforme est positionnée dans le bras NE ([Figure 43A](#)). Les souris sont aléatoirement lâchées dans le bras N ou S et doivent donc utiliser une stratégie spatiale pour retrouver la plateforme ([Figure 43A](#)). Nous avons observé que le pourcentage de réponses correctes des souris WT augmente progressivement au cours des 6 jours d'acquisition, indiquant un apprentissage de la position de la plateforme ([Figure 43B](#)) (*ANOVA à deux facteurs et à mesures répétées : effet jours  $p < 0,0001$* ). A l'âge de 8 semaines, les souris R6/1 apprennent également la position de la plateforme ([Figure 43B](#)) (*ANOVA à deux facteurs et à*

## Résultats

mesures répétées : interaction jours x génotype  $p=0,28$ ), bien que leurs performances moyennes soient significativement diminuées par rapport aux souris WT (Figure 43).



**Figure 43 : Evaluation de la flexibilité cognitive des souris WT et R6/1 dans le labyrinthe en double-H.**

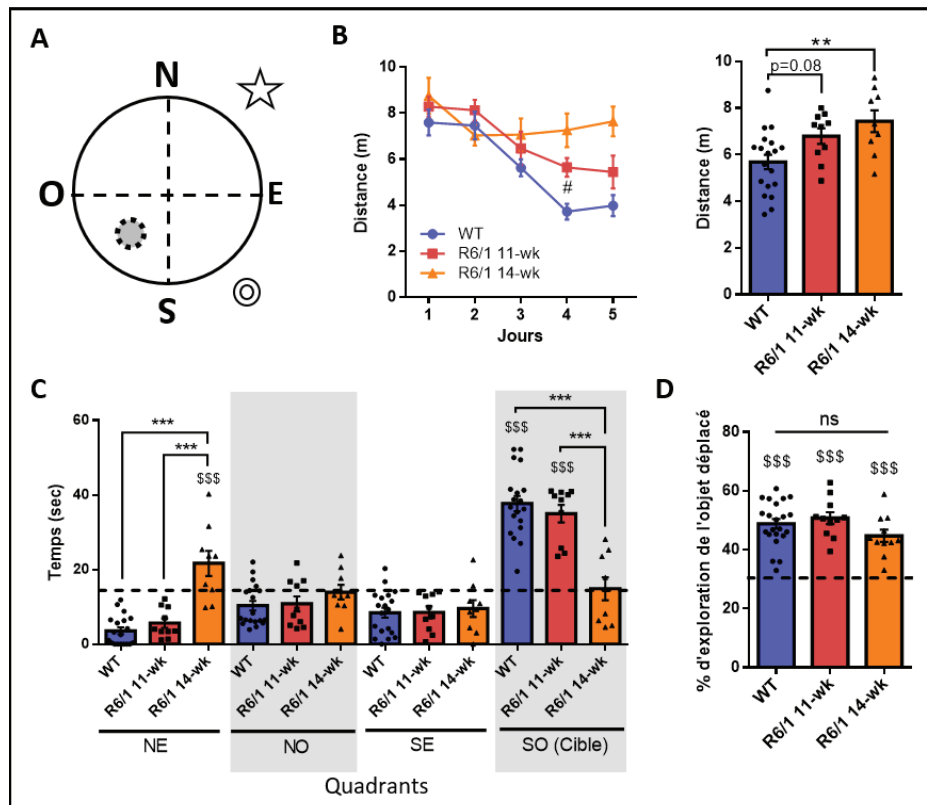
(A) Protocole d'entraînement des souris dans le double-H pour tester la flexibilité cognitive : les souris sont entraînées avec un premier protocole spatial (Spatial 1) puis, lorsqu'elles atteignent 80% de réponses correctes, la position de la plateforme est modifiée et les souris sont entraînées avec un autre protocole spatial (Spatial 2). (B) Performances des souris lors du premier apprentissage spatial -Spatial 1- (ANOVA à deux facteurs à mesures répétées : effet jour  $F(5, 90)=32,65$   $p<0,001$  ; effet génotype  $F(1, 18)=6,438$   $p=0,02$  ; interaction jours x génotype  $F(5, 90)=1,261$   $p=0,29$ ) et lors du deuxième apprentissage spatial -Spatial 2- (ANOVA à deux facteurs à mesures répétées : effet jour  $F(10, 180)=85,07$   $p<0,001$  ; effet génotype  $F(1, 18)=61,71$   $p<0,001$  ; interaction jours x génotype  $F(10, 180)=7,841$   $p<0,001$ ). (C) Moyennes des performances des souris lors des deux apprentissages spatiaux (Test de Mann-Whitney : Spatial 1,  $U=24,5$   $p=0,053$  ; Spatial 2,  $U=0$ ,  $p<0,0001$ ). Les données sont représentées par la moyenne  $\pm$  SEM. Effectifs :  $n=10$  souris  $\sigma^2$  par groupe. Statistiques : \*  $p<0,05$  et \*\*\*  $p<0,005$  entre les groupes.

Lorsque les souris WT ont atteint 80% de réponses correctes, la règle d'apprentissage est modifiée : la plateforme est déplacée dans le bras NO et les souris sont lâchées aléatoirement dans le bras N ou S (Spatial 2) (Figure 43A). Le pourcentage de réponses correctes augmente progressivement jusqu'à atteindre 100% de réussite chez les souris WT (Figure 43B), indiquant qu'elles apprennent la nouvelle position de la plateforme et font preuve de flexibilité cognitive (ANOVA à deux facteurs et à mesures répétées : effet jours  $p<0,0001$ ). En revanche, les souris R6/1, âgées de 10 semaines à ce stade du protocole, présentent un pourcentage de réponses correctes significativement diminué par rapport aux souris WT (Figure 43C). En effet, au cours du deuxième apprentissage spatial (Spatial 2), les souris R6/1 progressent, mais de manière plus lente que les souris WT et atteignent uniquement 75% de réponses correctes après 11 jours d'entraînement (Figure 43B) (ANOVA à deux facteurs et à mesures répétées : interaction jour x génotype  $p<0,0001$ ). Les résultats montrent que la flexibilité cognitive des souris R6/1 est altérée dès l'âge de 9-10 semaines, suggérant une altération précoce des fonctions cognitives dépendantes du striatum, tandis que celles dépendantes de l'hippocampe, évaluées par le premier protocole spatial (Spatial 1) semblent relativement préservées.

### 1.1.2. Evaluation des performances cognitives dépendantes de l'hippocampe

Nos résultats suggèrent que la mémoire spatiale est préservée chez les souris R6/1. Nous l'avons donc directement évaluée à l'aide de tests de référence, la piscine de Morris et la tâche de localisation d'objets, chez des souris WT et R6/1 âgées de 11 et 14 semaines.

Pour tester la mémoire spatiale en piscine de Morris, les souris ont été entraînées pendant 5 jours à retrouver une plateforme immergée dans le quadrant SO de la piscine de Morris (Figure 44A) (cf partie **3.1.2 La piscine de Morris**, p.90). La distance parcourue par les souris WT diminue au cours des jours d'entraînement, indiquant un apprentissage de la position de la plateforme (Figure 44B) (*ANOVA à deux facteurs et à mesures répétées : effet jours  $p < 0,0001$* ). Les performances moyennes des souris R6/1 à l'âge de 11 semaines ne diffèrent pas significativement de celles des souris WT, tandis que la distance parcourue par les souris R6/1 à 14 semaines est significativement augmentée (Figure 44B) (*ANOVA à deux facteurs et à mesures répétées : interaction jour x génotype  $p = 0,0012$  ; ANOVA à un facteur sur la distance moyenne : R6/1 11-wk vs WT  $p = 0,085$ , R6/1 14-wk vs WT  $p = 0,005$* ). La rétention de l'information spatiale est évaluée lors du test de rappel. Les souris WT et R6/1 âgées de 11 semaines passent significativement plus de temps que le hasard dans le quadrant SO, où était positionnée la plateforme lors de l'entraînement (Figure 44C). Les souris R6/1 âgées de 14 semaines passent significativement moins de temps dans le quadrant cible que les souris WT et R6/1 à 11 semaines, et ce temps ne diffère pas du hasard (Figure 44C). La mémoire spatiale des souris R6/1 semble préservée à 11 semaines et altérée à 14 semaines, suggérant une progression des déficits cognitifs des souris R6/1.



**Figure 44** : Evaluation des performances cognitives dépendantes de l'hippocampe chez les souris WT et R6/1 à 11 et 14 semaines.

La mémoire spatiale des souris a été évaluée avec la piscine de Morris (A-C) et la tâche de localisation d'objets (D). (A) Schéma de la position de la plateforme dans la piscine de Morris lors de l'entraînement des souris. (B) Distance parcourue par les souris pour atteindre la plateforme au cours des 5 jours d'apprentissage en piscine de Morris -à gauche- (ANOVA à deux facteurs à mesures répétées : effet jours  $F(4, 140)=17,17$   $p<0,001$  ; effet génotype  $F(2, 35)=6,466$   $p<0,001$  ; interaction jours x génotype  $F(8, 140)=3,455$   $p=0,001$ ). Moyenne de la distance parcourue par les souris sur les 5 jours d'entraînement (ANOVA à un facteur et test de Tukey :  $F(2,35)=6,226$   $p=0,004$ ). (C) Temps passé par les souris dans chaque quadrant lors du test de rappel, le quadrant cible étant celui dans lequel la plateforme était positionnée lors de l'entraînement (ANOVA à un facteur et test de Tukey : NE,  $F(2, 35)=29,38$   $p<0,0001$  ; NO,  $F(2, 35)=1,212$   $p=0,30$  ; SE,  $F(2, 35)=0,121$   $p=0,88$  ; SO,  $F(2, 35)=22,41$   $p<0,001$ ). Le temps passé dans chaque quadrant est comparé au hasard (15 secondes) (T-test, quadrant SO : WT et R6/1 11-wk  $p<0,0001$  ; R6/1 14-wk  $p=0,07$ ). (D) La mémoire spatiale dans la tâche de localisation d'objets est évaluée en divisant le temps d'exploration de l'objet déplacé par le temps total d'exploration des 3 objets lors de la phase de rétention (ANOVA à un facteur :  $F(2, 41)=2,038$   $p=0,14$ ). Ce ratio est comparé au hasard (33%) (T-test :  $p<0,001$  pour les 3 groupes). Les données sont représentées par la moyenne  $\pm$  SEM. Effectifs pour la piscine de Morris :  $n=19$  WT (10♂, 9♀),  $n=10$  R6/1 11-wk,  $n=9$  R6/1 14-wk. Effectifs pour le test de localisation d'objets :  $n=22$  WT♂,  $n=11$  R6/1 11-wk♂,  $n=11$  R6/1 14-wk♂. Statistiques : \*\*  $p<0,01$  et \*\*\*  $p<0,005$  entre les groupes ; \$\$\$  $p<0,005$  vs hasard.

Pour valider nos résultats obtenus en piscine de Morris, nous avons complété les analyses avec le test de localisation d'objets. Cette tâche a été choisie dans le but d'évaluer la mémoire spatiale des souris R6/1, indépendamment de leurs performances d'apprentissage qui impactent le processus de mémorisation, celles-ci étant altérées dès l'âge de 11 semaines. En effet, la tâche de localisation d'objets est basée sur un comportement d'exploration spontané qui implique l'hippocampe. Le principe du test repose sur le fait que les souris, par leur curiosité, ont tendance à explorer préférentiellement un objet déplacé ou modifié par rapport à d'autres objets inchangés.

## Résultats

Pour réaliser ce test, 3 objets sont présentés aux souris dans un champs ouvert lors d'une phase d'acquisition de 10 minutes. Après un délai de 3h, les mêmes objets sont à nouveau présentés aux souris lors d'une phase de rétention de 10 minutes, dans la même configuration que la première exposition, à l'exception de l'un d'eux qui a été déplacé (cf partie **3.1.3 La tâche de localisation d'objets**, p.92). Si leur mémoire spatiale est fonctionnelle, les souris explorent davantage l'objet déplacé lors de la rétention, considéré comme nouveau par rapport aux objets non déplacés. Le temps d'exploration des 3 objets positionnés dans le champ ouvert a été mesuré pendant l'acquisition et la rétention. Un ratio a été calculé entre le temps d'exploration de l'objet déplacé et le temps total d'exploration des 3 objets (pourcentage d'exploration de l'objet déplacé). Celui-ci ne diffère pas entre les souris WT et R6/1 à 11 et 14 semaines et est significativement supérieur au hasard pour les trois groupes expérimentaux (Figure 44D), démontrant que les souris WT et R6/1 ont identifié l'objet déplacé.

L'ensemble des analyses évaluant la mémoire spatiale montre que celle-ci est préservée chez les souris R6/1 à l'âge de 11 semaines. En revanche, les résultats de la piscine de Morris et la tâche de localisation d'objets à 14 semaines sont contradictoires. L'altération de la mémoire spatiale en piscine de Morris pourrait être liée à la phase d'apprentissage, où les souris R6/1 présentent des performances altérées à 14 semaines. Tandis qu'une tâche basée sur un comportement spontané, comme la localisation d'objets, ne montre aucun déficit. Entre 11 et 14 semaines, les fonctions cognitives dépendantes de l'hippocampe seraient donc relativement préservées chez les souris R6/1, un résultat qui supporte les conclusions tirées des analyses des performances des souris dans le labyrinthe en double-H.

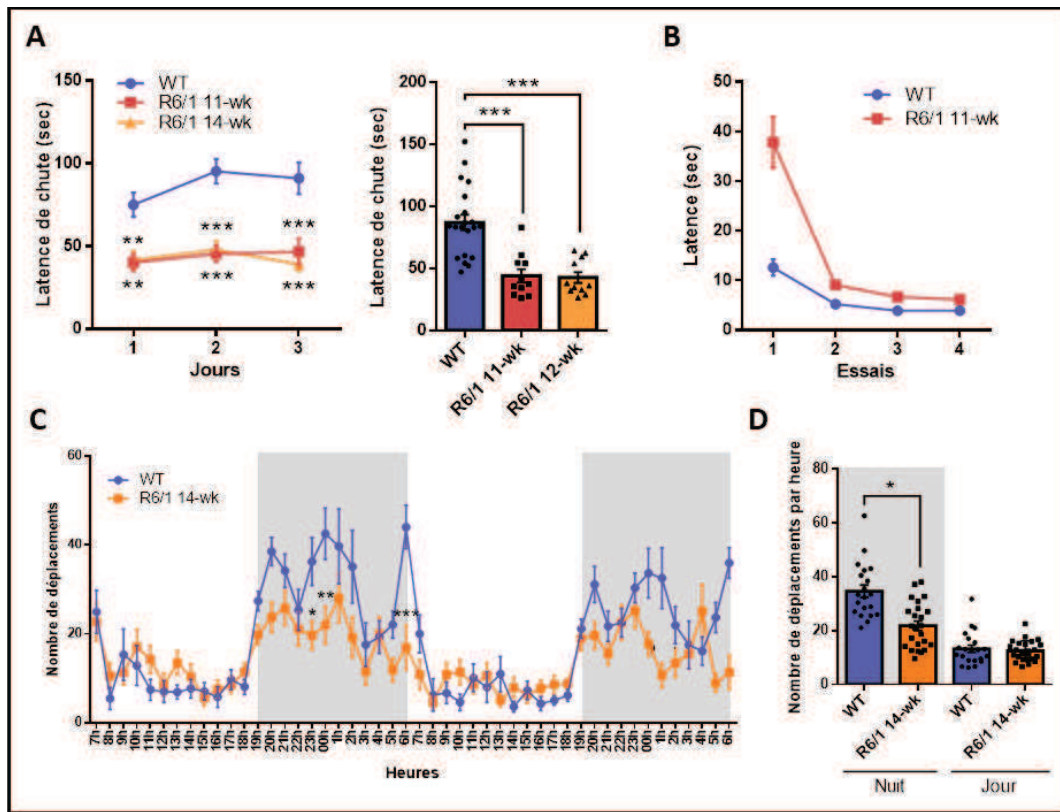
### 1.1.3. Evaluation des performances motrices des souris R6/1

Dans le but de positionner les déficits cognitifs dépendants du striatum par rapport aux déficits moteurs, les fonctions motrices des souris WT et R6/1 ont été évaluées à 11 et 14 semaines.

La coordination motrice a été évaluée au cours de 3 jours d'apprentissage dans le rotarod. La latence de chute des souris R6/1 à 11 et 14 semaines est significativement diminuée par rapport aux souris WT (Figure 45A) (*ANOVA à deux facteurs et à mesures répétées : effet génotype  $p < 0,0001$* ). Cependant, le rotarod est une tâche impliquant une

## Résultats

phase d'apprentissage, le déficit observé chez les souris R6/1 est donc peut-être également lié à leur altération cognitive et leur baisse de motivation.



**Figure 45 : Evaluation des performances motrices des souris WT et R6/1 à 11 et 14 semaines.**

La coordination motrice des souris a été évaluée à l'aide du rotarod (A) et du test de la barre (B). L'activité motrice spontanée a été mesurée par actographie (C-D). (A) Latence avant la chute des souris au cours des 3 jours d'entraînement dans le rotarod -à gauche- (ANOVA à deux facteurs à mesures répétées, test de Sidak : effet jours  $F(2, 80)=2,199$   $p=0,11$  ; effet génotype  $F(2, 40)=19,57$   $p<0,0001$  ; interaction jours x génotype  $F(4, 80)=0,8619$   $p=0,49$ ). Moyenne de la latence de chute de souris sur les 3 jours d'entraînement -à droite- (ANOVA à un facteur, test de Tukey :  $F(2, 40)=19,57$ ,  $p<0,0001$ ). (B) Latence nécessaire aux souris à l'âge de 11 semaines pour traverser la barre et rejoindre leur cage d'élevage lors des 4 essais (ANOVA à deux facteurs à mesures répétées : effet essais  $F(3, 63)=41,35$   $p<0,0001$  ; effet génotype  $F(1, 21)=25,93$   $p<0,0001$  ; interaction essais x génotype  $F(3, 63)=13,56$   $p<0,0001$ ). (C) Mesure de l'activité locomotrice spontanée des souris WT et R6/1 âgées de 14 semaines en évaluant, par actographie, leurs déplacements sur 48h (ANOVA à deux facteurs à mesures répétées : effet heures  $F(47, 1833)=13,84$   $p<0,0001$  ; effet génotype  $F(1, 39)=4,788$   $p<0,0001$  ; interaction heures x génotype  $F(47, 1833)=3,661$   $p<0,0001$ ). (D) Moyenne des déplacements des souris WT et R6/1 à 14 semaines dans leur cage en journée (7h-19h) et la nuit (19h-7h) (Test de Kruskal-Wallis, test de Dunn :  $k=50,31$   $p<0,0001$ ). Les données sont représentées par la moyenne  $\pm$  SEM. Effectifs : Rotarod,  $n=21$  WT♂,  $n=11$  R6/1 11-wk♂,  $n=11$  R6/1 14-wk♂ ; Test de la barre,  $n=10$  WT♂,  $n=13$  R6/1 11-wk♂ ; Actographie,  $n=20$  WT (12♂, 8♀),  $n=25$  R6/1 14-wk (17♂, 8♀). Les résultats d'actographie ne diffèrent pas entre les souris mâles et femelles et sont présentés dans l'annexe 1 (p.201). Statistiques : \*  $p<0,05$ , \*\*  $p<0,01$  et \*\*\*  $p<0,005$  R6/1 14-wk vs WT ; ##  $p<0,01$ , ###  $p<0,005$  R6/1 11-wk vs WT ; \$\$\$  $p<0,005$  R6/1 11-wk et 14-wk vs WT.

La coordination motrice a aussi été évaluée à 11 semaines à l'aide du test de la barre, un test moins complexe au niveau moteur et cognitif. Les souris R6/1 mettent significativement plus de temps que les souris WT à traverser la barre lors du premier essai (ANOVA à mesures répétées, comparaisons multiples avec le test de Sidak : R6/1 vs WT  $p<0,0001$  pour l'essai 1). Leurs performances progressent ensuite rapidement et deviennent similaires à celles des souris WT dès le deuxième essai (Figure 45B). Ainsi, les souris R6/1 sembleraient présenter

## Résultats

des difficultés à comprendre la tâche et/ou un manque de motivation pour la réaliser, mais leur coordination motrice semble relativement préservée à cet âge.

Pour s'affranchir d'une situation d'apprentissage, nous avons évalué l'activité locomotrice spontanée des souris à l'âge de 14 semaines par actographie, sur une durée de 48h. Globalement, le rythme circadien des souris est régulier avec une augmentation de l'activité globale la nuit par rapport au jour ([Figure 45C](#)). L'activité nocturne moyenne est significativement diminuée chez les souris R6/1 par rapport aux souris WT ([Figure 45D](#)). Ces résultats suggèrent une altération de l'activité spontanée des souris R6/1 à 14 semaines. Ce déficit pourrait être lié à l'altération de la motivation des souris R6/1, plusieurs études ont en effet montré qu'elles présentaient un comportement apathique (Bolivar et al., 2004; Pallier et al., 2009; Heath et al., 2019).

En résumé, les résultats obtenus pour l'évaluation des performances motrices des souris sont variables selon les tâches car d'autres fonctions, non motrices, sont altérées et interviennent dans les tests utilisés (apprentissage et motivation).

### 1.1.4. [Résumé des altérations comportementales des souris R6/1](#)

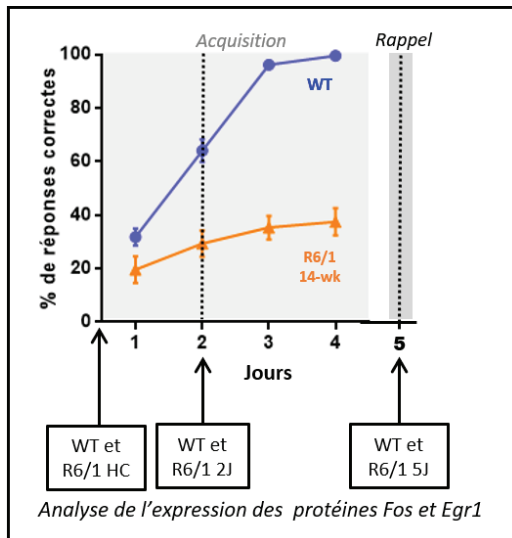
Les fonctions cognitives dépendantes du striatum, la mémoire procédurale et la flexibilité cognitive, ont été évaluées à l'aide du test du labyrinthe en double-H. Les souris R6/1 présentent un déficit de mémoire procédurale précoce, dès l'âge de 11 semaines et une altération de la flexibilité cognitive dès 9 semaines. À ce stade, la mémoire spatiale, soutenue par l'hippocampe, n'est pas altérée de façon significative et semble compenser le déficit de mémoire procédurale. Les performances motrices des souris R6/1 sont également altérées dès l'âge de 11 semaines.



## 1.2. Altération fonctionnelle des neurones du striatum des souris R6/1

Dans le but d'évaluer si les altérations comportementales des souris R6/1 corrèlent avec une altération de l'activation des neurones du striatum au cours des processus d'apprentissage, l'expression des protéines Fos et Egr1 (Zif268) a été analysée. Ces protéines sont synthétisées à partir des IEGs *Fos* et *Egr1*, dont l'expression est activée rapidement et transitoirement par différentes voies de signalisation, en réponse à une stimulation neuronale (Okuno, 2011). Le gène *Fos*, faiblement exprimé en condition basale, voit sa transcription augmentée en cas de stimulation neuronale et constitue un marqueur classiquement utilisé pour évaluer l'activité neuronale (Lyons and West, 2011). De plus, *Fos* est impliqué dans la plasticité synaptique et les processus de mémoire (Veyrac et al., 2014). *Egr1* est également induit en réponse à une stimulation neuronale et joue un rôle dans la plasticité synaptique et les processus de mémoire (consolidation et reconsolidation) (Veyrac et al., 2014). Contrairement au gène *Fos*, son expression, qui est élevée dans le striatum en condition basale, est diminuée dans le striatum Huntington (Hodges et al., 2006; Achour et al., 2015; Langfelder et al., 2016).

Pour étudier l'expression de ces protéines et leur activation dans les structures cérébrales des souris R6/1, nous avons collecté les cerveaux des souris WT et R6/1 âgées de 14 semaines en condition basale (WT et R6/1 HC), 1h après le dernier essai de la deuxième acquisition dans le labyrinthe en double-H (WT et R6/1 2J) et 1h après le test de rappel (WT et R6/1 5J) (Figure 46). Le délai d'une heure entre l'essai et le prélèvement des tissus correspond au temps nécessaire à l'expression des gènes induits par l'apprentissage, et notamment des IEGs. Nous avons choisi de réaliser les analyses dans un délai de 2 jours après le début des acquisitions dans le labyrinthe en double-H. Celui-ci correspond à un stade intermédiaire de la courbe d'apprentissage (Figure 46), où les performances des souris WT sont en pleine progression. À un stade plus avancé de l'apprentissage, à 5 jours, les performances sont maximales et les souris WT ont appris la localisation de la plateforme (Figure 46). Pour l'analyse histologique, les coupes de striatum et d'hippocampe ont été immunomarquées pour les protéines Egr1 (Figure 47A) et Fos (Figure 47D). Les neurones marqués positivement pour les protéines d'intérêt ont été comptés par stéréologie (cf partie **5.4 Comptage neuronal par stéréologie**, p.101).



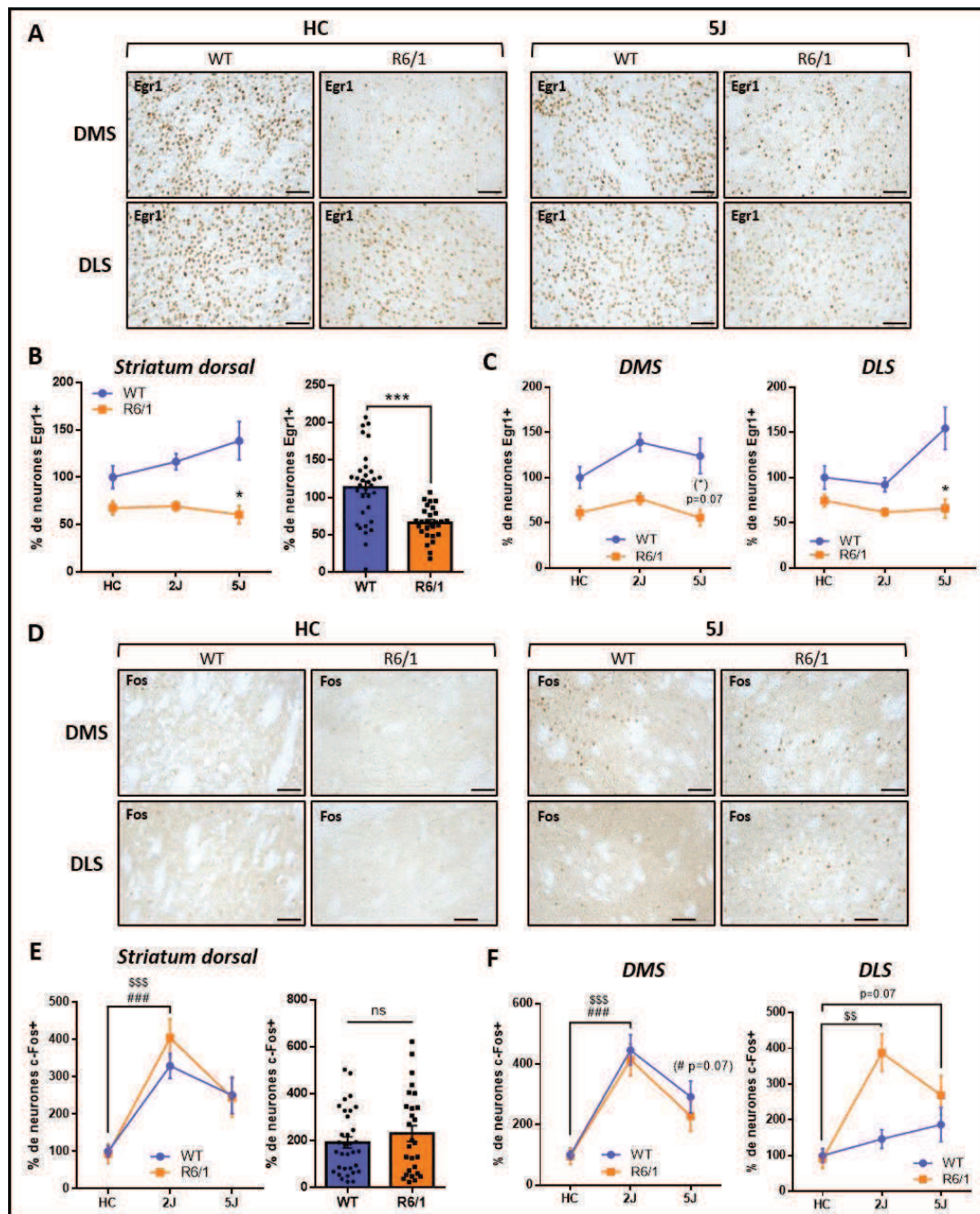
**Figure 46 : Plan du prélèvement des tissus pour les analyses histologiques.**

Les cerveaux des souris WT et R6/1 âgées de 14 semaines ont été collectés en condition basale (WT et R6/1 HC), après 2 jours d'apprentissage dans le double-H (1h après le dernière acquisition) (WT et R6/1 2J) et 1h après le test de rappel (WT et R6/1 5J). Le comptage neuronal par stéréologie de l'expression des protéines Fos et Egr1 a ensuite été réalisé dans le striatum et l'hippocampe des souris.

### 1.2.1. Expression des protéines Egr1 et Fos dans le striatum des souris WT et R6/1

Nous avons observé que l'expression de la protéine Egr1 augmente progressivement au cours des jours d'apprentissage dans le striatum dorsal des souris WT (Figure 47B). Plus précisément, Egr1 est particulièrement augmenté dans le DLS après 5 jours d'apprentissage dans le double-H (Figure 47C). Le DLS étant impliqué dans l'acquisition des habitudes (cf partie 1.3.1.c Striatum dorsal et cognition, p.12), cette augmentation reflèterait l'apprentissage d'une stratégie procédurale chez les souris WT.

Par ailleurs, chez ces mêmes souris, un pic d'expression de la protéine Fos est observé après 2 jours d'acquisition (Figure 47E). Plus précisément, cette augmentation est significative uniquement dans le DMS (Figure 47F), la sous-région du striatum impliquée dans l'expression d'un comportement dirigé vers un but (cf partie 1.3.1.c Striatum dorsal et cognition, p.12) (Test de Kruskal-Wallis, comparaisons multiples avec le test de Dunn : Striatum dorsal, WT 2J vs WT HC  $p=0,004$  ; DMS, WT 2J vs WT HC  $p=0,0003$  ; DLS, WT 2J vs WT HC  $p>0,99$ ).



**Figure 47 : Quantification de l'expression des protéines Egr1 et Fos dans le striatum des souris WT et R6/1, en condition basale et après un apprentissage dans le labyrinthe en double-H.**

(A) Exemple de marquage de la protéine Egr1 dans le striatum dorsolatéral (DLS) et dorsomédian (DMS) des souris WT et R6/1 en condition basale (WT HC, R6/1 HC) et après 5 jours d'entraînement dans le double-H (WT 5J, R6/1 5J). (B-C) Pourcentage de neurones marqués positivement pour la protéine Egr1 dans le striatum dorsal (B) et ses sous-régions (C). Le nombre de neurones Egr1+ de chaque groupe a été rapporté à celui des WT HC (*Test de Kruskal-Wallis, test de Dunn : Striatum dorsal, k=20,61 p=0,001 ; DMS, k=23,43 p=0,0003 ; DLS, k=18,52 p=0,0024*). (B) Pourcentage moyen de neurones Egr1+ dans le striatum dorsal des souris WT et R6/1 (*Test de Mann-Whitney : U=167 p<0,0001*). (D) Exemple de marquage de la protéine Fos dans le DMS et le DLS des souris WT et R6/1 en condition basale (WT HC, R6/1 HC) et après 5 jours d'entraînement dans le double-H (WT 5J, R6/1 5J). (E-F) Pourcentage de neurones marqués positivement pour la protéine Fos dans le striatum dorsal (E) et ses sous-régions (F). Le nombre de neurones de chaque groupe a été rapporté à celui des WT HC (*Test de Kruskal-Wallis : Striatum dorsal, k=33,16 p<0,0001 ; DMS, k=37,13 p<0,0001 ; DLS, k=25,11 p=0,0001*). (E) Pourcentage moyen de neurones Fos+ dans le striatum dorsal des souris WT et R6/1 (*Test de Mann-Whitney : U=413 p=0,63*). Les données sont représentées par la moyenne  $\pm$  SEM. Effectifs : n=17 WT HC (8 ♂, 9 ♀), n=11 R6/1 HC (5 ♂, 6 ♀), n=8 WT 2J ♂, n=8 R6/1 2J ♂, n=8 WT 5J (5 ♂, 3 ♀), n=8 R6/1 5J (5 ♂, 3 ♀). Les données ne diffèrent pas entre les souris mâles et femelles et sont présentées dans l'annexe 2 (p.202). Statistiques : \* p<0,05 et \*\*\* p<0,005 R6/1 vs WT ; ### p<0,005 WT 2J et 5J vs WT HC ; \$\$\$ p<0,005 R6/1 2J et 5J vs R6/1 HC.

## Résultats

Ces résultats suggèrent qu'après 2 jours d'acquisition dans le labyrinthe en double-H, les souris WT utilisent une stratégie basée sur une association entre une réponse et un but (R-O). Cet apprentissage associatif implique le DMS mais également l'hippocampe (Gruart and Delgado-García, 2007) (cf partie **1.2.2. Expression des protéines Egr1 et Fos dans l'hippocampe des souris WT et R6/1**, p.129), tandis que la stratégie procédurale, associée plus particulièrement au DLS, se mettrait en place après 5 jours d'entraînement.

Chez les souris R6/1 à 14 semaines, l'expression de la protéine Egr1 est significativement diminuée dans le striatum par rapport aux souris WT (Figure 47B). De plus, la protéine Egr1 n'est pas augmentée chez les souris R6/1 après 2 ou 5 jours d'entraînement dans le double-H (Figure 47B,C), suggérant une altération du mécanisme d'activation neuronale en réponse à l'apprentissage.

Contrairement à Egr1, le niveau protéique de Fos chez les souris R6/1 est comparable à celui des souris WT (Figure 47E). L'expression maximale de la protéine Fos est observée dans le DMS des souris R6/1 après 2 jours d'apprentissage. De façon surprenante, Fos est également augmentée dans le DLS (Figure 47F) (*Test de Kruskal-Wallis, test de Dunn pour les comparaisons multiples : DMS, R6/1 2J vs R6/1 HC  $p=0,0009$  ; DLS, R6/1 2J vs R6/1 HC  $p=0,0005$* ).

### 1.2.2. Expression des protéines Egr1 et Fos dans l'hippocampe des souris WT et R6/1

Nos résultats comportementaux mettant en évidence une éventuelle compensation du déficit de mémoire procédurale par la mémoire spatiale, l'expression protéique de Egr1 (Figure 48A) et Fos (Figure 48D) a été analysée dans l'hippocampe des souris. Globalement, la protéine Egr1 n'est pas significativement augmentée dans l'hippocampe dorsal des souris WT (Figure 48B) et ses sous-régions (Figure 48C).

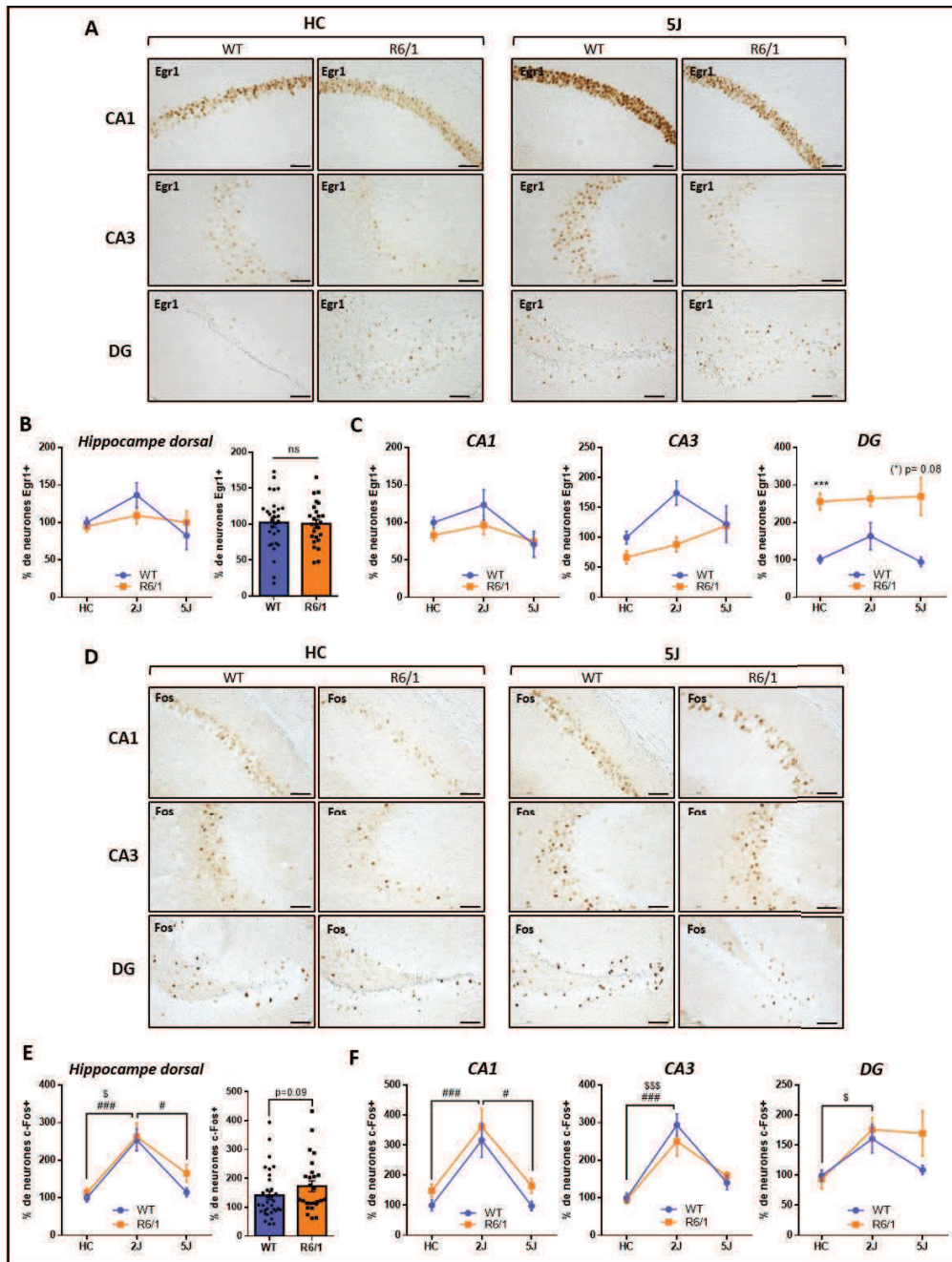
En revanche, la protéine Fos est significativement augmentée dans l'hippocampe dorsal des souris WT uniquement après 2 jours d'apprentissage (Figure 48E), et plus particulièrement dans CA1 et CA3 (Figure 48F) (*Test de Kruskal-Wallis, test de Dunn pour les comparaisons multiples, WT 2J vs WT HC : Hippocampe dorsal,  $p=0,0006$  ; CA1  $p=0,001$  ; CA3,  $p=0,0002$* ). Ces sous-structures étant impliquées dans l'encodage d'une nouvelle information spatiale et

## Résultats

l'apprentissage associatif (Kesner, 2007), l'augmentation de l'expression de la protéine Fos dans les régions CA1 et CA3 de l'hippocampe ([Figure 48F](#)) et dans le DMS ([Figure 47F](#)) des souris WT après 2 jours d'apprentissage, reflèterait l'apprentissage d'une association entre une réponse et un but (R-O) et/ou d'une stratégie spatiale au moment de la deuxième acquisition dans le labyrinthe en double-H.

Globalement, l'expression des protéines Egr1 et Fos dans l'hippocampe dorsal des souris R6/1 n'est pas différente de celle des souris WT ([Figure 48B,E](#)). Fos est augmentée dans les sous-régions CA1 et CA3 de l'hippocampe après 2 jours d'entraînement ([Figure 48F](#)). En revanche, une augmentation du marquage Fos après 2 jours d'apprentissage est aussi observée dans le DG des souris R6/1 ([Figure 48F](#)) (*Test de Kruskal-Wallis, test de Dunn pour les comparaisons multiples, R6/1 2J vs R6/1 HC : CA1  $p=0,16$  ; CA3  $p=0,004$  ; DG,  $p=0,04$* ). De façon remarquable, la protéine Egr1 est significativement augmentée dans le DG des souris R6/1 en condition basale et après 5 jours dans le double-H ([Figure 48C](#)) (*Test de Kruskal-Wallis, test de Dunn pour les comparaisons multiples : R6/1 HC vs WT HC,  $p=0,0007$  ; R6/1 5J vs WT 5J,  $p=0,08$* ).

Ces résultats suggèrent que les niveaux de base et d'induction de marqueurs clés impliqués dans l'activation neuronale sont globalement préservés dans l'hippocampe des souris R6/1. Ils indiquent également que des mécanismes compensatoires se mettent en place dans cette structure chez les souris R6/1, en particulier au niveau du DG.



**Figure 48 : Quantification de l'expression des protéines Egr1 et Fos dans l'hippocampe des souris WT et R6/1, en condition basale et après un apprentissage dans le labyrinthe en double-H.**

(A) Exemple du marquage de la protéine Egr1 dans les sous-régions de l'hippocampe des souris WT et R6/1 en condition basale (WT HC, R6/1 HC) et après 5 jours d'entraînement dans le double-H (WT 5J, R6/1 5J). (B-C) Pourcentage de neurones marqués positivement pour la protéine Egr1 dans l'hippocampe dorsal (B) et ses sous-régions (C). Le nombre de neurones Egr1+ de chaque groupe a été rapporté à celui des WT HC (Test de Kruskal-Wallis, test de Dunn : Hippocampe dorsal,  $k=7,71$   $p=0,17$  ; CA1,  $k=10,53$   $p=0,061$  ; CA3,  $k=14,61$   $p=0,012$  ; DG,  $k=30,63$   $p<0,0001$ ). (B) Pourcentage moyen de neurones Egr1+ dans l'hippocampe dorsal des souris WT et R6/1 (Test de Mann-Whitney :  $U=341$   $p=0,71$ ). (D) Exemple du marquage de la protéine Fos dans les sous-régions de l'hippocampe des souris WT et R6/1 en condition basale (WT HC, R6/1 HC) et après 5 jours d'entraînement dans le double-H (WT 5J, R6/1 5J). (E-F) Pourcentage de neurones Fos+ marqués positivement pour la protéine Fos dans l'hippocampe dorsal (E) et ses sous-régions (F). Le nombre de neurones Fos+ des différents groupes a été rapporté à celui des WT HC (Test de Kruskal-Wallis, test de Dunn : Hippocampe dorsal,  $k=30,57$   $p<0,0001$  ; CA1,  $k=29,41$   $p<0,0001$  ; CA3,  $k=33,11$   $p<0,0001$  ; DG,  $k=15,64$   $p=0,0079$ ). (E) Pourcentage moyen de neurones Fos+ dans l'hippocampe dorsal des souris WT et R6/1 (Test de Mann-Whitney :  $U=318$   $p=0,091$ ). Les données sont représentées par la moyenne  $\pm$  SEM. Effectifs :  $n=17$  WT HC (8♂, 9♀),  $n=11$  R6/1 HC (5♂, 6♀),  $n=8$  WT 2J (♂),  $n=8$  R6/1 2J (♂),  $n=8$  WT 5J (5♂, 3♀),  $n=8$  R6/1 5J (5♂, 3♀). Les données ne diffèrent pas entre les souris mâles et femelles et sont présentées dans l'annexe 3 (p.203). \*\*\*  $p<0,005$  R6/1 vs WT ; ##  $p<0,01$ , #  $p<0,05$  et ###  $p<0,005$  entre les différents groupes de WT ; \$  $p<0,05$  et \$\$\$  $p<0,005$  entre les différents groupes de R6/1.

### 1.3. Dynamique du transcriptome des souris WT et R6/1 au cours du processus de mémorisation

Dans le but d'évaluer l'impact du processus de mémorisation sur l'expression des gènes chez les souris, une analyse du transcriptome du striatum et de l'hippocampe des souris WT et R6/1 a été réalisée par séquençage des ARNs (RNA-seq). Les tissus ont été prélevés en condition basale (WT et R6/1 HC), 1h après le dernier essai de la deuxième acquisition dans le labyrinthe en double-H (WT et R6/1 2J) et 1h après le test de rappel (WT et R6/1 5J) ([Figure 49A](#)). Nous avons choisi de réaliser le même déroulé temporel pour les analyses transcriptomiques que pour les analyses histologiques (cf partie **1.2. Altération fonctionnelle des neurones du striatum des souris R6/1**, p.126) : les analyses ont été réalisées 2 jours après le début des acquisitions dans le labyrinthe en double-H, un stade où les performances des souris WT sont en pleine progression ([Figure 46](#)). Elles ont également été effectuées plus tardivement, à 5 jours, après le test de rappel où les souris WT ont appris la localisation de la plateforme.

#### 1.3.1. [Analyse de la qualité des échantillons séquencés](#)

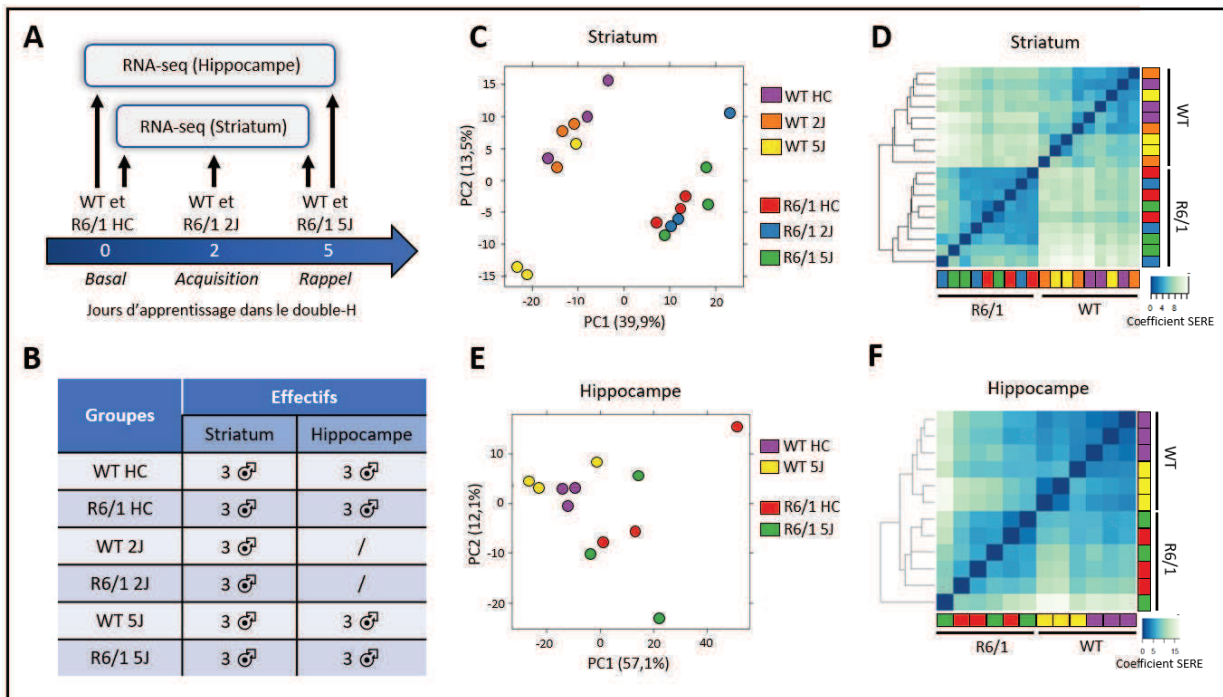
Nous avons réalisé le séquençage des ARNs extraits du striatum et de l'hippocampe de 3 animaux mâles par groupe (cf partie **7.2 Séquençage des ARNs et analyse des résultats**, p.106) ([Figure 49B](#)). Les échantillons séquencés ont été sélectionnés au hasard parmi les animaux des différentes conditions expérimentales. Les détails du séquençage et des analyses bioinformatiques sont présentés dans la partie **7.2. Séquençage des ARNs et analyse des résultats** du matériel et méthodes (p.106).

La variabilité entre les échantillons striataux, représentée par l'analyse en composante principale (ACP) ([Figure 49C](#)), montre que ceux-ci sont divisés en deux groupes en fonction du génotype ; l'un comportant l'ensemble des échantillons des souris WT (WT HC, 2J et 5J) et l'autre ceux des souris R6/1 (R6/1 HC, 2J et 5J). En revanche, les échantillons se regroupent peu en fonction de la condition d'apprentissage (HC, 2J ou 5J). De même, une analyse de cluster hiérarchique basée sur les scores SERE (*Simple Error Ratio Estimate*) (Schulze *et al.*, 2012) confirme le regroupement des échantillons en deux clusters en fonction du génotype ([Figure 49D](#)).

## Résultats

Dans l'hippocampe, l'ACP et l'analyse de cluster hiérarchique montre que les échantillons sont également regroupés principalement en fonction du génotype (Figure 49E,F).

Ces analyses suggèrent que le génotype, plus que la condition d'apprentissage, est associé à des changements transcriptionnels importants dans le striatum et dans l'hippocampe des souris.



**Figure 49 : Conditions expérimentales et qualité des échantillons séquencés.**

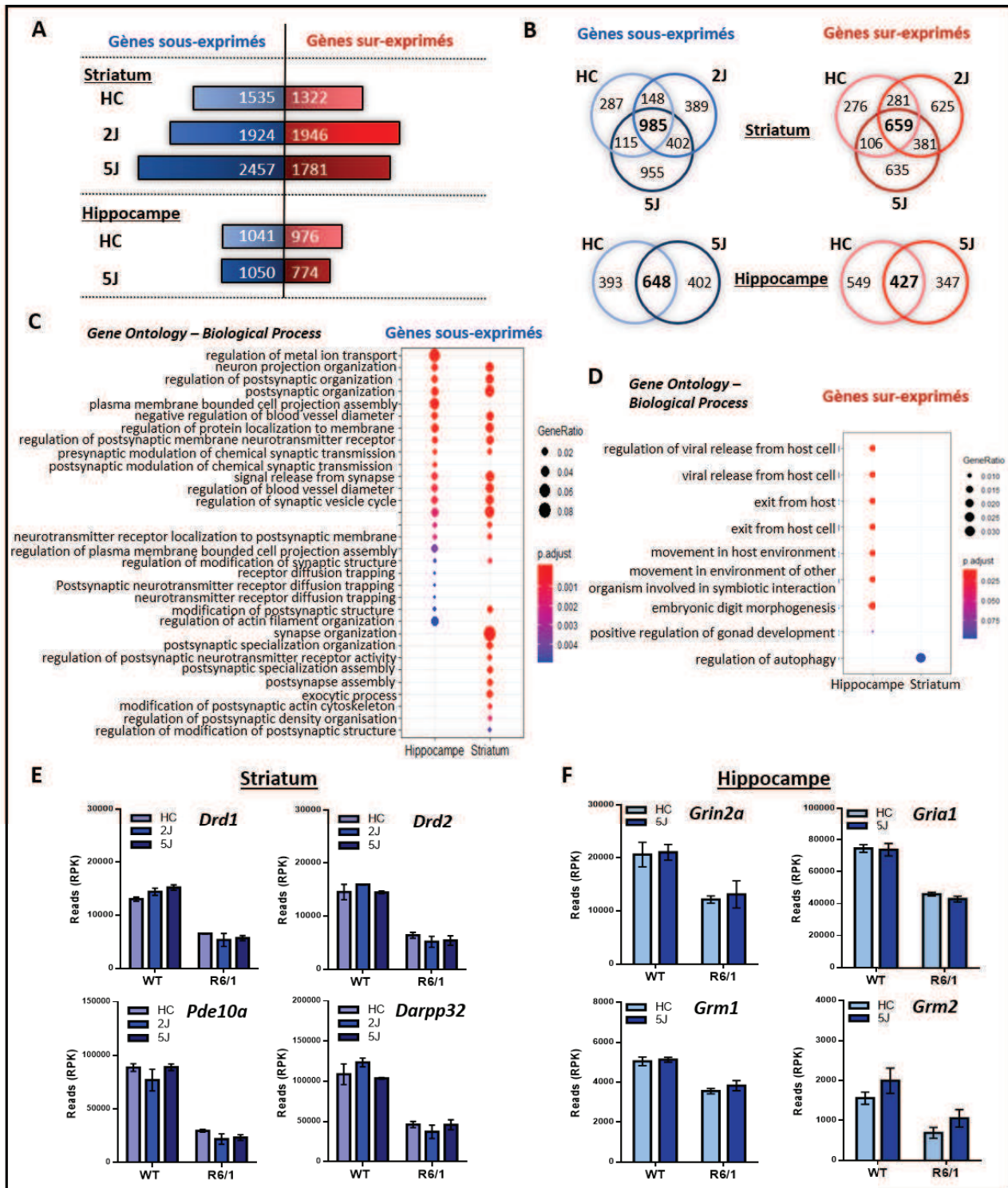
(A) Planning de dissection des souris dont les tissus ont été séquencés, au cours des jours d'entraînement dans le labyrinthe en double-H. (B) Effectifs et groupes expérimentaux utilisés pour le RNA-seq du striatum et de l'hippocampe. (C) Analyse en composante principale (ACP) des échantillons séquencés pour le striatum des souris WT et R6/1. (D) Dendrogramme et classification hiérarchique de la distance entre les échantillons séquencés (coefficient SERE) pour le striatum des souris WT et R6/1. (E) Analyse en composante principale (ACP) des échantillons séquencés pour l'hippocampe des souris WT et R6/1. (F) Dendrogramme et classification hiérarchique de la distance entre les échantillons séquencés (coefficient SERE) pour l'hippocampe des souris WT et R6/1.

### 1.3.2. Caractérisation du transcriptome du striatum et de l'hippocampe chez les souris WT et R6/1 en condition basale, lors de la formation, lors du rappel d'une mémoire procédurale

#### 1.3.2.a. Altération préférentielle du transcriptome striatal des souris R6/1 par rapport au transcriptome de l'hippocampe

Une analyse des gènes différemment exprimés dans le striatum et l'hippocampe des souris R6/1 par rapport aux souris WT a été réalisée, en condition basale et après 2 et 5 jours d'apprentissage dans le labyrinthe en double-H.





**Figure 50 : Effet du génotype sur l'expression des gènes dans le striatum et l'hippocampe des souris WT et R6/1.** Les listes de gènes ont été sélectionnées avec un  $\log(\text{FC}) \leq 0$  ou  $\log(\text{FC}) > 0$  et une p-valeur ajustée  $< 0,05$ . **(A)** Nombre de gènes sur-exprimés et sous-exprimés dans le striatum et l'hippocampe des souris R6/1 par rapport aux souris WT (comparaisons réalisées : R6/1 HC vs WT HC, R6/1 2J vs WT 2J, R6/1 5J vs WT 5J). **(B)** Diagrammes de Venn du nombre de gènes sur- et sous-exprimés dans le striatum et l'hippocampe des souris R6/1 par rapport aux souris WT, dans les différentes conditions d'apprentissage (HC, 2J et 5J). **(C-D)** Enrichissement fonctionnel des gènes sous-exprimés **(C)** et sur-exprimés **(D)** à la fois à 2 et 5 jours après apprentissage, dans le striatum et l'hippocampe des souris R6/1 par rapport aux souris WT. Les analyses fonctionnelles ont été réalisées avec la librairie R ClusterProfiler, à partir des termes de la base de données Gene Ontology. Des analyses fonctionnelles complémentaires ont été réalisées avec DAVID (Annexe 4, p.204). **(E-F)** Exemples de gènes neuronaux sous-exprimés à 2 et 5 jours après apprentissage dans le striatum **(E)** et l'hippocampe **(F)** des souris R6/1 par rapport aux souris WT.

## Résultats

Ces comparaisons permettent de mettre en évidence les gènes dont l'expression est modifiée par la mutation Huntington dans les deux structures cérébrales et de déterminer si celle-ci a un impact sur les gènes modulés lors du processus de mémorisation.

Les gènes différentiellement exprimés entre les souris WT et R6/1 dans les différentes conditions (R6/1 HC vs WT HC ; R6/1 2J vs WT 2J ; R6/1 5J vs WT 5J), ont été analysés avec un fold-change (FC) supérieur ou inférieur à 1 ( $\log(\text{FC}) > 0$  ou  $\log(\text{FC}) < 0$ ) et une p-valeur ajustée inférieure ou égale à 0,05. Cette analyse a permis d'identifier 1535 gènes sous-exprimés dans le striatum des souris R6/1 par rapport aux souris WT en condition basale et 1322 gènes sur-exprimés ([Figure 50A](#)).

Le nombre de gènes dérégulés dans le striatum des souris R6/1 est augmenté après 2 jours d'apprentissage (1924 gènes sous-exprimés et 1946 sur-exprimés chez les souris R6/1 vs WT) et encore davantage à 5 jours (2457 gènes sous-exprimés et 1781 sur-exprimés chez les souris R6/1 vs WT) ([Figure 50A](#)). Dans l'hippocampe, 1041 gènes sous-exprimés et 976 gènes sur-exprimés ont été identifiés en condition basale chez les souris R6/1 par rapport aux souris WT. Ces proportions de gènes sont peu modifiées après 5 jours d'apprentissage dans le labyrinthe en double-H (1050 gènes sous-exprimés et 774 sur-exprimés dans l'hippocampe des souris R6/1 vs WT) ([Figure 50A](#)). Le nombre de gènes dérégulés dans l'hippocampe des souris R6/1 âgées de 14 semaines est moins important que dans leur striatum, appuyant l'idée d'une atteinte fonctionnelle atténuée de cette structure comparée au striatum.

Afin d'identifier les gènes dont l'expression est modifiée par la mutation Huntington, indépendamment du processus de mémorisation, nous avons comparé les listes de gènes dérégulés chez les souris R6/1 (vs WT) entre les différentes conditions d'apprentissage (HC, 2J et 5J) ([Figure 50B](#)). Nous avons observé qu'une proportion importante de gènes dérégulés est commune aux souris HC, 2J et 5J. En effet, 985 gènes du striatum et 648 gènes de l'hippocampe ; soit respectivement 64% et 62% des gènes sous-exprimés en condition basale sont conjointement sous-exprimés chez les souris R6/1 par rapport aux souris WT dans les deux conditions (HC et 5J) ([Figure 50B](#)). L'analyse fonctionnelle montre que les gènes sous-exprimés dans le striatum Huntington sont particulièrement enrichis dans des processus biologiques relatifs à l'activité neuronale, comme la transmission et l'organisation synaptique ([Figure 50C, Annexe 4](#)). Les gènes sous-exprimés chez les souris R6/1 HC, 2J et 5J par rapport aux souris WT incluent les gènes caractéristiques de l'identité neuronale du striatum, tels que

## Résultats

*Drd1* et *Drd2* codant pour les récepteurs dopaminergiques, ou encore *Pde10a* et *Darpp32* ([Figure 50E](#)). Ces résultats suggèrent une atteinte du striatum des souris R6/1 en accord avec la littérature qui décrit une signature fonctionnelle neuronale dans le striatum des modèles murins de la MH et des patients (Seredenina and Luthi-Carter, 2012; Achour et al., 2015; Langfelder et al., 2016; Le Gras et al., 2017; Merienne et al., 2019). Les gènes sous-exprimés dans l'hippocampe des souris R6/1 présentent également un enrichissement fonctionnel dans des processus biologiques neuronaux ([Figure 50C, Annexe 4](#)). De même, les gènes caractéristiques de l'identité neuronale de l'hippocampe, tels que *Grin2a*, *Gria1*, *Grm1* et *Grm2* codant pour des sous-unités des récepteurs glutamatergiques sont sous-exprimés chez les souris R6/1 ([Figure 50E](#)). Ces résultats indiquent que la signature fonctionnelle neuronale décrite dans le striatum des souris R6/1 est également présente dans l'hippocampe.

D'autres part, de nombreux gènes sont sur-exprimés dans le striatum et l'hippocampe des souris R6/1. En effet, 659 gènes dans le striatum et 427 gènes dans l'hippocampe, soit respectivement 50% et 44% des gènes sur-exprimés en condition basale, ont une expression augmentée chez les R6/1 HC, R6/1 2J et R6/1 5J par rapport aux souris WT ([Figure 50B](#)). Contrairement aux gènes sous-exprimés, la signature fonctionnelle des gènes sur-exprimés chez les souris R6/1 est moins claire et semble associée à des processus métaboliques, développementaux ou inflammatoires ([Figure 50D, Annexe 4](#)).

### 1.3.2.b. [Altération des régulations transcriptionnelles striatales induites par le processus de mémorisation chez les souris R6/1](#)

La mémoire procédurale des souris R6/1 étant altérée à l'âge de 14 semaines, les régulations transcriptionnelles induites par le processus de mémorisation ont été analysées afin de déterminer si elles étaient anormales chez les souris R6/1.

Nous avons comparé l'expression des gènes dans le striatum des souris entraînées pendant 2 et 5 jours dans le double-H par rapport aux souris en condition basale (WT 2J vs WT HC ; WT 5J vs WT HC ; R6/1 2J vs R6/1 HC ; R6/1 5J vs R6/1 HC). Pour l'hippocampe, nous avons comparé l'expression des gènes entre la condition basale et la condition d'apprentissage de 5 jours dans le double-H (WT 5J vs WT HC ; R6/1 5J vs R6/1 HC).

L'analyse d'expression différentielle a mis en évidence un nombre croissant de gènes dérégulés dans le striatum des souris WT 2J et WT 5J par rapport aux souris WT HC : 74 et 152

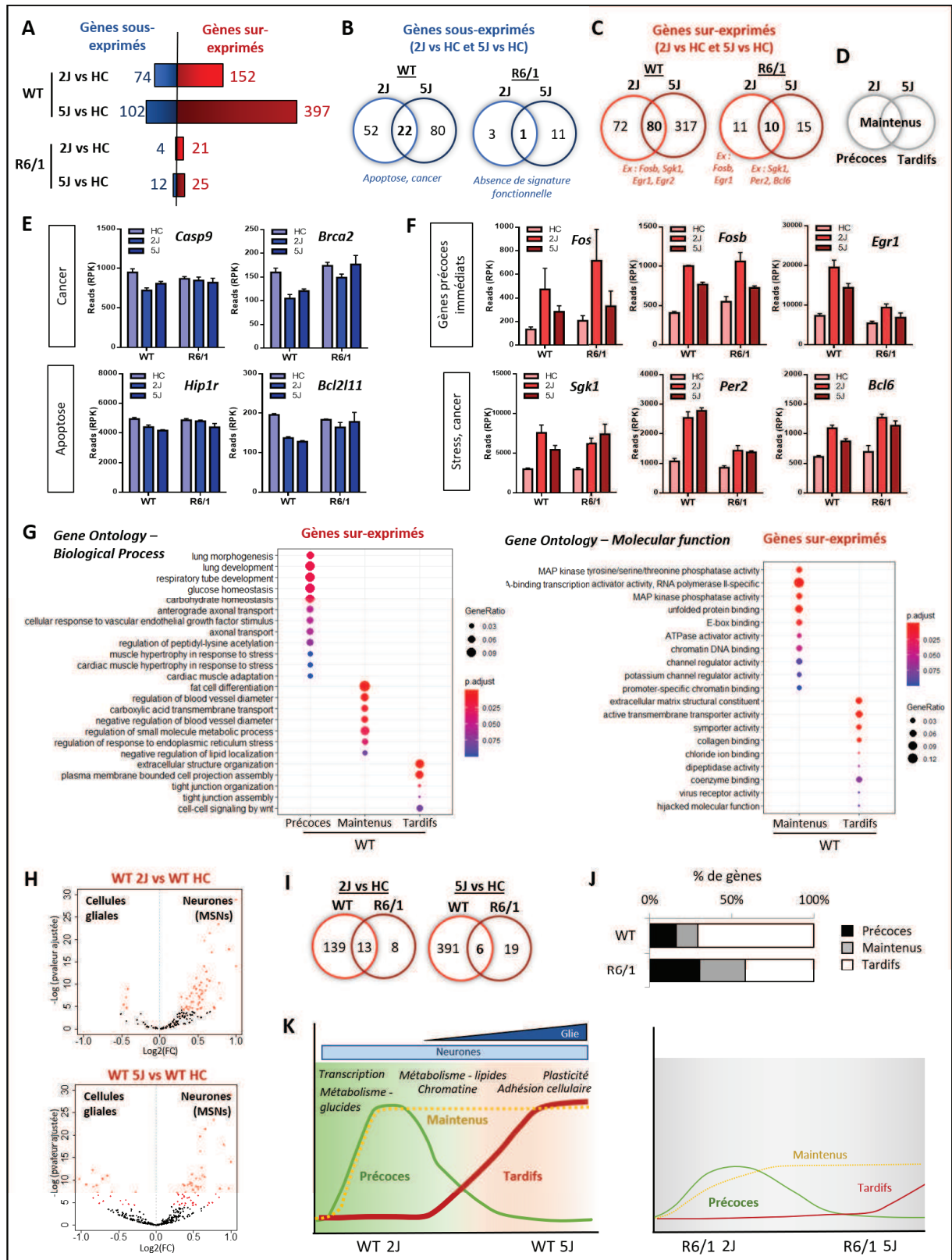
## Résultats

gènes sont respectivement sous- et sur-exprimés après 2 jours ; 102 et 397 gènes sont respectivement sous- et sur-exprimés à 5 jours ( $\log(\text{FC}) \leq 0$  ou  $\log(\text{FC}) > 0$ , p-valeur ajustée  $< 0,1$ ) ([Figure 51A](#)). En revanche, chez les souris R6/1, le nombre de gènes dérégulés après apprentissage est beaucoup moins important que chez les souris WT : 4 et 21 gènes sont respectivement sous- et sur-exprimés après 2 jours ; 12 et 25 gènes sont respectivement sous- et sur-exprimés après 5 jours ([Figure 51A](#)). Ces résultats montrent une altération des régulations transcriptionnelles du striatum Huntington lors de la formation d'une mémoire procédurale.

Les gènes sous-exprimés au cours de l'apprentissage chez les souris WT et R6/1 ne présentent pas de signature fonctionnelle significative. Cependant, parmi les gènes sous-exprimés à 2 et 5 jours chez les souris WT, la présence de gènes impliqués dans les processus de prolifération cellulaire et d'apoptose est notée (*Casp9*, *Brca2*, *Hip1r*, *Bcl2l11*) ([Figure 51E](#)). Par ailleurs, les gènes sur-exprimés au cours de l'apprentissage chez les souris WT sont plus nombreux que les gènes sous-exprimés ([Figure 51C](#)) et comprennent des IEGs tels que *Fos*, *Fosb*, *Egr1*, reflétant l'activation neuronale.

Dans le but d'identifier différents profils d'expression, nous avons analysé l'intersection des gènes dérégulés à 2 et 5 jours par rapport à la condition basale chez les souris WT et R6/1 ([Figure 51B,C](#)). Trois catégories de gènes induits par la formation d'une mémoire procédurale ont ainsi été identifiées dans le striatum des souris : les gènes du premier groupe sont dérégulés uniquement à 2 jours, ceux du deuxième groupe sont à la fois dérégulés à 2 et 5 jours et les gènes du troisième groupe sont uniquement dérégulés à 5 jours. Ces trois profils d'expression sont par la suite désignés comme « précoce », « maintenu » et « tardif » ([Figure 51D](#)).

# Résultats



**Figure 51 : Effets du processus de mémorisation sur le transcriptome du striatum des souris WT et R6/1.**

Les listes de gènes ont été sélectionnées avec un  $\log(\text{FC}) \leq 0$  ou  $\log(\text{FC}) > 0$  et une p-valeur ajustée  $< 0,1$ . **(A)** Nombre de gènes différentiellement exprimés dans le striatum des souris WT et R6/1 après 2 et 5 jours d'apprentissage dans le labyrinthe en double-H (Comparaisons : WT 2J vs WT HC, WT 5J vs WT HC, R6/1 2J vs R6/1 HC, R6/1 5J vs R6/1 HC). **(B-C)** Diagrammes de Venn représentant les gènes sous-exprimés **(B)** et sur-exprimés **(C)** chez les WT et R6/1 après 2 jours et/ou 5 jours d'apprentissage.

## Résultats

**(D)** Les gènes sur-exprimés à 2 et/ou 5 jours chez les souris WT ou R6/1 sont classés en trois catégories selon leurs profils : les gènes exprimés uniquement à 2 jours et 5 jours sont respectivement désignés comme « précoces » et « tardifs » et les gènes exprimés à la fois à 2 et 5 jours sont désignés comme « maintenus ». **(E)** Exemples de gènes conjointement sous-exprimés à 2 et 5 jours après le processus de mémorisation chez les souris WT et R6/1. **(F)** Exemples de gènes maintenus dans le striatum des souris WT et R6/1. **(G)** Enrichissement fonctionnel des gènes précoces, maintenus et tardifs dans le striatum des souris WT, pour des termes associés aux processus biologiques (BP) et aux fonctions moléculaires (MF) de la base de données Gene Ontology. Aucun enrichissement fonctionnel significatif n'a été identifié pour les gènes précoces des souris WT pour des termes associés aux fonctions moléculaires (MF) de la base de données Gene Ontology. Les analyses fonctionnelles ont été réalisées avec la librairie R ClusterProfiler et celles réalisées avec DAVID sont présentées dans l'[Annexe 5](#) (p.205). **(H)** Volcano plots représentant les populations cellulaires (neurones ou cellules gliales) auxquelles appartiennent les gènes sur-exprimés chez les WT 2J et WT 5J par rapport aux WT HC (*Chi-deux, gènes neuronaux vs gènes gliaux : WT 2J vs WT HC  $p=2.10^{-11}$  ; WT 5J vs WT HC  $p=5.10^{-6}$* ). Les données du transcriptome spécifique des types cellulaires du striatum sont issues de l'étude de Merienne *et al.*, 2019. **(I)** Diagrammes de Venn représentant l'intersection des gènes sur-exprimés à 2J et 5J par rapport aux HC chez les souris WT et R6/1. **(J)** Pourcentage de gènes précoces, maintenus et tardifs chez les souris WT et R6/1. **(K)** Modélisation de l'évolution du transcriptome striatal des souris WT et R6/1 et des signatures fonctionnelles associées au cours du processus de mémorisation.

L'analyse fonctionnelle des gènes sur-exprimés chez les souris WT met en évidence un enrichissement en processus biologiques et fonctions moléculaires différent selon leur profil d'expression ([Figure 51G, Annexe 5](#)). La catégorie qui comprend les gènes « précoces » est enrichie en termes associés au développement et au métabolisme glucidique (homéostasie du glucose et des glucides) ([Figure 51G, Annexe 5](#)). Les gènes « maintenus » à 2 et 5 jours présentent un enrichissement en des termes relatifs à la transcription (activité des MAP kinases, ARN polymérase II, E-box), au remodelage de la chromatine (liaison à la chromatine), à la réponse au stress et au métabolisme lipidique (différenciation des cellules adipeuses) ([Figure 51G, Annexe 5](#)). Enfin, les gènes « tardifs » sont enrichis dans des processus de communication cellulaire et de plasticité (organisation des jonctions cellulaires, adhésion cellulaire, matrice extracellulaire) ([Figure 51G, Annexe 5](#)). Ces résultats indiquent qu'au cours du processus de mémorisation, plusieurs vagues d'expression de gènes associés à des processus biologiques différents sont observées chez les souris WT ([Figure 51K](#)).

Pour aller plus loin dans la caractérisation des changements transcriptionnels induits par la formation d'une mémoire procédurale, nous avons croisé les listes de gènes sur-exprimés dans le striatum des souris WT avec les listes de gènes spécifiquement exprimés dans les neurones (MSN) et les cellules gliales du striatum de souris, en utilisant la base de données récemment publiée (Merienne *et al.*, 2019). Nous avons observé que les changements transcriptionnels induits chez les souris WT 2J sont significativement enrichis en gènes spécifiquement exprimés dans les neurones ([Figure 51H](#)). De façon intéressante, ceux induits après 5 jours d'apprentissage sont à la fois des gènes spécifiques des neurones et des cellules

## Résultats

gliales ([Figure 51H](#)). Ces résultats mettent en évidence qu'au cours de l'apprentissage, des gènes fonctionnellement différents sont exprimés dynamiquement dans les neurones et les cellules gliales du striatum des souris WT ([Figure 51K](#)).

Chez les souris R6/1 en revanche, très peu de gènes ont une expression augmentée au cours de l'apprentissage ([Figure 51C](#)) et aucune signature fonctionnelle significative n'a été identifiée. Néanmoins, parmi les gènes striataux des souris R6/1 qui répondent à l'apprentissage, des IEGs sont induits, tels que *Fos*, *Fosb*, mais aussi *Egr1* bien que son expression soit globalement diminuée par rapport aux souris WT ([Figure 51E](#)). De même, plusieurs gènes associés à une réponse au stress (*Sgk1*, *Per2*, *Bcl6*) sont sur-exprimés dans le striatum des souris R6/1 après apprentissage ([Figure 51F](#)).

Par ailleurs, pour caractériser la dynamique d'induction des gènes du striatum des souris R6/1, nous avons analysé l'intersection des listes de gènes sur-exprimés à 2 jours chez les souris WT et R6/1 et 5 jours après apprentissage. 13 gènes sont exprimés à la fois chez les souris R6/1 2J et WT 2J ([Figure 51I](#)), soit 60% du nombre total de gènes sur-exprimés chez les souris R6/1 2J par rapport aux souris R6/1 HC. Bien que le nombre de gènes exprimés en réponse à l'apprentissage soit diminué chez les souris R6/1 (vs WT), la catégorie de gènes « précoces » apparaît de nature comparable à celle des souris WT. De façon intéressante, seuls 6 gènes sont conjointement exprimés dans le striatum des souris R6/1 5J et WT 5J ([Figure 51I](#)), soit 24% du nombre total de gènes sur-exprimés chez les souris R6/1 5J par rapport aux souris R6/1 HC. Ces analyses suggèrent que les gènes de la catégorie « tardifs » chez les souris WT sont peu retrouvés dans le striatum des souris R6/1 après 5 jours d'apprentissage.

De plus, l'analyse du pourcentage de gènes « précoces », « maintenus » et « tardifs » chez les souris WT et R6/1 révèle des différences de dynamique entre les deux génotypes ([Figure 51J](#)). En effet, la proportion de gènes « tardifs » est réduite chez les souris R6/1 par rapport aux souris WT et par conséquent, la proportion de gènes « précoces » et « maintenus » est plus importante chez les souris R6/1 en comparaison avec les souris WT. D'autre part, les IEGs tels que *Egr1* et *Fosb* sont classés dans la catégorie des gènes « maintenus » chez les WT, tandis qu'ils sont retrouvés parmi les gènes « précoces » chez les souris R6/1 ([Figure 51F](#)). La nature des gènes striataux induits chez les souris R6/1 lors de la formation de la mémoire procédurale semble relativement comparable à celle des souris WT au début de l'apprentissage, mais

## Résultats

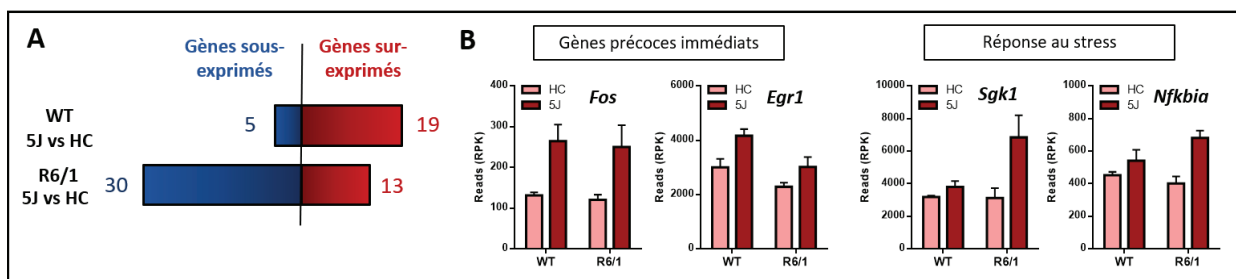
diffère ensuite, les gènes striataux exprimés à 5 jours n'étant plus de la même catégorie que ceux induits dans le striatum des souris WT.

L'ensemble de ces analyses suggère que la dynamique d'induction des gènes striataux, en réponse à l'apprentissage, est altérée chez les souris R6/1, quantitativement et qualitativement ([Figure 51K](#)).

### 1.3.2.c. [Induction du transcriptome de l'hippocampe chez les souris WT et R6/1](#)

L'analyse de la comparaison des gènes dérégulés chez les souris R6/1 par rapport aux souris WT a révélé une altération plus modérée de l'hippocampe par rapport au striatum Huntington. Nous avons examiné la réponse transcriptionnelle à l'apprentissage de l'hippocampe chez les souris WT et R6/1.

L'analyse de l'expression différentielle des gènes a montré que peu de gènes étaient dérégulés dans l'hippocampe des souris WT 5J et R6/1 5J par rapport aux souris WT HC et R6/1 HC ([Figure 52A](#)) et aucune signature fonctionnelle significative n'a été identifiée. Le transcriptome de l'hippocampe des souris WT et R6/1 semble donc peu modifié par la condition d'apprentissage. Ce résultat peut être interprété comme un faible engagement de l'hippocampe à 5 jours lors de la tâche de navigation dans le double-H. Cependant, les ARNs séquencés proviennent de l'hippocampe total (dorsal et ventral), le nombre réduit de gènes dérégulés pourrait également être expliqué par un masquage par l'hippocampe ventral d'un phénomène associé majoritairement à l'hippocampe dorsal.



**Figure 52 : Effets du processus de mémorisation sur le transcriptome de l'hippocampe des souris WT et R6/1.**

Les listes de gènes ont été sélectionnées avec un  $\log(\text{FC}) \leq 0$  ou  $\log(\text{FC}) > 0$  et une p-valeur ajustée  $< 0,1$ . **(A)** Nombre de gènes différentiellement exprimés dans l'hippocampe des souris WT et R6/1 après 5 jours d'apprentissage dans le labyrinthe en double-H (Comparaisons : WT 5J vs WT HC, R6/1 5J vs R6/1 HC). **(B)** Exemples de gènes sur-exprimés 5 jours après apprentissage dans l'hippocampe des souris WT et R6/1.



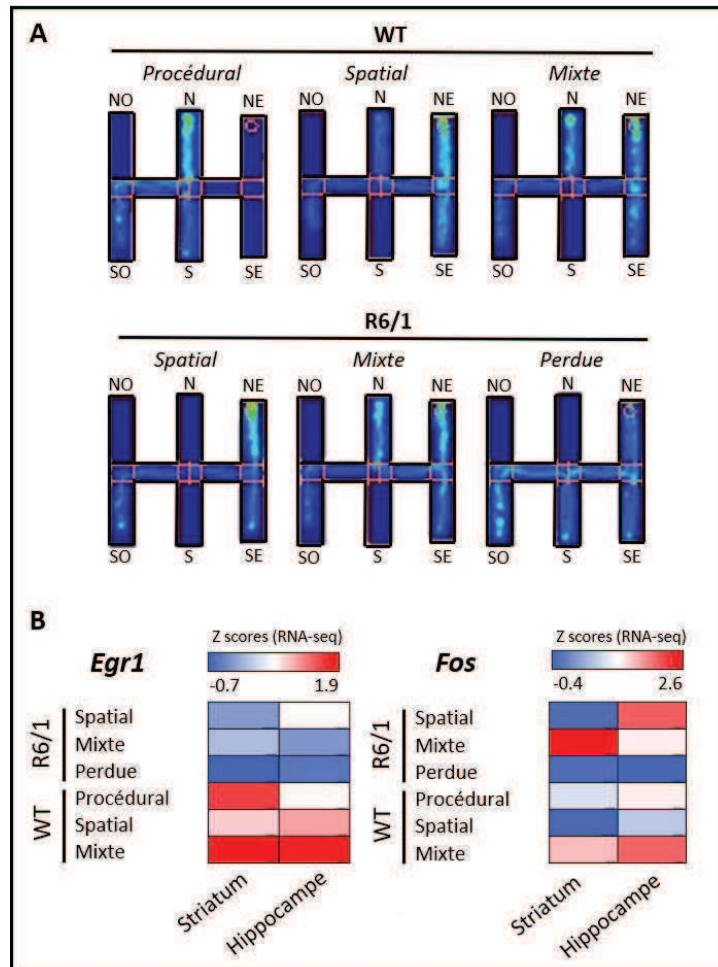
### 1.3.3. [Evaluation de l'engagement du striatum et de l'hippocampe des souris WT et R6/1 dans le labyrinthe en double-H](#)

Lors du test de rappel dans le labyrinthe en double-H, les animaux WT utilisent globalement une stratégie de recherche plus procédurale que les animaux R6/1. Or, une certaine variabilité intra-groupe de la réponse comportementale est observée ([Figure 53A](#)) et pourrait en partie expliquer la variabilité intra-groupe de la réponse transcriptionnelle ([Figure 49C,D](#)). En effet, les trois souris WT et les trois souris R6/1 utilisées pour l'analyse RNA-seq à 5 jours (à l'issue du test de rappel) ont, en réalité, développé différentes stratégies pour rechercher la plateforme, que nous avons classées en 4 catégories selon le temps passé dans les bras cibles ([Figure 53A](#)) : une stratégie procédurale (insistance dans le bras procédural), une stratégie spatiale (insistance dans le bras spatial), une stratégie mixte (insistance dans les deux bras cibles) ou une absence de stratégie -souris perdue- (pas d'insistance dans les bras cibles) ([Figure 53A](#)). Parmi les trois souris WT, l'une a développé une stratégie purement procédurale, la seconde une stratégie purement spatiale et la dernière une stratégie mixte ([Figure 53A](#)). Les souris R6/1 quant à elles, ont utilisé une stratégie purement spatiale, mixte ou n'ont pas développé de stratégie ([Figure 53A](#)). Cette variabilité intra-groupe de la réponse comportementale suggère que les niveaux d'engagement du striatum et de l'hippocampe sont variables entre les animaux d'un même groupe. Pour explorer cette hypothèse, nous avons examiné, pour chaque animal, les niveaux d'expression des IEGs *Egr1* et *Fos* dans le striatum et dans l'hippocampe, reflétant le degré d'activation de ces deux structures. Ces données ont ensuite été corrélées avec la réponse comportementale de chacune des souris.

Nos données suggèrent que l'utilisation d'une stratégie spatiale est corrélée à une expression plus importante de *Egr1* et *Fos* dans l'hippocampe des souris WT et R6/1 par rapport au striatum ([Figure 53B](#)), alors que l'utilisation d'une stratégie procédurale est associée à une augmentation de l'expression de *Egr1* dans le striatum des souris WT ([Figure 53B](#)). De même, la stratégie mixte corrèle avec une augmentation de l'expression d'*Egr1* et *Fos* dans le striatum et l'hippocampe des souris WT et R6/1 ([Figure 53B](#)), tandis qu'une absence de stratégie (souris perdue) chez les souris R6/1 est associée à une absence d'augmentation de l'expression de *Egr1* et *Fos* dans les deux structures cérébrales ([Figure 53B](#)). Bien que la puissance statistique de l'analyse nécessite d'être améliorée, ces résultats

## Résultats

suggèrent que le niveau relatif d'expression des IEGs dans le striatum et l'hippocampe des souris reflète la stratégie comportementale qu'elles ont utilisée.



**Figure 53 : Implication différentielle du striatum et de l'hippocampe des souris WT et R6/1 dans le labyrinthe en double-H.**

(A) Cartes de densités du temps passé par les souris dont le striatum a été séquencé dans les différentes zones du labyrinthe en double-H lors du test de rappel. Le comportement des souris lors du test de rappel a été classé dans différentes catégories en fonction du temps passé dans les bras cibles (Procédural et spatial), reflétant la stratégie d'apprentissage mise en jeu par les souris : la stratégie est mixte lorsque la souris insiste dans le bras procédural et spatial, la stratégie est procédurale ou spatiale quand la souris insiste respectivement dans le bras procédural ou spatial, la souris est perdue lorsqu'elle n'insiste dans aucun bras. (B) Corrélation entre l'expression des IEGs *Egr1* et *Fos* dans le striatum et l'hippocampe des souris WT et R6/1 et leur stratégie lors du test de rappel dans le labyrinthe en double-H (n=1/stratégie).

## 2. CARACTERISATION DE LA RELATION DE CAUSE A EFFET ENTRE LES ALTERATIONS COMPORTEMENTALES ET MOLECULAIRES DES SOURIS R6/1

Les résultats obtenus dans la première partie de ma thèse montrent que les réponses transcriptomiques striatales associées à une situation d'apprentissage sont anormales chez les souris R6/1. En particulier, la dynamique d'expression de nombreux gènes impliqués dans l'activation neuronale est altérée dans le striatum des souris R6/1 soumises à une tâche comportementale engageant cette structure.

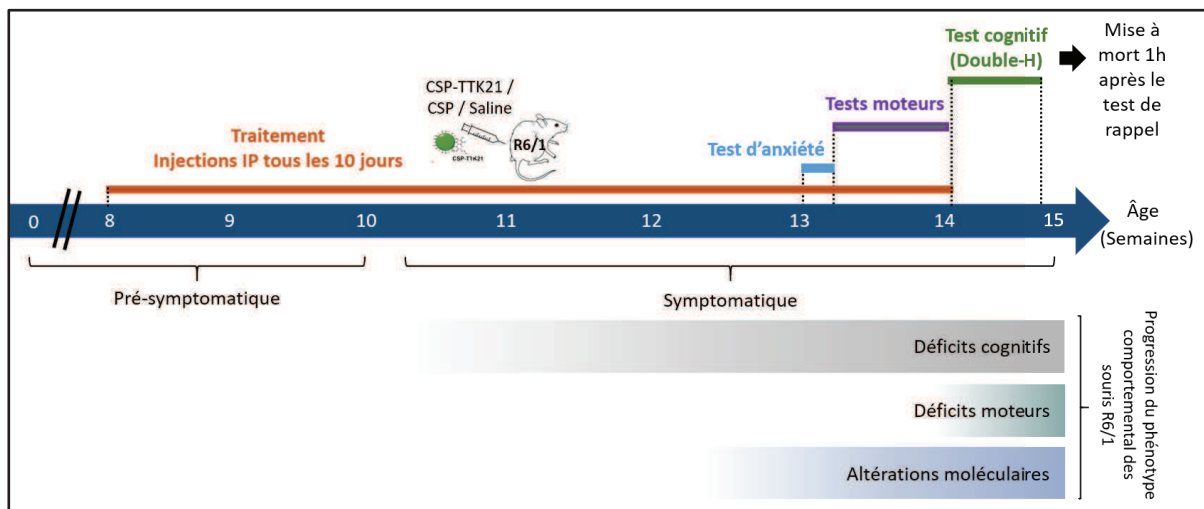
Au niveau épigénétique, l'acétylation de H3K27 est également impactée par la mutation Huntington. En effet, les résultats préliminaires du laboratoire indiquent que l'augmentation de H3K27ac, induite par une situation d'apprentissage et observée dans le striatum des souris WT au niveau de gènes impliqués dans la fonction neuronale, n'a pas lieu chez les souris R6/1 (Alcala-Vida & Lotz, *et al.*, *in prep*). De plus, les analyses réalisées au laboratoire et dans le cadre de ma thèse montrent que les défauts transcriptionnels et épigénétiques corrént avec un déficit de mémoire procédurale, ce qui suggère un lien causal.

Afin d'étudier si les altérations transcriptionnelles et épigénétiques du striatum Huntington sous-tendent le phénotype comportemental des souris R6/1, nous avons traité les souris R6/1 avec un activateur de l'histone acétyltransférase CBP, la molécule CSP-TTK21 (cf partie [3.2.3.b Les thérapies ciblant la protéotoxicité nucléaire de la huntingtine](#), p.71). En effet, en condition non pathologique, CBP acétyle notamment H3K27, une marque caractéristique des enhanceurs actifs, et dans le cadre de la MH, il a été montré que l'activité de CBP était altérée (cf partie [2.3.2 Interaction de la huntingtine mutée avec les acteurs de la transcription](#), p.51). De plus, la molécule CSP-TTK21 a montré un effet bénéfique au niveau comportemental, transcriptomique et épigénétique chez un modèle murin de la maladie d'Alzheimer (Chatterjee et al., 2018), appuyant l'hypothèse d'un bénéfice potentiel du traitement avec la molécule CSP-TK21 chez un modèle murin de la MH.

La deuxième partie de ma thèse est basée sur l'hypothèse qu'une augmentation de H3K27ac dans le striatum, *via* un traitement avec le composé CSP-TTK21, permettrait de corriger, du moins en partie, les signatures transcriptionnelles et épigénétiques « Huntington », et ainsi d'améliorer le phénotype comportemental des souris R6/1.

## 2.1. Evaluation de l'effet comportemental du traitement CSP-TTK21

Nous avons traité 4 groupes de souris pour cette étude. Deux groupes de souris R6/1 ont été entraînés dans le labyrinthe en double-H, l'un ayant été traité avec l'activateur TTK21 couplé à des nanoparticules de carbone (CSP), formant la molécule CSP-TTK21 (R6/1 CSP-TTK21) et l'autre uniquement avec CSP (R6/1 CSP). Deux groupes de souris WT ont été traités avec une solution saline ; les souris de l'un des groupes ont été testées dans le labyrinthe en double-H (WT Saline) et les autres sont restées dans leur cage d'élevage pendant toute la durée du test (WT HC).



**Figure 54** : Schéma de la conception de l'étude permettant d'évaluer l'effet de la molécule CSP-TTK21 sur le phénotype des souris R6/1.

Les souris ont été traitées par des injections intra-péritonéales de solution saline, CSP ou CSP-TTK21 de l'âge de 8 semaines jusqu'à 14 semaines. L'anxiété et le phénotype moteur des souris ont été évalués à l'âge de 13 semaines, puis la mémoire procédurale des souris a été testée à 14 semaines à l'aide du labyrinthe en double-H. Les tissus cérébraux des souris ont été collectés 1h après le test de rappel dans le double-H.

Nous avons débuté le traitement à un stade pré-symptomatique de la pathologie des souris R6/1 (8 semaines) jusqu'à un stade symptomatique précoce (14 semaines) (Figure 54), où nous avons décrit une altération de la mémoire procédurale des souris R6/1 dans le labyrinthe en double-H (cf partie [1.1.1.b Altération précoce de la mémoire procédurale des souris R6/1](#), p.115). Les molécules ont été administrées aux souris par des injections intra-péritonéales de solution saline (WT HC et WT Saline), de CSP (R6/1 CSP) et de CSP-TTK21 (R6/1 CSP-TTK21) à une dose de 20mg/kg (cf partie **2. Traitement pharmacologique des souris**, p.84). Ces injections ont été réalisées tous les 10 jours, un délai au bout duquel la molécule CSP-TTK21 est presque entièrement éliminée dans le cerveau (Chatterjee et al., 2013).

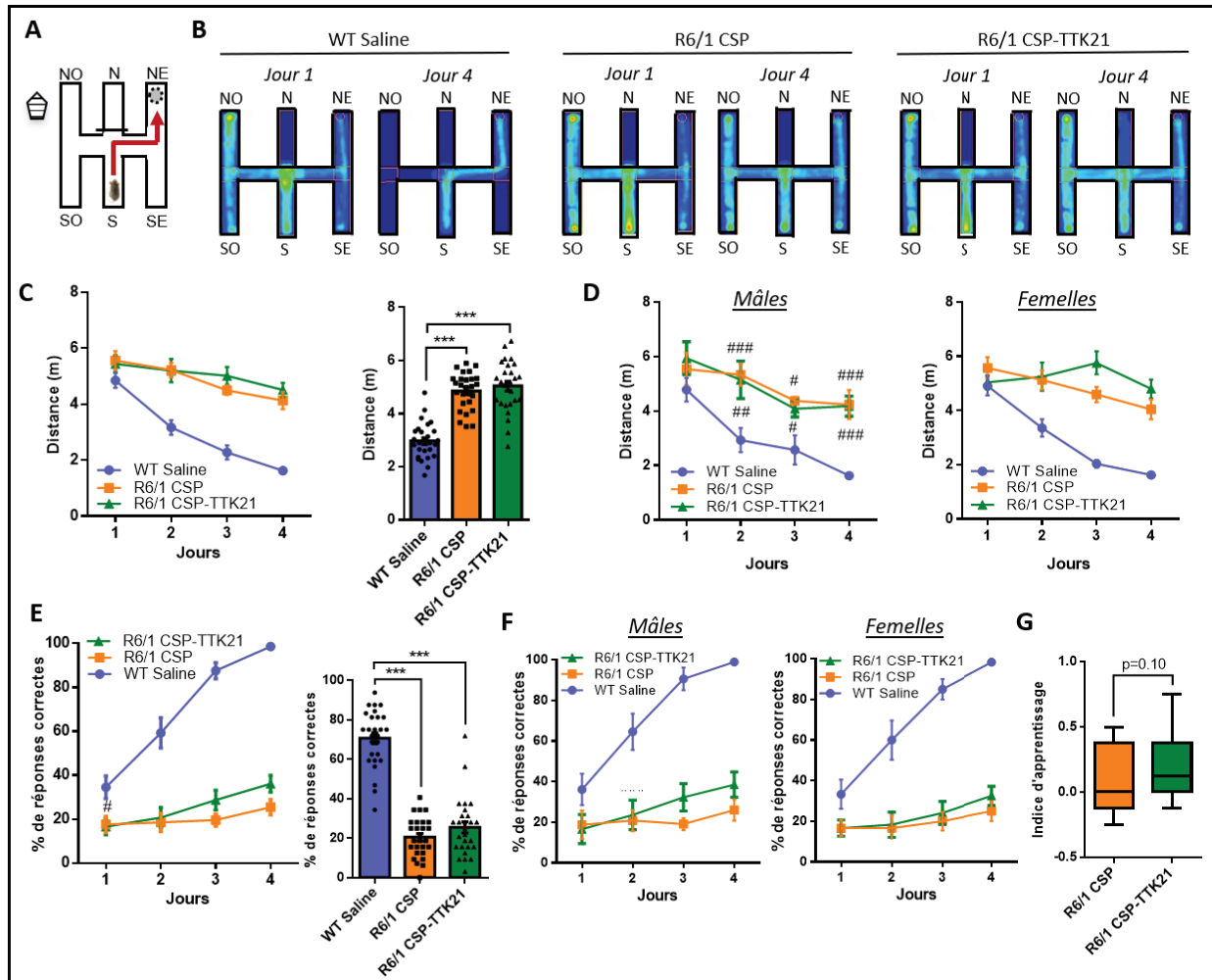
## Résultats

Pour évaluer l'effet du traitement sur le phénotype précoce des souris R6/1, les performances motrices et l'anxiété des souris ont été testées à l'âge de 13 semaines, puis la mémoire procédurale a été évaluée à l'aide du labyrinthe en double-H à l'âge de 14 semaines (Figure 54).

### 2.1.1. Amélioration partielle de la mémoire procédurale des souris R6/1 CSP- TTK21

Les souris ont été entraînées pendant 4 jours dans le double-H à retrouver la plateforme positionnée dans le bras NE à partir du bras S (Figure 55A,B). La baisse de la distance parcourue par les souris WT (Figure 55C) et l'augmentation de leur pourcentage de réponses correctes (Figure 55D) reflètent un apprentissage de la position de la plateforme (Figure 55B) (*ANOVA à deux facteurs et à mesures répétées : Distance, effet jours  $p < 0,0001$  ; Réponses correctes, effet jours  $p < 0,0001$* ). Les performances d'apprentissage des souris R6/1 CSP et R6/1 CSP-TTK21 sont altérées par rapport aux souris WT (Figure 55B,C,D) (*ANOVA à deux facteurs et à mesures répétées : Distance, interaction jours x génotype  $p = 0,0005$  ; Réponses correctes, interaction jours x génotype  $p < 0,0001$* ). Celles-ci ne diffèrent pas significativement entre les souris mâles et femelles (Figure 55D,F) (*ANOVA à deux facteurs et à mesures répétées pour l'effet sexe : Distance, WT Saline  $p = 0,98$ , R6/1 CSP  $p = 0,88$ , R6/1 CSP-TTK21  $p = 0,32$  ; Réponses correctes, WT Saline  $p = 0,55$ , R6/1 CSP  $p = 0,67$ , R6/1 CSP-TTK21  $p = 0,31$* ).

De plus, les variables (distance et pourcentage de réponses correctes) ne sont pas significativement différentes entre les souris R6/1 CSP-TTK21 et R6/1 CSP, malgré une légère augmentation du pourcentage de réponses correctes chez les souris R6/1 CSP-TTK21 lors du troisième et quatrième jour d'entraînement (*ANOVA à deux facteurs et à mesures répétées, comparaisons multiples avec le test de Tukey :  $p = 0,26$  pour le troisième jour,  $p = 0,16$  pour le quatrième jour*) (Figure 55E,F). L'indice d'apprentissage tend à être amélioré chez les souris R6/1 CSP-TTK21 par rapport aux souris R6/1 CSP (Figure 55G) (*Test de Mann Withney :  $p = 0,10$* ).



**Figure 55 : Evaluation de l'effet du traitement CSP-TTK21 sur les performances d'apprentissage des souris R6/1.**

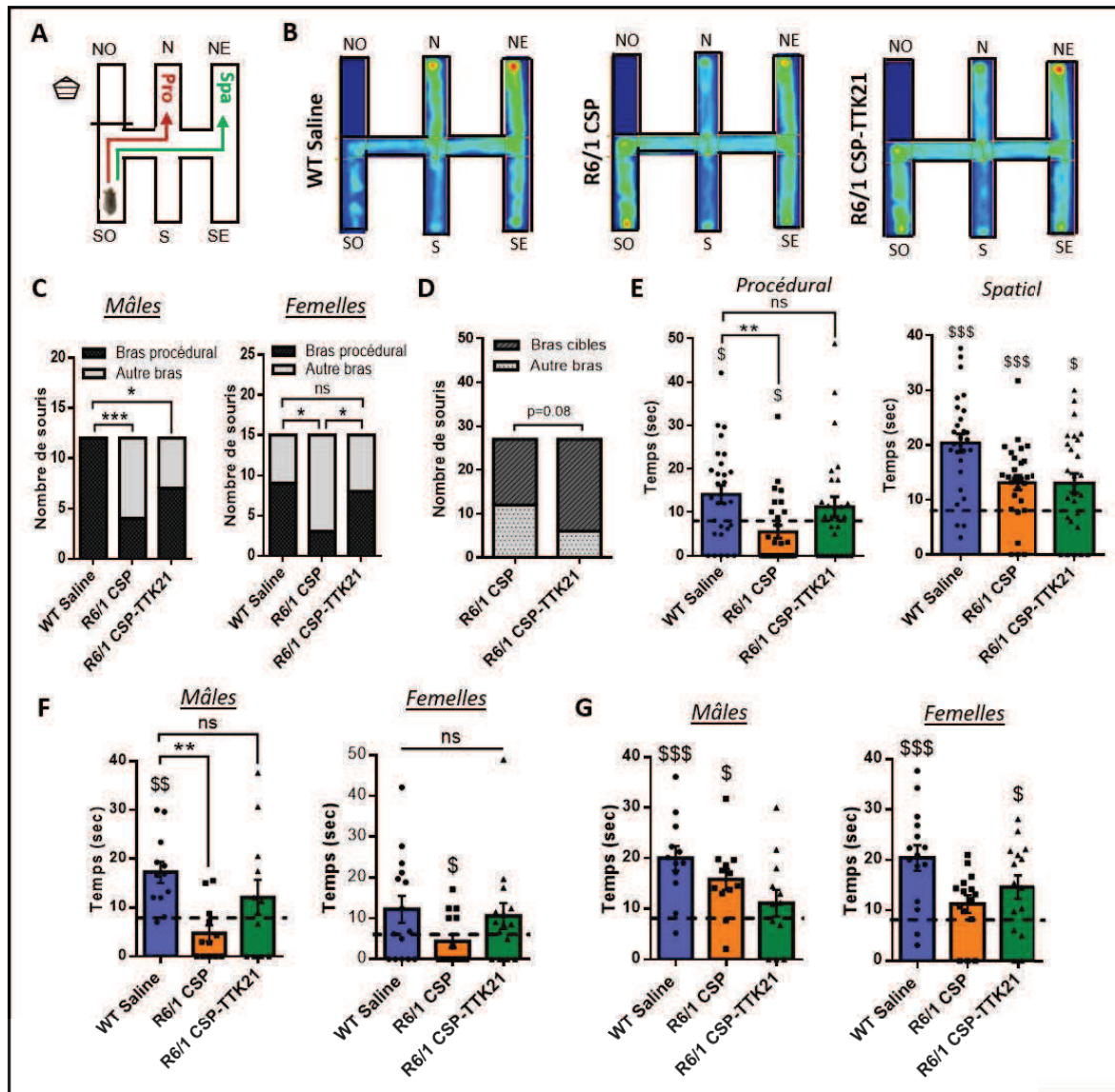
(A) La mémoire procédurale des souris a été évaluée en entraînant les souris à trouver la plateforme positionnée dans le bras NE à partir du bras S. (B) Cartes de densités représentant le temps passé par les souris dans les différentes zones du dispositif, lors du premier et quatrième jour d'apprentissage. (C) Distance parcourue par les souris pendant les 4 jours d'acquisition -à gauche- (ANOVA à deux facteurs à mesures répétées : effet jours  $F(3, 234)=26,31$   $p<0,0001$  ; effet génotype  $F(2, 78)=56,54$   $p<0,0001$  ; interaction jours x génotype  $F(6, 234)=4,144$   $p=0,0006$ ). Moyenne de la distance parcourue sur les 4 jours -à droite- (ANOVA à un facteur :  $F(2, 78)=56,54$ ,  $p<0,0001$ , comparaisons multiples : Test de Tukey). (D) Distance parcourue par les souris mâles et femelles individuellement (ANOVA à deux facteurs à mesures répétées : Mâles, effet jours  $F(3, 99)=13,21$   $p<0,0001$ , effet génotype  $F(2, 33)=17,45$   $p<0,0001$ , interaction jours x génotype  $F(6, 99)=1,022$   $p=0,41$ , comparaisons multiples avec le test de Tukey ; Femelles, effet jours  $F(3, 126)=13,88$   $p<0,0001$ , effet génotype  $F(2, 42)=43,13$   $p<0,0001$ , interaction jours x génotype  $F(6, 126)=5,829$   $p<0,0001$ ). (E) Pourcentage de réponses correctes des souris pendant les 4 jours d'acquisition -à gauche- (ANOVA à deux facteurs à mesures répétées : effet jours  $F(3, 234)=37,05$   $p<0,0001$  ; effet génotype  $F(2, 78)=119,4$   $p<0,0001$  ; interaction jours x génotype  $F(6, 234)=12,86$   $p<0,0001$ ). Moyenne du pourcentage de réponses correctes sur les 4 jours -à droite- (Test de Kruskal-Wallis, comparaisons multiples avec le test de Dunn :  $k=51,38$   $p<0,0001$ ). (F) Pourcentage de réponses correctes des souris mâles et femelles individuellement (ANOVA à deux facteurs à mesures répétées : Mâles, effet jours  $F(3, 99)=16,81$   $p<0,0001$ , effet génotype  $F(2, 33)=51,02$   $p<0,0001$ , interaction jours x génotype  $F(6, 99)=5,796$   $p<0,0001$  ; Femelles, effet jours  $F(3, 126)=18,87$   $p<0,0001$ , effet génotype  $F(2, 42)=66,25$   $p<0,0001$ , interaction jours x génotype  $F(6, 126)=7,137$   $p<0,0001$ ). (G) Indice d'apprentissage des souris R6/1 CSP et R6/1 CSP-TTK21 (Pourcentage de réponses correctes du jour 4 soustraites à celui du jour 1) (Test de Mann-Whitney :  $U=272$ ,  $p=0,10$ ). Les données sont représentées par la moyenne  $\pm$  SEM. Effectifs :  $n=27$ /groupe (12♂, 15♀). Les données individuelles des souris mâles et femelles ne diffèrent pas statistiquement (ANOVA à deux facteurs à mesures répétées, effet sexe : Distance, WT Saline  $p=0,98$ , R6/1 CSP  $p=0,88$ , R6/1 CSP-TTK21  $p=0,32$  ; Réponses correctes, WT Saline  $p=0,55$ , R6/1 CSP  $p=0,67$ , R6/1 CSP-TTK21  $p=0,31$ ). Statistiques : \*\*\*  $p<0,005$  entre les groupes ; #  $p<0,05$  ##  $p<0,01$  et ###  $p<0,005$  R6/1 CSP et CSP-TTK21 vs WT Saline.

## Résultats

Lors du test de rappel, la plateforme est retirée et les souris sont lâchées dans le bras SO ([Figure 56A](#)). Comme décrit dans la première partie, chez les souris WT Saline, 100% et 60% des souris mâles et femelles respectivement (12/12 Mâles ; 9/15 Femelles) visitent le bras procédural en première intention ([Figure 56C](#)). Elles y passent un temps significativement supérieur au hasard ([Figure 56E,F](#)), indiquant l'utilisation d'une stratégie procédurale en première intention pour rechercher la plateforme.

Les souris R6/1 CSP visitent significativement moins le bras procédural en première intention (33% soit 4/12 Mâles ; 20% soit 3/15 Femelles) ([Figure 56C](#)). Elles y passent un temps significativement inférieur au hasard et aux souris WT ([Figure 56E,F](#)), indiquant une altération de leur mémoire procédurale. En revanche, les souris R6/1 CSP passent significativement plus de temps que le hasard dans le bras spatial ([Figure 56E,G](#)) suggérant l'utilisation préférentielle d'une stratégie spatiale.

De façon intéressante, significativement plus de souris R6/1 traitées par la molécule CSP-TTK21 visitent le bras procédural en première intention par rapport aux R6/1 CSP ([Figure 56C](#)) (58%, soit 7/12 Mâles ; 53%, soit 8/15 Femelles). De plus, elles passent un temps non différent de celui des souris WT Saline dans le bras procédural contrairement aux souris R6/1 CSP ([Figure 56E,F](#)). Ces résultats mettent en évidence que le traitement CSP-TTK21 favorise l'utilisation d'une stratégie procédurale par les souris R6/1, suggérant une amélioration partielle de la mémoire procédurale des souris R6/1 âgées de 14 semaines.



**Figure 56 :** Evaluation de l'effet du traitement CSP-TTK21 sur le déficit de mémoire procédurale des souris R6/1.

(A) La mémoire procédurale des souris a été évaluée en entraînant les souris à trouver la plateforme positionnée dans le bras NE à partir du bras S. Le test de rappel est réalisé en retirant la plateforme et en lâchant les souris dans le bras SO. Les bras cibles N et NE sont désignés comme bras procédural (Pro) et spatial (Spa). (B) Cartes de densités du temps passé par les souris dans les différentes zones du dispositif lors du test de rappel. (C) Nombre de souris, mâles et femelles, visitant le bras procédural en première intention lors du test de rappel dans le labyrinthe en double-H (*Chi-deux, bras procédural vs autres bras : Mâles, R6/1 CSP vs WT Saline  $\chi^2=3,46$   $p=0,0005$ , R6/1 CSP-TTK21 vs WT Saline  $\chi^2=2,51$   $p=0,012$ , R6/1 CSP-TTK21 vs R6/1 CSP  $\chi^2=1,22$   $p=0,21$ ; Femelles, R6/1 CSP vs WT Saline  $\chi^2=2,23$   $p=0,025$ , R6/1 CSP-TTK21 vs WT Saline  $\chi^2=0,368$   $p=0,71$ , R6/1 CSP-TTK21 vs R6/1 CSP  $\chi^2=1,894$   $p=0,058$ ). Le nombre de souris WT visitant le bras procédural en première intention diffère entre les mâles et les femelles (*Chi-deux bras procédural vs autres bras, mâles vs femelles : WT Saline  $p=0,01$ , R6/1 CSP  $p=0,43$ , R6/1 CSP-TTK21  $p=0,79$ ). (D) Nombre de souris perdues lors du test de rappel (*Chi-deux, bras cibles vs autres bras : R6/1 CSP-TTK21 vs R6/1 CSP  $\chi^2=1,732$   $p=0,083$ ). (E) Temps passé par les souris dans les bras cibles pendant le test de rappel dans le double-H, bras procédural (*Test de Kruskal-Wallis, comparaisons multiples avec le test de Dunn :  $k=13,06$   $p=0,0015$ ) et spatial (*Test de Kruskal-Wallis, comparaisons multiples avec le test de Dunn :  $k=11,10$   $p=0,0039$ ). Le temps passé dans les bras cibles a été comparé au hasard (8,5 secondes) (*Test de Wilcoxon : Procédural, WT  $p=0,011$ , R6/1 CSP  $p=0,002$ , R6/1 CSP-TTK21  $p=0,40$  ; Spatial, WT  $p<0,0001$ , R6/1 CSP  $p=0,003$ , R6/1 CSP-TTK21  $p=0,019$ ). (F) Temps passé par les souris, mâles et femelles, dans le bras procédural (*Test de Kruskal-Wallis : Mâles,  $k=10,63$   $p=0,004$  ; Femelles,  $k=4,18$   $p=0,12$ ). (G) Temps passé par les souris, mâles et femelles, dans le bras spatial (*Test de Kruskal-Wallis : Mâles,  $k=7,92$   $p=0,19$  ; Femelles,  $k=7,35$   $p=0,25$ ). Le temps passé dans les bras cibles a été comparé au hasard (*Test de Wilcoxon : Procédural Mâles, WT Saline  $p=0,006$ , R6/1 CSP  $p=0,21$ , R6/1 CSP-TTK21  $p=0,41$  ; Procédural Femelles, WT Saline  $p=0,30$ , R6/1 CSP  $p=0,04$ , CSP-TTK21  $p=0,74$  ; Spatial Mâles, WT Saline  $p=0,0007$ , R6/1 CSP  $p=0,01$ , R6/1 CSP-TTK21  $p=0,37$  ; Spatial Femelles, WT Saline  $p=0,0009$ , R6/1 CSP  $p=0,20$ , R6/1 CSP-TTK21  $p=0,02$ ). Les données sont représentées par la moyenne  $\pm$  SEM. Effectifs :  $n=27$ /groupe (12♂, 15♀). Les performances des souris mâles et femelles ne diffèrent pas statistiquement pour la latence d'accès aux bras cibles (*Test de Mann-Withney, effet sexe : Procédural, WT Saline  $U=67$   $p=0,27$ , R6/1 CSP  $U=73$   $p=0,40$  ; R6/1 CSP-TTK21  $U=75$   $p=0,47$  ; Spatial,**********



## Résultats

WT Saline  $U=52$   $p=0,068$ , R6/1 CSP  $U=82$   $p=0,70$ , R6/1 CSP-TTK21  $U=54$   $p=0,08$ ) ni pour le temps passé dans les bras cibles (Test de Mann Withney, effet sexe : Procédural, WT Saline  $U=62$   $p=0,18$ , R6/1 CSP  $U=81$   $p=0,66$ , R6/1 CSP-TTK21  $U=83$   $p=0,76$  ; Spatial, WT Saline  $U=82$   $p=0,70$ , R6/1 CSP  $U=57$   $p=0,11$ , R6/1 CSP-TTK21  $U=69$   $p=0,32$ ). Statistiques : \*  $p<0,05$ , \*\*  $p<0,01$  et \*\*\*  $p<0,005$  entre les groupes ; #  $p<0,05$  et ###  $p<0,005$  R6/1 CSP et CSP-TTK21 vs WT Saline ; \$  $p<0,05$  et \$\$\$  $p<0,005$  groupes vs hasard.

### 2.1.2. Effet de CSP-TTK21 sur le phénotype moteur des souris R6/1

Nous avons ensuite évalué si le traitement avec la molécule CSP-TTK21 avait un effet sur le phénotype moteur des souris R6/1.

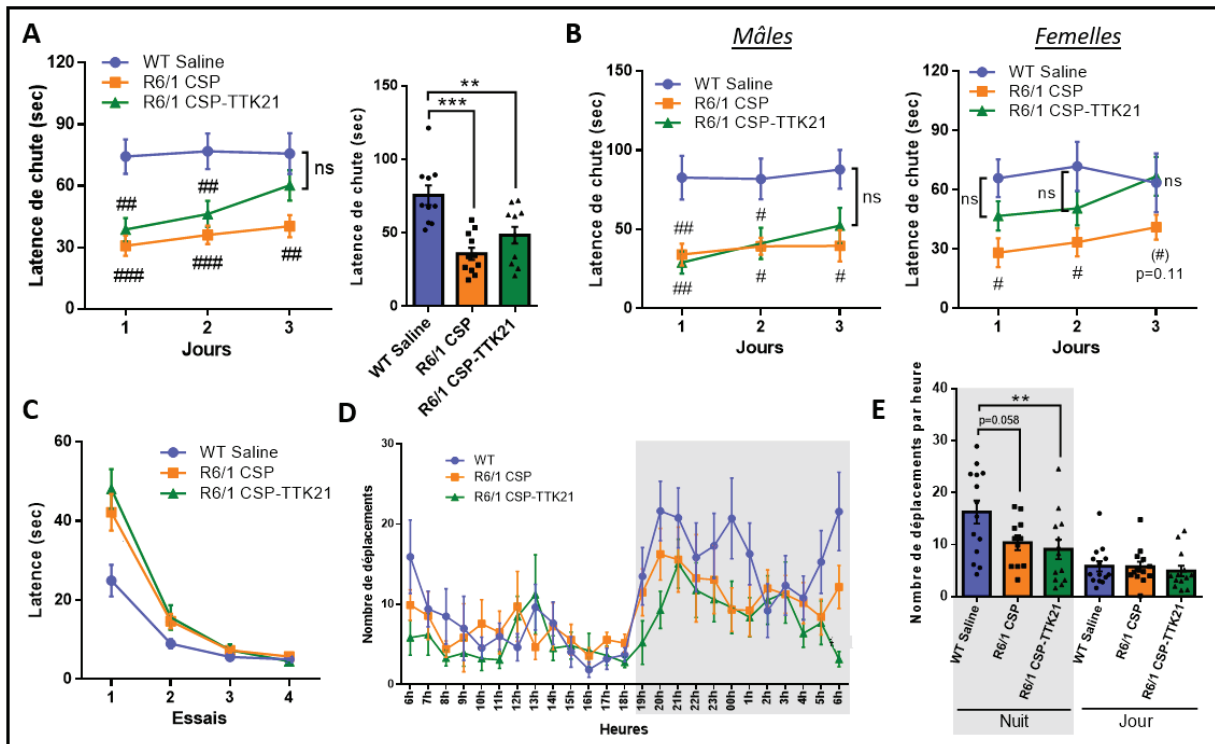
L'effet du traitement sur la coordination motrice des souris a été mesuré à l'aide du test de la barre. La latence pour traverser la barre est significativement augmentée chez les souris R6/1 CSP et R6/1 CSP-TTK21 par rapport aux souris WT Saline lors du premier essai, mais celle-ci est diminuée au cours des trois essais suivants et ne diffère pas des souris WT Saline (Figure 57C) (ANOVA à deux facteurs et à mesures répétées, comparaisons multiples avec le test de Sidak : 1<sup>er</sup> essai, R6/1 CSP et R6/1 CSP-TTK21 vs WT Saline  $p<0,0001$  ; 2<sup>ème</sup> essai, R6/1 CSP vs WT Saline  $p=0,79$ , R6/1 CSP-TTK21 vs WT Saline  $p=0,58$ ). Comme décrit dans la première partie (cf partie **1.1.3. Evaluation des performances motrices des souris R6/1**, p.123), les performances des souris R6/1 ne sont pas altérées dans le test de la barre, et le traitement CSP-TTK21 n'a pas d'effet sur celles-ci.

La coordination motrice des souris a été évaluée à l'aide du rotarod. Globalement, la latence de chute moyenne des souris R6/1 CSP est significativement diminuée par rapport aux souris WT Saline, tout comme celle des souris R6/1 CSP-TTK21 (Figure 57A,B). L'analyse des performances des souris au cours des 3 jours d'apprentissage, met en évidence que la latence de chute est significativement diminuée chez les souris R6/1 CSP et R6/1 CSP-TTK21 au cours des deux premiers jours d'apprentissage. De façon intéressante, celle-ci ne diffère pas entre les souris R6/1 CSP-TTK21 et WT Saline le troisième jour d'apprentissage (Figure 57A,B) (ANOVA à deux facteurs et à mesures répétées, comparaisons multiples avec le test de Tukey : R6/1 CSP-TTK21 vs WT Saline  $p=0,26$  ; R6/1 CSP vs WT Saline  $p=0,001$  ; R6/1 CSP-TTK21 vs R6/1 CSP  $p=0,10$ ). Ces résultats suggèrent une amélioration modérée des performances des souris R6/1 traitées par la molécule CSP-TTK21 dans le rotarod.

Enfin, l'activité locomotrice spontanée des souris a été mesurée sur 24h par actographie. Globalement, le rythme circadien des souris est régulier avec une augmentation

## Résultats

de l'activité globale pendant la nuit par rapport à la journée (Figure 57D). L'activité nocturne moyenne est diminuée chez les souris R6/1 CSP et CSP-TTK21 par rapport aux souris WT Saline (Figure 57E) (ANOVA à un facteur, test de Tukey : R6/1 CSP vs WT Saline  $p=0,058$ , R6/1 CSP-TTK21 vs WT Saline  $p=0,007$  ; R6/1 CSP-TTK21 vs R6/1 CSP  $p=0,99$ ). Le traitement CSP-TTK21 ne permet donc pas une amélioration de l'activité locomotrice spontanée des souris R6/1 à 14 semaines. En résumé, la molécule CSP-TTK21 ne modifie pas de façon majeure la fonction motrice des souris R6/1.



**Figure 57 : Evaluation de l'effet du traitement CSP-TTK21 sur les performances motrices des souris R6/1.**

(A-C) Evaluation de l'effet du traitement CSP-TTK21 sur la coordination motrice des souris R6/1 avec le rotarod (A-B) et le test de la barre (C). (A) Latence de chute des souris au cours des 3 jours d'apprentissage dans le rotarod -à gauche- (ANOVA à deux facteurs et à mesures répétées : effet jours  $F(2, 58)=3,545$   $p=0,035$  ; effet génotype  $F(2, 29)=13,17$   $p<0,0001$  ; interaction jours x génotype  $F(4, 58)=1,113$   $p=0,35$  ; Comparaisons multiples avec le test de Sidak). Moyenne de la latence de chute des souris sur les 3 jours d'entraînement -à droite- (ANOVA à un facteur,  $F(2, 29)=13,16$   $p<0,0001$  ; Comparaisons multiples avec le test de Tukey). (B) Latence de chute des souris mâles et femelles dans le rotarod (ANOVA à deux facteurs et à mesures répétées : Mâles, effet jours  $F(2, 24)=2,374$   $p=0,11$ , effet génotype  $F(2, 12)=8,57$   $p=0,0049$ , interaction jours x génotype  $F(4, 24)=0,74$   $p=0,57$  ; Femelles, effet jours  $F(2, 28)=1,22$   $p=0,30$ , effet génotype  $F(2, 14)=6,21$   $p=0,011$ , interaction jours x génotype  $F(4, 28)=0,71$ ,  $p=0,58$  ; Comparaisons multiples avec le test de Sidak). (C) Latence nécessaire aux souris pour traverser la barre et rejoindre leur cage (ANOVA à deux facteurs et à mesures répétées : effet essais  $F(3, 153)=146,5$   $p<0,0001$  ; effet génotype  $F(2, 51)=5,606$   $p=0,006$  ; interaction essais x génotype  $F(6, 153)=6,208$   $p<0,0001$ ). (D-E) Evaluation de l'effet de la molécule CSP-TTK21 sur l'activité locomotrice spontanée des souris R6/1 en actographie. (D) Représentation du nombre de déplacements des souris dans leur cage, chaque heure pendant 24h (ANOVA à deux facteurs et à mesures répétées : effet jours  $F(24, 864)=6,414$   $p<0,0001$  ; effet génotype  $F(2, 36)=2,142$   $p=0,13$  ; interaction jours x génotype  $F(70, 1260)=1,245$   $p=0,087$ ). (E) Nombre moyen de déplacements des souris par heure durant la journée (7h-19h) et la nuit (19h-7h) (ANOVA à un facteur :  $F(5, 74)=7,006$ ,  $p<0,0001$  ; Comparaisons multiples avec le test de Tukey). Les données sont représentées par la moyenne  $\pm$  SEM. Effectifs : Rotarod,  $n=11$  par groupe (5 ♂, 6 ♀) ; Test de la barre,  $n=18$  par groupe (WT 10 ♂, 8 ♀ ; R6/1 CSP 10 ♂, 8 ♀ ; R6/1 CSP-TTK21 9 ♂, 9 ♀) ; Actographie,  $n=14$  par groupe (8 ♂, 6 ♀). L'ensemble des données des souris mâles et femelles sont présentées dans l'Annexe 6 (p.206). Statistiques : \*\*  $p<0,01$  et \*\*\*  $p<0,005$  entre les groupes ; ##  $p<0,01$  et ###  $p<0,005$  R6/1 CSP-TTK21 vs WT Saline.

### 2.1.3. Evaluation de l'effet de CSP-TTK21 sur le phénotype global des souris R6/1

Pour identifier d'éventuels effets secondaires du traitement avec la molécule CSP-TTK21 sur le phénotype et le bien-être général des souris R6/1, nous avons évalué leur niveau d'anxiété et l'évolution de leur poids au cours des semaines de traitement.

#### 2.1.3.a. Absence d'effet sur l'anxiété des souris R6/1

L'anxiété des souris a été mesurée avec le test de transition clair/obscur (cf partie **3.3. Evaluation de l'anxiété**, p.95). Au début du test, les souris sont déposées dans le compartiment sombre. Leur anxiété est évaluée en relevant le nombre d'entrées dans le compartiment éclairé, particulièrement aversif, et le temps cumulé passé à l'intérieur.

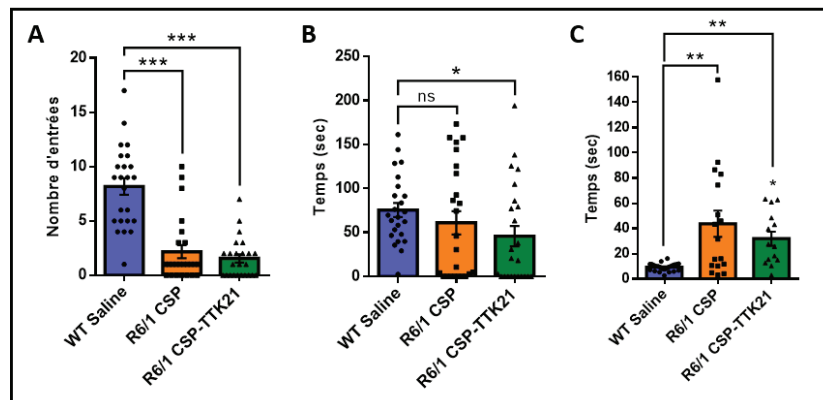
Nous avons observé que les souris WT Saline font plusieurs entrées dans la boîte éclairée (Figure 58A), et y passent un temps total d'environ 70 secondes sur les 5 minutes de test (Figure 58B). L'analyse de la durée moyenne d'une entrée dans le compartiment éclairé (ratio entre le temps cumulé et le nombre d'entrées dans la boîte) révèle que les souris WT Saline passent en moyenne 10 secondes dans la boîte éclairée à chaque entrée. Leur comportement consiste donc à y faire plusieurs entrées de courte durée.

Les souris R6/1 CSP font significativement moins d'entrées dans la boîte éclairée que les souris WT Saline (Figure 58A), ce qui pourrait refléter un comportement davantage anxieux. Or, le temps passé par les souris R6/1 CSP dans le compartiment éclairé ne diffère pas de celui des souris WT (Figure 58B). De plus, les souris R6/1 CSP passent un temps significativement plus élevé par entrée dans le compartiment éclairé par rapport aux souris WT Saline (Figure 58C). Ainsi, la réduction du nombre d'entrées des souris R6/1 CSP ne reflèterait pas un comportement anxieux, mais plus probablement une baisse de la motivation qui se traduirait par une diminution de l'activité locomotrice, comme nous l'avons observé en actographie (Figure 57E).

Les souris R6/1 CSP-TTK21 présentent un comportement similaire aux souris R6/1 CSP. Par rapport aux souris WT Saline, elles entrent également significativement moins dans la boîte éclairée (Figure 58A) mais y passent autant de temps (Figure 58B).

## Résultats

Les souris traitées avec la molécule CSP-TTK21 ne paraissent donc pas plus anxieuses que les souris WT Saline ou R6/1 CSP. En revanche, le traitement ne permet pas de normaliser le comportement apathique des souris R6/1 que nous avons observé avec le test de transition clair/obscur.



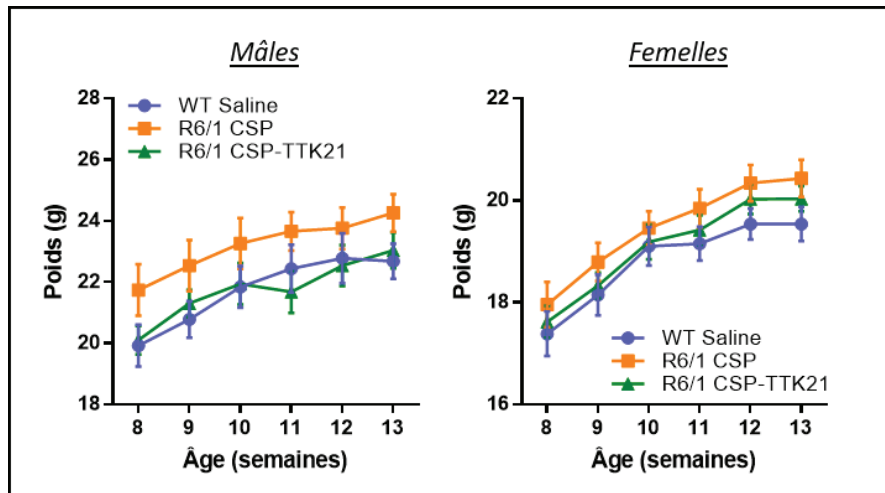
**Figure 58** : Evaluation de l'anxiété des souris WT Saline, R6/1 CSP et R6/1 CSP-TTK21.

L'anxiété des souris a été mesurée avec le test de transition clair/obscur, en relevant (A) le nombre d'entrées effectuées dans le compartiment éclairé (*Test de Kruskal-Wallis :  $k=35,61$   $p<0,0001$  ; comparaisons multiples avec le test de Dunn*) et (B) le temps total cumulé passé par les souris dans le compartiment éclairé (*Test de Kruskal-Wallis :  $k=5,68$ ,  $p=0,058$  ; Comparaisons multiples avec le test de Dunn*). (C) Temps moyen passé par entrée dans le compartiment éclairé (Ratio : Temps total / Nombre d'entrées) (*Test de Kruskal-Wallis :  $k=17,38$ ,  $p=0,0002$  ; Comparaisons multiples avec le test de Dunn*). Les données sont représentées par la moyenne  $\pm$  SEM. Effectifs :  $n=23$  par groupe (13 ♂, 11 ♀). Les performances des souris mâles et femelles sont présentées dans l'Annexe 7 (p.207). Statistiques : \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$  \*\*\* $p<0,005$  entre les groupes.

### 2.1.3.b. Absence d'effet sur le poids des souris R6/1

Le poids des souris WT Saline, R6/1 CSP et R6/1 CSP-TTK21 a été relevé au cours des semaines de traitement (7 semaines).

Le poids des souris augmente au fil des semaines et ne diffère pas entre les souris WT Saline, R6/1 CSP et R6/1 CSP-TTK21 (Figure 59) (*ANOVA à mesures répétées,  $p=0,38$  pour l'effet génotype*). Ces observations indiquent l'absence d'effet négatif du traitement sur la prise de poids des souris R6/1, comme cela a été démontré dans une étude précédente avec un modèle murin de la maladie d'Alzheimer (Chatterjee et al., 2018).



**Figure 59** : Effet du traitement CSP-TTK21 sur le poids des souris R6/1.

Courbe de l'évolution du poids des souris WT Saline, R6/1 CSP et R6/1 CSP-TTK21 au cours des semaines de traitement (ANOVA à deux facteurs et à mesures répétées : effet semaines  $F(5, 310)=99,34$   $p<0,0001$  ; effet génotype  $F(2, 62)=0,968$   $p=0,38$  ; interaction semaines  $\times$  génotype  $F(10, 310)=1,628$   $p=0,097$  ; Comparaisons multiples avec le test de Sidak). Les données sont représentées par la moyenne  $\pm$  SEM. Effectifs :  $n=24$  par groupe (13♂, 11♀).

## 2.2. Evaluation des conséquences fonctionnelles du traitement CSP-TTK21

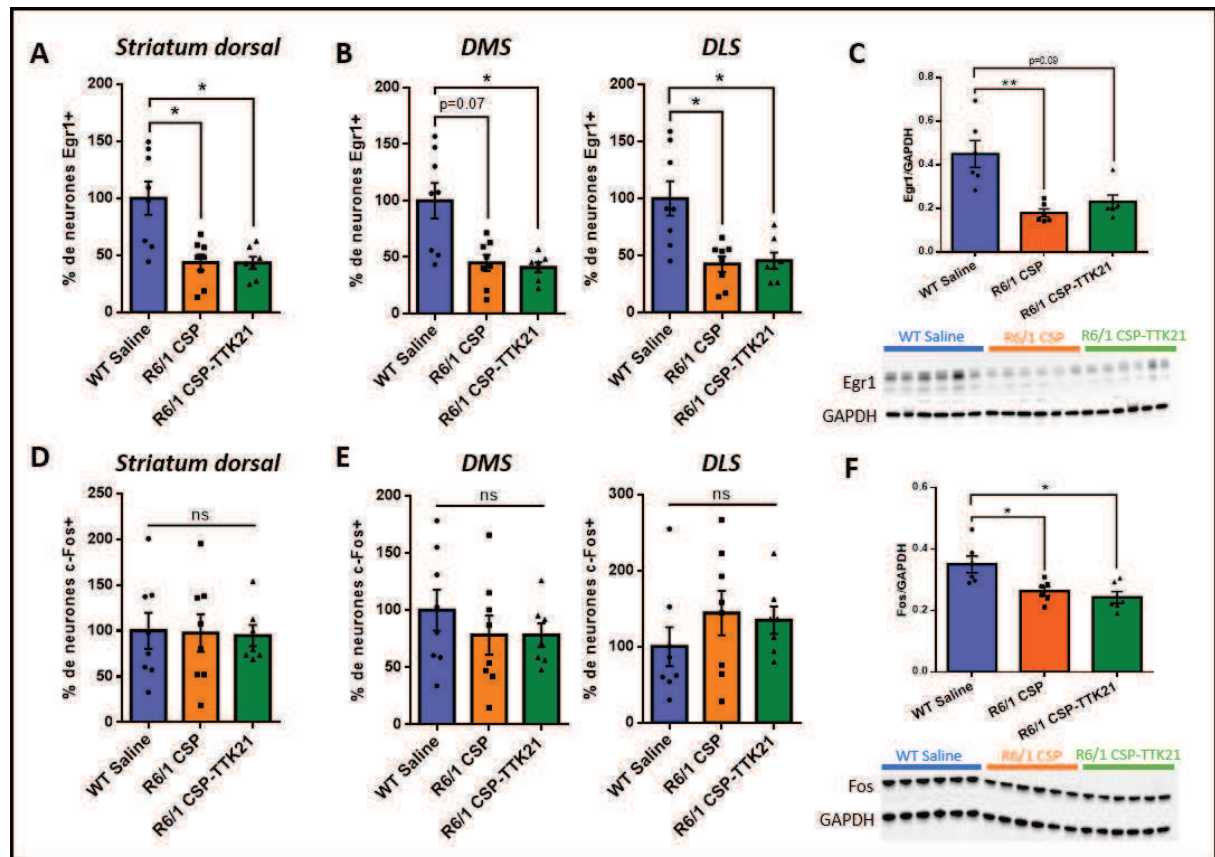
Le traitement avec la molécule CSP-TTK21 permettant une amélioration partielle du déficit de mémoire procédurale des souris R6/1 âgées de 14 semaines, nous nous sommes demandé si cet effet comportemental était associé à des changements fonctionnels dans le striatum des souris R6/1.

### 2.2.1. [Effet de la molécule CSP-TTK21 sur l'expression des protéines Egr1 et Fos dans le striatum des souris R6/1](#)

Dans la première partie, nous avons observé que le déficit de mémoire procédurale des souris R6/1 était corrélé à une baisse de l'expression de la protéine Egr1 dans leur striatum, indiquant une altération du mécanisme d'activation neuronale du striatum Huntington en réponse au processus de mémorisation. L'expression de la protéine Fos en revanche était préservée chez les souris R6/1 âgées de 14 semaines. Nous avons donc évalué, par comptage neuronal, si le traitement des souris R6/1 avec la molécule CSP-TTK21 permettait de corriger l'expression striatale de la protéine Egr1.

## Résultats

Egr1 est significativement diminuée dans le striatum dorsal (Figure 60A), DMS et DLS (Figure 60B), des souris R6/1 CSP et R6/1 CSP-TTK21 par rapport aux souris WT Saline. L'expression de la protéine Fos est comparable dans le striatum dorsal (Figure 60D), DMS et DLS (Figure 60E), pour l'ensemble des groupes. La molécule CSP-TTK21 n'a donc pas d'effet sur l'expression des protéines Egr1 et Fos dans le striatum des souris R6/1.



**Figure 60 : Evaluation de l'effet du traitement CSP-TTK21 sur l'expression des protéines Egr1 et Fos dans le striatum des souris R6/1.**

(A-B) Pourcentage de neurones marqués positivement pour la protéine Egr1 dans le striatum dorsal (A) et ses sous-régions (B) des différents groupes expérimentaux, rapporté aux WT HC (Test de Kruskal-Wallis, comparaisons multiples avec le test de Dunn : Striatum dorsal,  $k=9,68$ ,  $p=0,0079$  ; DMS,  $k=8,31$ ,  $p=0,015$  ; DLS,  $k=10,0$ ,  $p=0,0057$ ). (C) Analyse de l'expression protéique de Egr1 par Western blot dans le striatum des souris, normalisée par l'expression protéique de GAPDH (Test de Kruskal-Wallis, comparaisons multiples avec le test de Dunn :  $k=10,61$ ,  $p=0,0013$ ). (D-E) Pourcentage de neurones marqués positivement pour la protéine Fos dans le striatum dorsal (D) et ses sous-régions (E) des différents groupes expérimentaux, rapporté aux souris WT HC (ANOVA à un facteur, comparaisons multiples avec le test de Tukey : Striatum dorsal,  $F(2, 20)=0,020$ ,  $p=0,98$  ; DMS,  $F(2, 20)=0,6327$ ,  $p=0,54$  ; DLS,  $F(2, 20)=0,8707$ ,  $p=0,43$ ). (F) Analyse de l'expression protéique de Fos par Western blot dans le striatum des souris, normalisée par l'expression protéique de GAPDH (Test de Kruskal-Wallis, comparaisons multiples avec le test de Dunn :  $k=10,61$ ,  $p=0,0013$ ). Les données sont représentées par la moyenne  $\pm$  SEM. Effectifs :  $n=8$  WT Saline (5♂, 3♀),  $n=8$  R6/1 CSP (5♂, 3♀),  $n=7$  R6/1 CSP-TTK21 (4♂, 3♀). Les données de comptage des souris mâles et femelles sont représentées dans l'Annexe 8 (p.208). Statistiques : \*  $p<0.05$  entre les groupes.

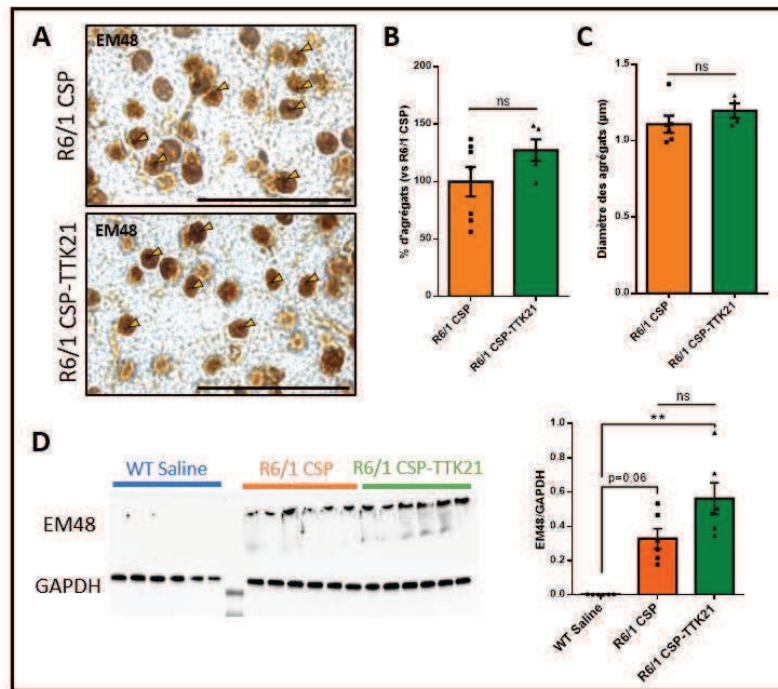
## Résultats

Ces résultats de comptage ont été validés par une analyse semi-quantitative de l'expression protéique de Egr1 et Fos par western blot. La protéine Egr1 est significativement diminuée dans le striatum des souris R6/1 CSP par rapport aux souris WT Saline et cette diminution n'est pas corrigée par le traitement avec le composé CSP-TTK21 ([Figure 60C](#)).

De même, le niveau de la protéine Fos est comparable dans le striatum des souris R6/1 CSP et R6/1 CSP-TTK21 ([Figure 60F](#)). En revanche, contrairement à ce que nous avons observé par comptage neuronal, Fos est significativement diminuée chez les souris R6/1 CSP et R6/1 CSP-TTK21 par rapport aux souris WT Saline ([Figure 60F](#)). Cette hétérogénéité des résultats pourrait être expliquée notamment par la réalisation des analyses dans différentes sous-régions du striatum : les western blots ont été réalisés avec des échantillons de striatum total (dorsal et ventral) tandis que le comptage neuronal a été réalisé uniquement dans le striatum dorsal.

### 2.2.2. [Effet du traitement CSP-TTK21 sur les agrégats de huntingtine mutée dans le striatum des souris R6/1](#)

L'effet de la molécule CSP-TTK21 sur le plan fonctionnel a été complété par l'analyse des agrégats de HTT mutée, un effet bénéfique des HDACi sur ceux-ci ayant été décrit dans la littérature (Mielcarek et al., 2011; Jia et al., 2012a; Suelves et al., 2017). Par une approche stéréologique sur des coupes de cerveaux immunomarquées avec l'anticorps EM48 qui reconnaît la HTT mutée agrégée, nous avons évalué le nombre et la taille des agrégats de HTT mutée dans le striatum des souris R6/1 ([Figure 61A](#)) (cf partie **5.4. Comptage neuronal par stéréologie**, p.101). L'analyse montre que le nombre d'agrégats ne diffère pas significativement entre les souris R6/1 CSP-TTK21 et les souris R6/1 CSP ([Figure 61B](#)). La taille des agrégats est également inchangée avec le traitement CSP-TTK21 ([Figure 61C](#)). Les mêmes tendances sont observées par Western blot, avec les protéines extraites du striatum total (dorsal et ventral) des souris WT Saline, R6/1 CSP et R6/1 CSP-TTK21 (cf partie **6. Analyses moléculaires de l'expression protéique**, p.103).



**Figure 61** : Evaluation de l'effet du traitement CSP-TTK21 sur les agrégats de HTT mutée dans le striatum des souris R6/1.

L'effet de la molécule CSP-TTK21 sur les agrégats de HTT mutée dans le striatum dorsal des souris R6/1 est évalué par l'expression protéique du marqueur EM48, analysé par comptage stéréologique (A-C) et par Western blot (D). (A) Exemple du marquage de la protéine EM48 dans les noyaux des cellules du striatum dorsal des souris R6/1. Les pointes jaunes indiquent les agrégats de HTT mutée comptés. Echelle : 50µm. (B) Pourcentage d'agrégats de HTT mutée comptés dans le striatum dorsal des souris R6/1 CSP-TTK21, rapporté à celui des souris R6/1 CSP (*Test de Mann-Whitney* :  $U=9$   $p=0,20$ ). (C) Diamètre moyen des agrégats de HTT mutée dans le striatum dorsal des souris R6/1 (*Test de Mann-Withney* :  $U=6$   $p=0,25$ ). (D) Analyse de l'expression protéique de EM48 par Western blot dans le striatum des souris WT Saline, R6/1 CSP et R6/1 CSP-TTK21, normalisée par l'expression protéique de GAPDH (*Test de Kruskal-Wallis, comparaisons multiples avec le test de Dunn* :  $k=13,05$ ,  $p<0,0001$ ). Les données sont représentées par la moyenne  $\pm$  SEM. Effectifs :  $n=7$  (4♂, 3♀) R6/1 CSP,  $n=5$  (3♂, 2♀) R6/1 CSP-TTK21. \*\*  $p<0,01$  entre les groupes.

### 2.3. Evaluation de l'effet du composé CSP-TTK21 au niveau transcriptomique

Pour préciser l'effet moléculaire du composé CSP-TTK21, le striatum des souris a été disséqué 1h après le test de rappel dans le double-H et les ARNs extraits des tissus des différents groupes expérimentaux ont été séquencés (Figure 62A).

#### 2.3.1. Analyse de la qualité des échantillons séquencés

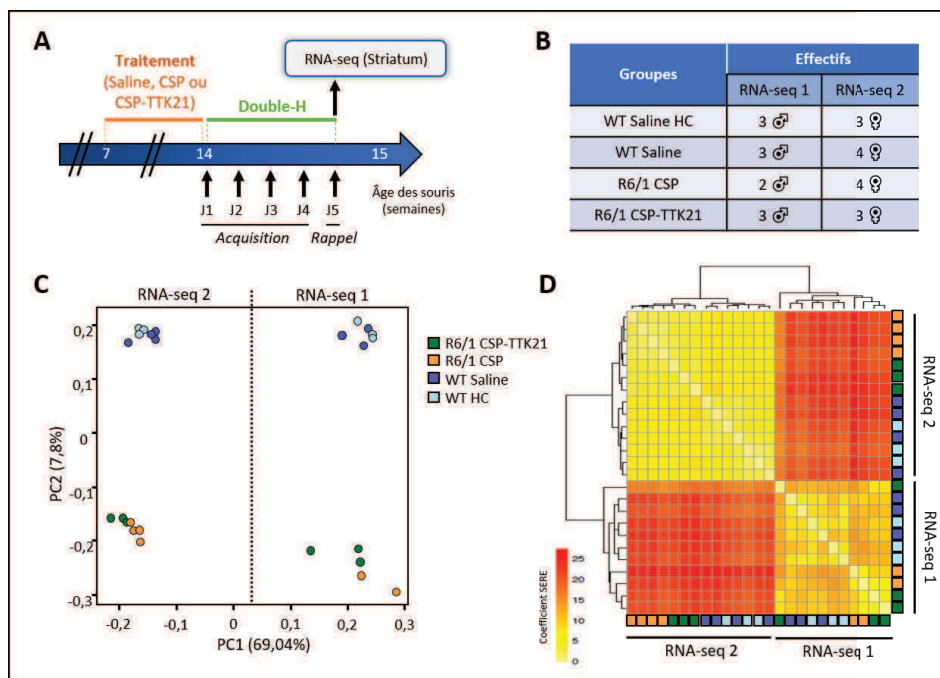
Les échantillons séquencés ont été sélectionnés au hasard parmi les animaux des différentes conditions expérimentales. Les détails du séquençage et des analyses bioinformatiques sont présentés dans la partie 7.2. **Séquençage des ARNs et analyse des résultats** (p.106). Comme pour les analyses comportementales, l'effet du traitement au niveau transcriptomique a été évalué sur des animaux mâles et femelles. Deux expériences de



## Résultats

RNA-seq ont été réalisées : l'une avec les striata de 3 animaux mâles par groupe (RNA-seq 1) et l'autre avec les tissus de 4 animaux femelles par groupe (Figure 62B). Dans le RNA-seq 1, nous avons retiré un échantillon R6/1 CSP de l'analyse car il présentait une variabilité importante par rapport aux autres échantillons R6/1 CSP. De même, pour le RNA-seq 2, un échantillon des groupes WT HC et R6/1 CSP-TTK21 ont été retirés de l'analyse, car ils présentaient une variabilité importante par rapport aux autres échantillons des mêmes groupes. L'analyse d'expression différentielle a été réalisée en regroupant les deux expériences, après correction de l'effet « batch », c'est-à-dire de la variabilité technique liée au fait que les deux expériences de RNA-seq ont été réalisées indépendamment l'une de l'autre.

L'ACP des échantillons (Figure 62C) montre que ceux-ci se regroupent principalement en fonction de l'expérience (avant la correction de l'effet batch) et en fonction des génotypes (WT vs R6/1). Les échantillons R6/1 se regroupent aussi en fonction du traitement (CSP-TTK21 vs CSP). L'analyse de cluster hiérarchique confirme ces conclusions (Figure 62D). L'analyse du profil des échantillons suggère que le génotype, plus que le traitement, explique les changements transcriptionnels dans le striatum des souris.



**Figure 62 : Conditions expérimentales et qualité des échantillons de striatum séquencés.**

(A) Schéma de la conception de l'étude évaluant l'effet du traitement avec CSP-TTK21 sur le transcriptome striatale des souris R6/1. (B) Effectifs des groupes expérimentaux dont les échantillons ont été séquencés. Deux RNA-seq ont été réalisés, l'un sur des animaux mâles, l'autre sur des animaux femelles. Les analyses d'expression différentielle ont été réalisées sur les deux expériences regroupées en corrigeant l'effet batch. (C) Analyse en composante principale (ACP) des échantillons séquencés de striatum des souris WT Saline, R6/1 CSP et R6/1 CSP-TTK21. (D) Dendrogramme et classification hiérarchique de la distance entre les échantillons séquencés (coefficient SERE) des souris WT HC, WT Saline, R6/1 CSP et R6/1 CSP-TTK21.

### 2.3.2. [Effet de CSP-TTK21 sur les signatures transcriptomiques du striatum des souris R6/1](#)

Comme décrit dans la première partie et dans la littérature (Hodges et al., 2006; Achour et al., 2015; Le Gras et al., 2017; Merienne et al., 2019), les gènes sous-exprimés dans le striatum des souris R6/1 par rapport aux souris WT sont enrichis dans des processus associés à la fonction neuronale. Ils comprennent des gènes de l'identité striatale, tels que les gènes codants pour les récepteurs dopaminergiques (*Drd1*, *Drd2*) et les gènes *Pde10a* et *Darpp32*.

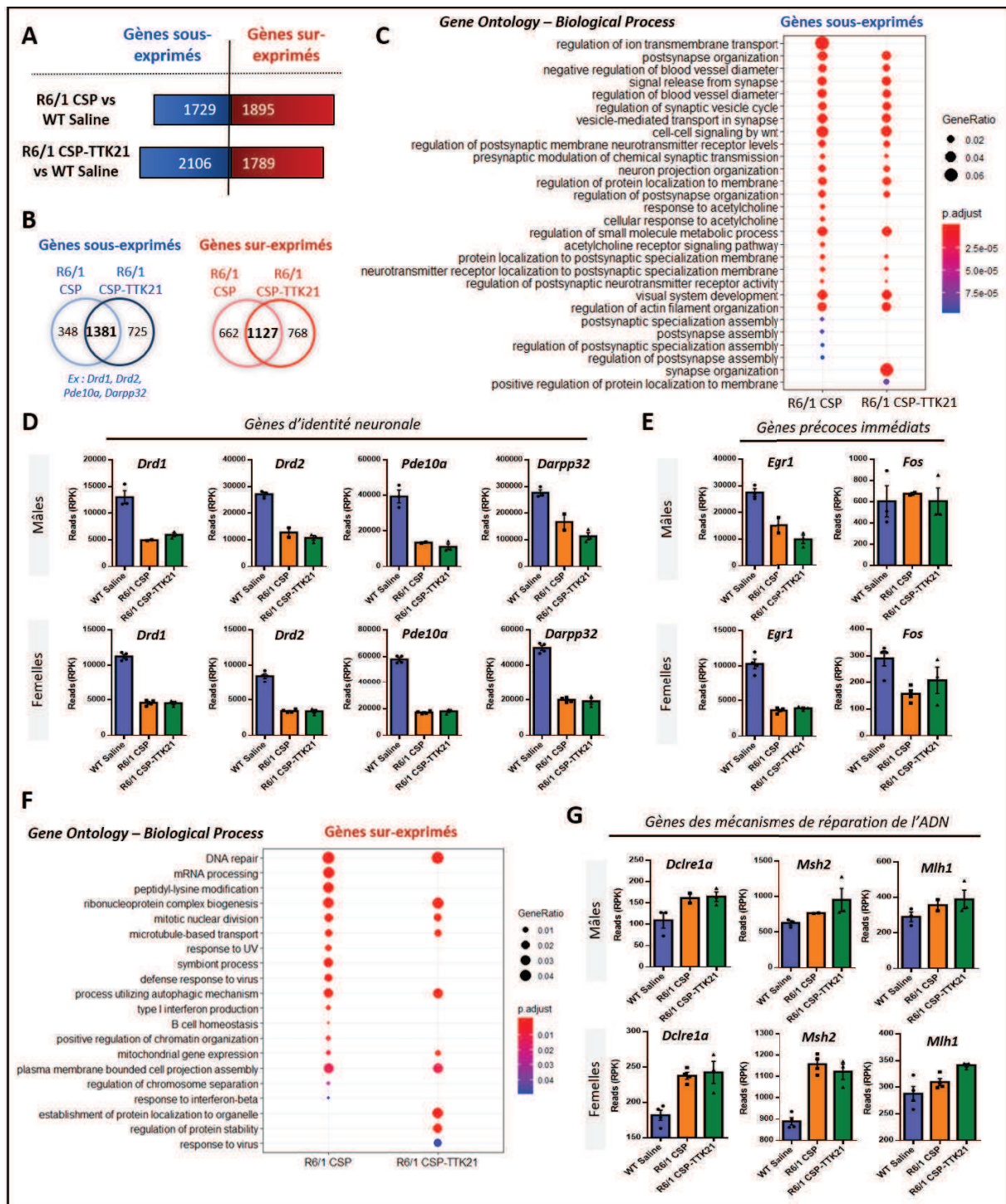
Dans un premier temps pour évaluer si le traitement modifiait le nombre de gènes dérégulés dans le striatum des souris R6/1, une analyse d'expression différentielle des gènes modulés chez les souris R6/1 CSP et R6/1 CSP-TTK21 par rapport aux souris WT Saline a été réalisée ( $\log(\text{FC}) \leq 0$  ou  $\log(\text{FC}) > 0$ ) ; p-valeur ajustée  $\leq 0,01$ ). Chez les souris R6/1 CSP, 1729 gènes sous-exprimés et 1895 sur-exprimés ont été identifiés par rapport aux souris WT Saline ([Figure 63A](#)). De façon surprenante, le nombre de gènes sous-exprimés, soit 2106 gènes, chez les souris R6/1 CSP-TTK21 par rapport aux souris WT Saline est plus important que chez les souris R6/1 CSP. Par ailleurs, le nombre de gènes sur-exprimés, soit 1789 gènes, dans le striatum des souris R6/1 CSP-TTK21 par rapport aux souris WT Saline est moins important que chez les souris R6/1 CSP ([Figure 63A](#)). Selon notre hypothèse de départ, nous nous attendions à réduire le nombre de gènes sous-exprimés et augmenter le nombre de gènes sur-exprimés chez les souris R6/1 par rapport aux souris WT, ce qui n'est pas le cas.

Nous avons ensuite évalué si la molécule CSP-TTK21 modifiait le type de gènes dérégulés dans le striatum des souris R6/1 CSP-TTK21 par rapport aux souris WT Saline. L'analyse de l'intersection des listes de gènes dérégulés dans les deux comparaisons (R6/1 CSP vs WT Saline ; R6/1 CSP-TTK21 vs WT Saline) montre que 1381 gènes et 1127 gènes sont respectivement sous- et sur-exprimés, à la fois chez les souris R6/ CSP et chez les souris R6/1 CSP-TTK21 par rapport aux souris WT Saline ([Figure 63B](#)). Cette intersection représente 65% et 62% du nombre total de gènes respectivement sous- et sur-exprimés chez les souris R6/1 CSP-TTK21 par rapport aux souris WT Saline. Ces recouvrements importants indiquent que le traitement avec la molécule CSP-TTK21 ne modifie pas de façon dramatique les réponses transcriptionnelles induites par la mutation Huntington dans le striatum des souris R6/1.

## Résultats

L'analyse d'enrichissement fonctionnel confirme cette conclusion. Les gènes sous-exprimés chez les souris R6/1 CSP (vs WT Saline) sont enrichis en termes associés aux processus neuronaux (régulation et transmission synaptique, signalisation associée aux neurotransmetteurs) ([Figure 63C, Annexe 10](#)). Cette signature neuronale des gènes sous-régulés par la mutation Huntington est conservée chez les souris R6/1 CSP-TTK21 (vs WT Saline) ([Figure 63C](#)). Ainsi, l'expression des gènes de l'identité striatale (par exemple *Drd1*, *Drd2*, *Pde10a*, *Darpp32*) n'est pas modulée par la molécule CSP-TTK21 ([Figure 63D](#)). De même, l'expression des IEGs *Egr1* et *Fos* est comparable chez les souris R6/1 CSP et R6/1 CSP-TTK21 ([Figure 63E](#)), comme nous l'avons décrit au niveau protéique ([Figure 60](#)). Le traitement avec la molécule CSP-TTK21 ne corrige ni l'expression des gènes de l'identité striatale, ni l'expression de gènes impliqués dans l'activation neuronale.

L'analyse d'enrichissement fonctionnel des gènes sur-exprimés chez les souris R6/1 CSP-TTK21 par rapport aux souris WT Saline montre une signature métabolique comparable à celle observée chez les souris R6/1 CSP (vs WT Saline) ([Figure 63F](#)). Les gènes sur-exprimés sont enrichis en termes associés au métabolisme énergétique (mitochondrie), à la réponse inflammatoire (interféron de type I, réponse aux virus) et à la réparation de l'ADN ([Figure 63F](#)). Par exemple les gènes *Msh2* et *Mlh1*, impliqués dans la réparation des mésappariements de l'ADN, ou encore le gène *Dclre1a* codant pour une exonucléase sont sur-exprimés chez les souris R6/1 CSP et R6/1 CSP-TTK21 (vs WT Saline) ([Figure 63G](#)).

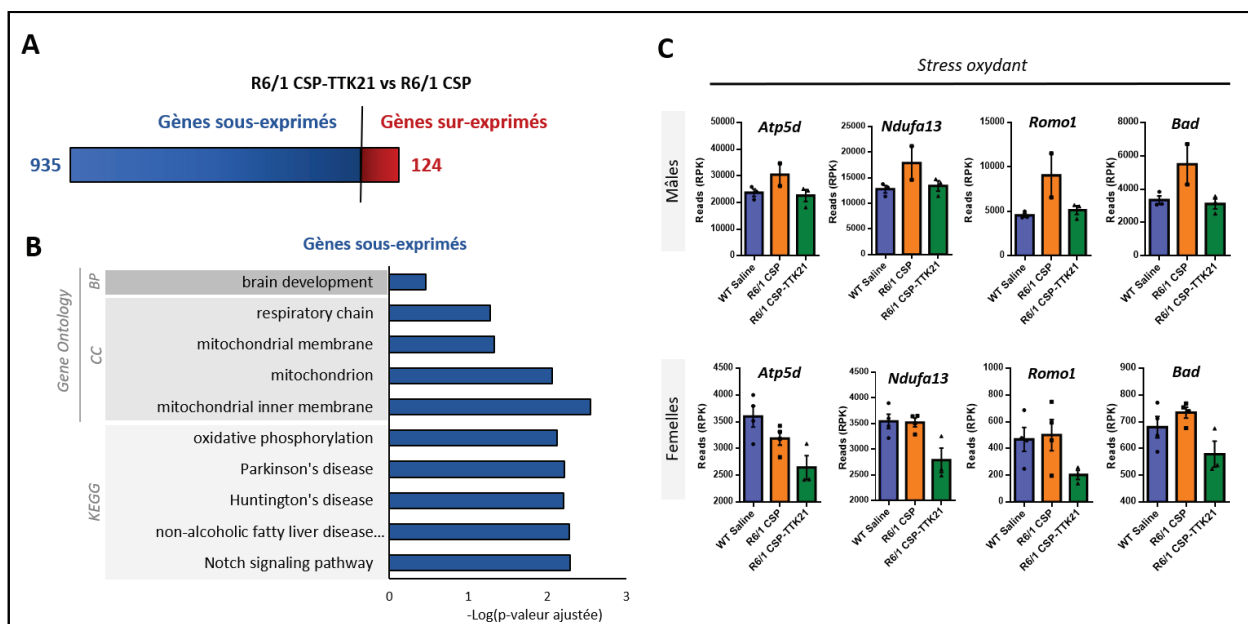


**Figure 63** : Effet de la molécule CSP-TTK21 sur les signatures transcriptionnelles du striatum des souris R6/1. Les listes de gènes ont été sélectionnées avec un  $\log(FC) \leq 0$  ou  $\log(FC) > 0$  et une p-valeur ajustée  $< 0,01$ . **(A)** Nombre de gènes sous-exprimés et sur-exprimés dans le striatum des souris R6/1 CSP et R6/1 CSP-TTK21 par rapport aux souris WT Saline (Comparaisons : R6/1 CSP vs WT Saline ; R6/1 CSP-TTK21 vs WT Saline). **(B)** Diagrammes de Venn de l'intersection des gènes sous- et sur-exprimés dans le striatum des souris R6/1 CSP et R6/1 CSP-TTK21 par rapport aux souris WT Saline. **(C)** Enrichissement fonctionnel des gènes sous-exprimés dans le striatum des souris R6/1 CSP et CSP-TTK21 par rapport aux souris WT Saline. L'analyse fonctionnelle a été réalisée avec la librairie R ClusterProfiler et les termes de la base de données Gene Ontology ont été analysés. L'analyse fonctionnelle avec DAVID est présentée dans l'Annexe 10 (p.210). **(D-E)** Exemples de gènes d'identité neuronale du striatum **(D)** et d'IEGs **(E)** dont l'expression est inchangée par le traitement avec le composé CSP-TTK21 chez les souris R6/1. **(F)** Enrichissement fonctionnel des gènes sur-exprimés dans le striatum des souris R6/1 CSP et R6/1 CSP-TTK21 par rapport aux souris WT Saline. L'analyse fonctionnelle a été réalisée avec la librairie R ClusterProfiler et les termes associés à la base de données Gene Ontology ont été analysés. L'analyse fonctionnelle avec DAVID est présentée dans l'Annexe 10 (p.210). **(G)** Exemples de gènes sur-exprimés chez les souris R6/1 CSP et R6/1 CSP-TTK21, associés aux mécanismes de réparation de l'ADN.

2.3.3. Effet du composé CSP-TTK21 sur le transcriptome striatal des souris R6/1

Pour compléter l'analyse, nous avons ensuite évalué l'effet direct du composé CSP-TTK21 sur le transcriptome des souris R6/1, en comparant le transcriptome striatal des souris R6/1 CSP-TTK21 et R6/1 CSP.

L'analyse d'expression différentielle des gènes modulés chez les souris R6/1 CSP-TTK21 vs R6/1 CSP ( $\log(\text{FC}) \leq 0$  ou  $\log(\text{FC}) > 0$ ) ; p-valeur ajustée  $\leq 0,1$ ) a mis en évidence 935 gènes et 124 gènes respectivement sous- et sur-exprimés par le traitement chez les souris R6/1 (Figure 64A). L'analyse fonctionnelle des gènes sous-exprimés révèle un enrichissement en termes associés au métabolisme mitochondrial (phosphorylation oxydative, chaîne respiratoire) (Figure 64B). Parmi eux sont retrouvés des gènes associés au stress oxydant, comme par exemple les gènes codants pour des enzymes mitochondriales (*Atp5d*, *Ndufa13*), mais également le gène codant pour la protéine mitochondriale *Romo1* qui augmente les ROS, ou encore le gène pro-apoptotique *Bad* (Figure 64C). Ces résultats suggèrent que la molécule CSP-TTK21 agit en faveur d'une réduction du stress oxydant dans les neurones Huntington.



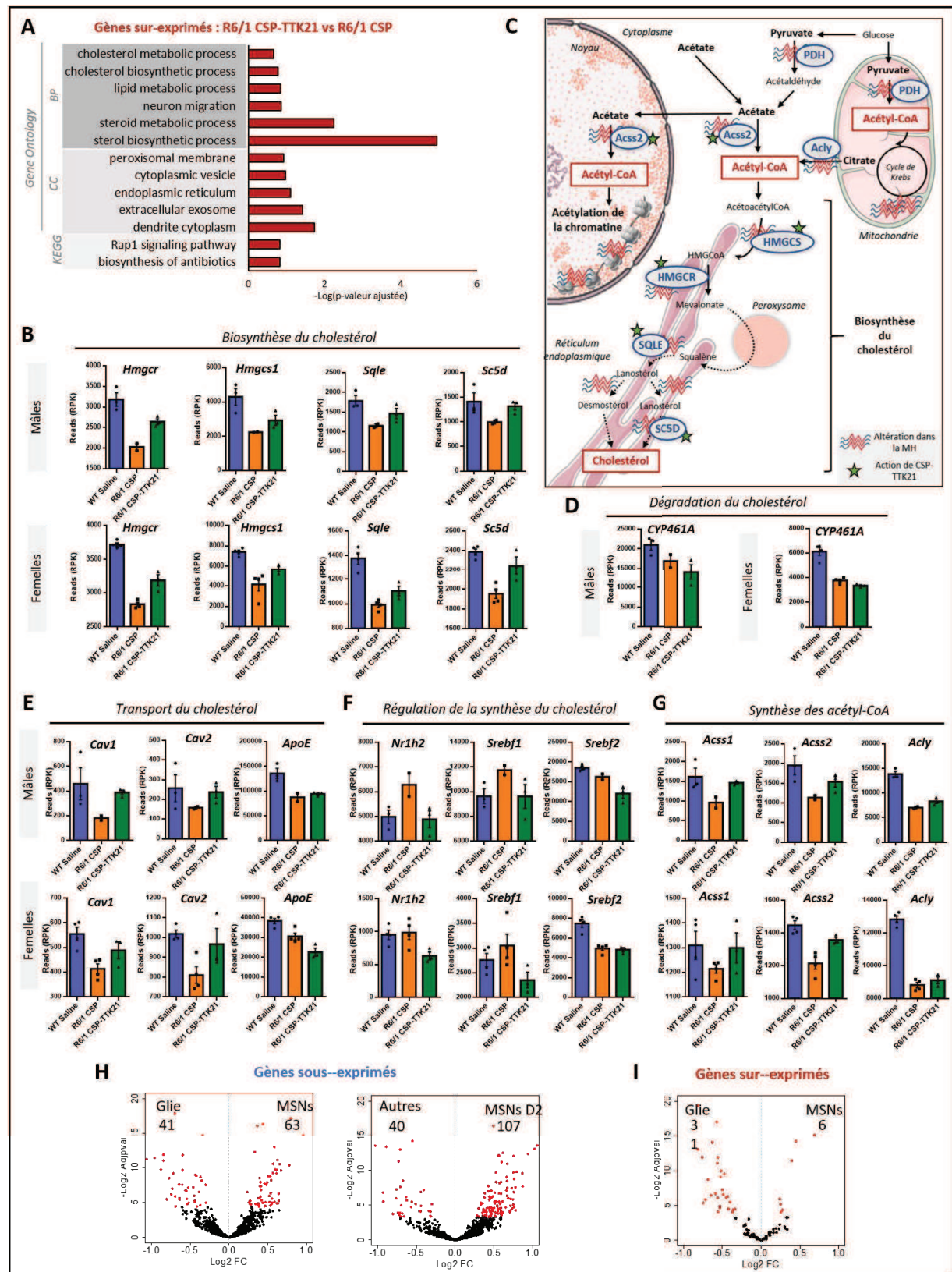
**Figure 64 : Modulation du transcriptome striatal des souris R6/1 CSP-TTK21 en faveur de la survie neuronale.**

Les listes de gènes ont été sélectionnées avec un  $\log(\text{FC}) \leq 0$  ou  $\log(\text{FC}) > 0$  et une p-valeur ajustée  $< 0,1$ . (A) Nombre de gènes sous-exprimés et sur-exprimés dans le striatum des souris R6/1 CSP-TTK21 par rapport aux souris R6/1 CSP. (B) Enrichissement fonctionnel des gènes sous-exprimés dans le striatum des souris R6/1 CSP-TTK21 par rapport aux souris R6/1 CSP. L'analyse fonctionnelle a été réalisée en analysant les termes des bases de données Gene Ontology (Biological Process –BP- ; Cellular Component –CC-) et KEGG. (C) Exemples de gènes sous-exprimés par la molécule CSP-TTK21, associés au stress oxydant.

## Résultats

Concernant les gènes sur-exprimés par le traitement, bien que moins nombreux que les gènes sous-exprimés ([Figure 64A](#)), ils présentent une signature fonctionnelle spécifique. Ces gènes sont enrichis en termes associés au métabolisme du cholestérol (biosynthèse du cholestérol, métabolisme lipidique, réticulum endoplasmique) ([Figure 65A](#)). De façon intéressante, la molécule CSP-TTK21 semble agir à différents niveaux de l'homéostasie du cholestérol. Tout d'abord, les gènes *Hmgcr*, *Hmgcs1*, *Sqle*, *Sc5d* sont sur-exprimés chez les souris R6/1 CSP-TTK21 par rapport aux souris R6/1 CSP, et leur expression est normalisée par rapport aux souris WT Saline ([Figure 65B](#)). Ces gènes codent pour des enzymes clés de la voie de biosynthèse du cholestérol, comme HMGCS et HMGCR ([Figure 65C](#)), qui catalysent des étapes limitantes de la synthèse et sont altérées dans la MH (Valenza et al., 2010; Leoni and Caccia, 2015; Zhang and Liu, 2015; Boussicault et al., 2016, 2018; Kacher et al., 2019).

D'autre part, les gènes *Cav1* et *Cav2*, codant respectivement pour la cavéoline-1 et la cavéoline-2, sont sous-exprimés chez les souris R6/1, mais leur expression est normalisée par le composé CSP-TTK21 ([Figure 65E](#)). De façon intéressante, les cavéolines sont des protéines qui constituent les cavéoles, des invaginations de la membrane plasmique qui forment un sous-type de radeaux lipidiques, enrichis en glycosphingolipides et cholestérol. Les cavéoles, et particulièrement la cavéoline-1, jouent un rôle dans le transport du cholestérol (Smart et al., 1996; Frank et al., 2006; Qin et al., 2016). L'altération de la cavéoline-1 par la HTT mutée contribue à une accumulation cytotoxique du cholestérol dans les neurones (Leoni and Caccia, 2015), qui pourrait être limitée par la molécule CSP-TTK21. D'autres gènes impliqués dans le transport (*ApoE*) ou la dégradation du cholestérol (*CYP46A1*) ([Figure 65D](#)), dont l'augmentation pourrait réduire l'accumulation cellulaire de cholestérol, ne sont pas modifiés par le traitement avec le composé CSP-TTK21 (*Test de Kruskal-Wallis, comparaisons multiples avec le test de Dunn, R6/1 CSP-TTK21 vs R6/1 CSP : Mâles, ApoE p>0,99, CYP46A1 p=0,99 ; Femelles, ApoE p=0,41, CYP46A1 p=0,74*).



**Figure 65 : Modulation du transcriptome striatal des souris R6/1 CSP-TTK21 en faveur d'une activation du métabolisme du cholestérol.**

(A) Enrichissement fonctionnel des gènes sur-exprimés dans le striatum des souris R6/1 CSP-TTK21 par rapport aux souris R6/1 CSP. Ces gènes ont été sélectionnés avec un  $\log_2(\text{FC}) \leq 0$  ou  $\log_2(\text{FC}) > 0$  et une p-valeur ajustée  $< 0,1$ . L'analyse fonctionnelle a été réalisée avec DAVID, en analysant les termes des bases de données Gene Ontology (Biological Process –BP- ; Cellular Component –CC-) et KEGG. (B) Exemples de gènes codant pour des enzymes clés de la biosynthèse du cholestérol, dont l'expression est modulée par la molécule CSP-TTK21.

## Résultats

(C) Représentation schématique simplifiée de la synthèse des acétyl-CoA et du cholestérol. (D) Expression du gène codant pour l'enzyme de dégradation du cholestérol. (E-G) Exemples de gènes codant pour des protéines impliquées dans le transport du cholestérol (E), des facteurs impliqués dans la régulation du métabolisme du cholestérol (F) et des enzymes de synthèse des acétyl-CoA (G). (H) Volcano-plots représentant les populations cellulaires du striatum (MSNs ou cellules gliales – à gauche - ; MSNs exprimant le récepteur dopaminergique D2 ou autres cellules – à droite -) auxquelles appartiennent les gènes sous-exprimés par le traitement CSP-TTK21 chez les souris R6/1 (*Chi-deux : MSNs vs glie, p=0,03 ; MSNs D2 vs autres, p=5.10<sup>-8</sup>*). Les données du transcriptome spécifique des types cellulaires du striatum sont issues de l'étude de Merienne et collaborateurs (2019). (I) Volcano-plot représentant les populations cellulaires du striatum (MSNs ou cellules gliales) auxquelles appartiennent les gènes sur-exprimés par le traitement CSP-TTK21 chez les souris R6/1 (*Chi-deux : MSNs vs glie, p=8.10<sup>-5</sup>*). Les données du transcriptome spécifique des types cellulaires du striatum sont issues de l'étude de Merienne et collaborateurs (2019).

Néanmoins, l'hypothèse d'une réduction de l'accumulation du cholestérol avec le traitement CSP-TTK21 est appuyée par la modulation de l'expression de facteurs de transcription impliqués dans la régulation de la voie de biosynthèse du cholestérol chez les souris R6/1 CSP-TTK21. Le gène *Nr1h2* codant pour un récepteur LXR par exemple ou les gènes *Srebf1* et *Srebf2* codant pour des protéines se liant aux motifs SRE (*Sterol-Regulatory Element*) de l'ADN sont diminués par le composé CSP-TTK21 (Figure 65F). Ces facteurs sont régulés par la quantité de cholestérol et sont impliqués dans des mécanismes de rétrocontrôle de la voie de biosynthèse (Leoni and Caccia, 2015; Mouzat et al., 2019).

La molécule CSP-TTK21 semble donc activer le métabolisme du cholestérol qui est dérégulé dans la MH (Valenza et al., 2010; Leoni and Caccia, 2015; Boussicault et al., 2016, 2018; Kacher et al., 2019).

L'acétyl-CoA étant un précurseur du cholestérol, l'altération de l'homéostasie du cholestérol dans la MH pourrait résulter d'une diminution de l'acétyl-CoA disponible dans le cytosol. En accord avec cette hypothèse, nos données transcriptomiques montrent que *Acss2* et *Acly*, des gènes codant pour des enzymes qui catalysent la production d'acétyl-CoA respectivement à partir de l'acétate et du citrate cytosolique ou nucléaire (Figure 65C), sont diminués dans le striatum des souris R6/1 (Figure 65G) (*Test de Kruskal-Wallis, comparaisons multiples avec le test de Dunn, R6/1 CSP vs WT Saline : Mâles, Acss2 p=0,9, Acly p=0,04 ; Femelles, Acss2 p=0,008, Acly p=0,02*). De manière remarquable, la molécule CSP-TTK21 normalise l'expression de *Acss2* et *Acss1* (Figure 65G) (*Test de Kruskal-Wallis, comparaisons multiples avec le test de Dunn, R6/1 CSP-TTK21 vs WT Saline : Mâles, Acss2 p>0,99 ; Femelles, Acss2 p=0,50*). En plus de son rôle dans le cycle de Krebs et dans le métabolisme lipidique, l'acétyl-CoA est le seul donneur de groupement acétyle pour l'acétylation des protéines, et en particulier pour l'acétylation des histones (Pietrocola et al., 2015).



## Résultats

Ainsi, nos données suggèrent que CSP-TTK21, molécule capable d'augmenter l'activité histone acétyltransférase de CBP et p300, active indirectement le métabolisme de l'acétyl-CoA. L'activation du métabolisme du cholestérol en serait la conséquence.

Afin de préciser cette analyse, nous avons intégré nos données aux données transcriptomiques provenant du striatum de souris, générées à partir des MSNs et des cellules gliales (astrocytes et microglie) (Merienne *et al.*, 2019). Tandis que les gènes sous-exprimés chez les souris R6/1 CSP-TTK21 par rapport aux souris R6/1 CSP sont significativement enrichis en gènes neuronaux ([Figure 65H](#)), particulièrement en gènes associés aux MSNs exprimant les récepteurs dopaminergiques D2 ([Figure 65H](#)), les gènes sur-exprimés chez les souris R6/1 CSP-TTK21 (vs R6/1 CSP) sont enrichis en gènes gliaux ([Figure 65I](#)). Le cholestérol est synthétisé de manière endogène dans le cerveau et plusieurs études montrent que cette synthèse est prédominante dans les astrocytes et les oligodendrocytes, le cholestérol étant ensuite transporté vers les neurones *via* des transporteurs tels que ApoE ou encore la famille de transporteurs ABC (*ATP-Binding Cassette*). Les neurones sont aussi capables de synthétiser le cholestérol, mais la voie de biosynthèse neuronale est moins performante que celle de la glie (Nieweg *et al.*, 2009; Valenza *et al.*, 2010; Pfriederger and Ungerer, 2011; Leoni and Caccia, 2015). L'identification des gènes sur-exprimés chez les souris R6/1 CSP-TTK21 (vs R6/1 CSP) impliqués dans la biosynthèse du cholestérol corrèle donc avec leur enrichissement en gènes gliaux.

En conclusion, nos données suggèrent que la molécule CSP-TTK21 favorise la survie neuronale en réduisant le stress oxydant. De plus, et de manière inattendue, le traitement semble stimuler le métabolisme du cholestérol dans le striatum des souris R6/1. Le cholestérol est impliqué dans de nombreux processus cellulaires, gliaux et neuronaux, comme par exemple la myélinisation et la synaptogénèse (Pfriederger and Ungerer, 2011; Zhang and Liu, 2015; Hussain *et al.*, 2019). Il est décrit dans la littérature qu'une activation de son métabolisme pourrait avoir un effet neuroprotecteur sur les neurones (Boussicault *et al.*, 2016, 2018).

## 2.4. Evaluation de l'effet de la molécule CSP-TTK21 au niveau épigénétique

La molécule CSP-TTK21 activant les histones acétyltransférases CBP et p300, par une approche de CHIP-seq, nous avons évalué si CSP-TTK21 modifiait l'acétylation de H3K27, cible de CBP/p300, et si les changements d'acétylation corrèlent aux modulations transcriptionnelles observées chez les souris R6/1 CSP-TTK21 (vs R6/1 CSP).

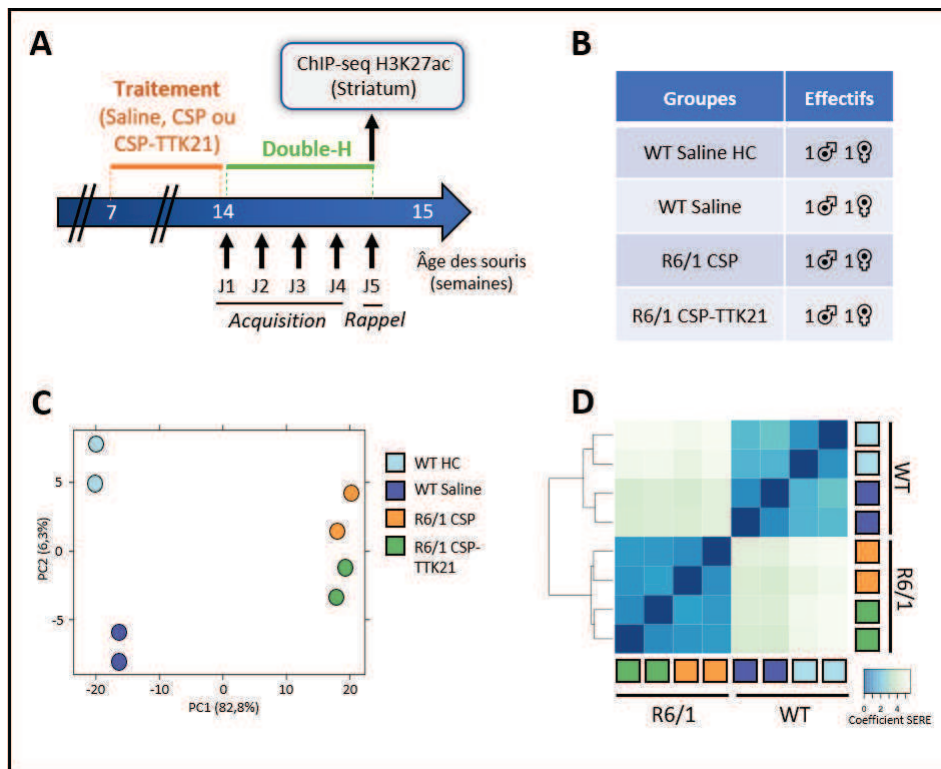
Le striatum des souris WT HC, WT Saline, R6/1 CSP et R6/1 CSP-TTK21 a été prélevé 1h après le test de rappel dans le labyrinthe en double-H ([Figure 66A](#)). Le Dr. Rafael ALCALA VIDA, post-doctorant de notre équipe, a ensuite effectué un CHIP-seq pour la marque H3K27ac sur ces tissus ([Figure 66B](#)) (cf partie **8. Analyses épigénétiques**, p.107).

### 2.4.1. [Analyse de la qualité des échantillons séquencés](#)

L'ACP des échantillons ([Figure 66C](#)) montre que ceux-ci se regroupent principalement en fonction des génotypes (WT vs R6/1). Les échantillons R6/1 se regroupent aussi en fonction du traitement (CSP-TTK21 vs CSP). L'analyse du dendrogramme et de la classification hiérarchique confirme ces conclusions ([Figure 66D](#)). L'analyse du profil des échantillons suggère que le génotype, plus que le traitement, explique les changements d'acétylation de H3K27 dans le striatum des souris.

### 2.4.2. [Effet de CSP-TTK21 sur l'acétylation de H3K27 dans le striatum des souris R6/1](#)

Un peak-calling a été réalisé pour identifier les régions enrichies en H3K27ac. A partir de ces régions, une analyse d'enrichissement différentiel a été effectuée pour sélectionner les régions sur- ou sous-enrichies en H3K27ac dans le striatum des souris R6/1 CSP-TTK21 par rapport aux R6/1 CSP ( $\log(\text{FC}) \leq 0$  ou  $\log(\text{FC}) > 0$ ; p-valeur ajustée  $\leq 0,1$ ). 156 régions et 85 régions sont respectivement associées à une baisse et une augmentation de H3K27ac chez les souris R6/1 CSP-TTK21 par rapport aux souris R6/1 CSP ([Figure 67A](#)). Ainsi, la molécule CSP-TTK21 entraîne peu de changements importants au niveau de H3K27ac dans le striatum des souris R6/1.



**Figure 66 : Conditions expérimentales et qualité des échantillons séquencés.**

(A) Schéma de la conception de l'étude évaluant l'effet du traitement avec CSP-TTK21 sur l'acétylation de H3K27 dans le striatum des souris R6/1. (B) Effectifs des groupes expérimentaux dont les échantillons ont été séquencés. Deux répliquats biologiques ont été réalisés, avec une souris mâle et une femelle par groupe. (C) ACP des échantillons séquencés des souris WT HC, WT Saline, R6/1 CSP et R6/1 CSP-TTK21. (D) Dendrogramme et classification hiérarchique de la distance entre les échantillons séquencés (coefficient SERE) des souris WT HC, WT Saline, R6/1 CSP et R6/1 CSP-TTK21.

Pour identifier si ces régions différentiellement enrichies en H3K27ac sont associées à des gènes impliqués dans des processus biologiques particulier, une analyse fonctionnelle d'enrichissement a été réalisée. Les régions présentant une baisse de H3K27ac sont associées à des gènes impliqués dans les processus neuronaux (transmission synaptique, projection neuronale, plasticité synaptique, potentialisation à long terme) (Figure 67B). En revanche, les régions associées à une augmentation de H3K27ac ne présentent pas de signature fonctionnelle significative.

La molécule CSP-TTK21, en activant les HAT CBP/p300, devrait entraîner une augmentation de H3K27ac. L'analyse différentielle présentée ci-dessus montre cependant peu de variation du niveau global de H3K27ac entre la condition R6/1 CSP-TTK21 et R6/1 CSP. Nous avons donc cherché à affiner l'analyse en évaluant l'effet de CSP-TTK21 dans les neurones et dans la glie. Les effets transcriptionnels de CSP-TTK21 dans les neurones et dans la glie étant différents (cf partie 2.3. **Evaluation de l'effet du composé CSP-TTK21 au niveau transcriptomique**, p.158), cette distinction nous est apparue particulièrement pertinente.

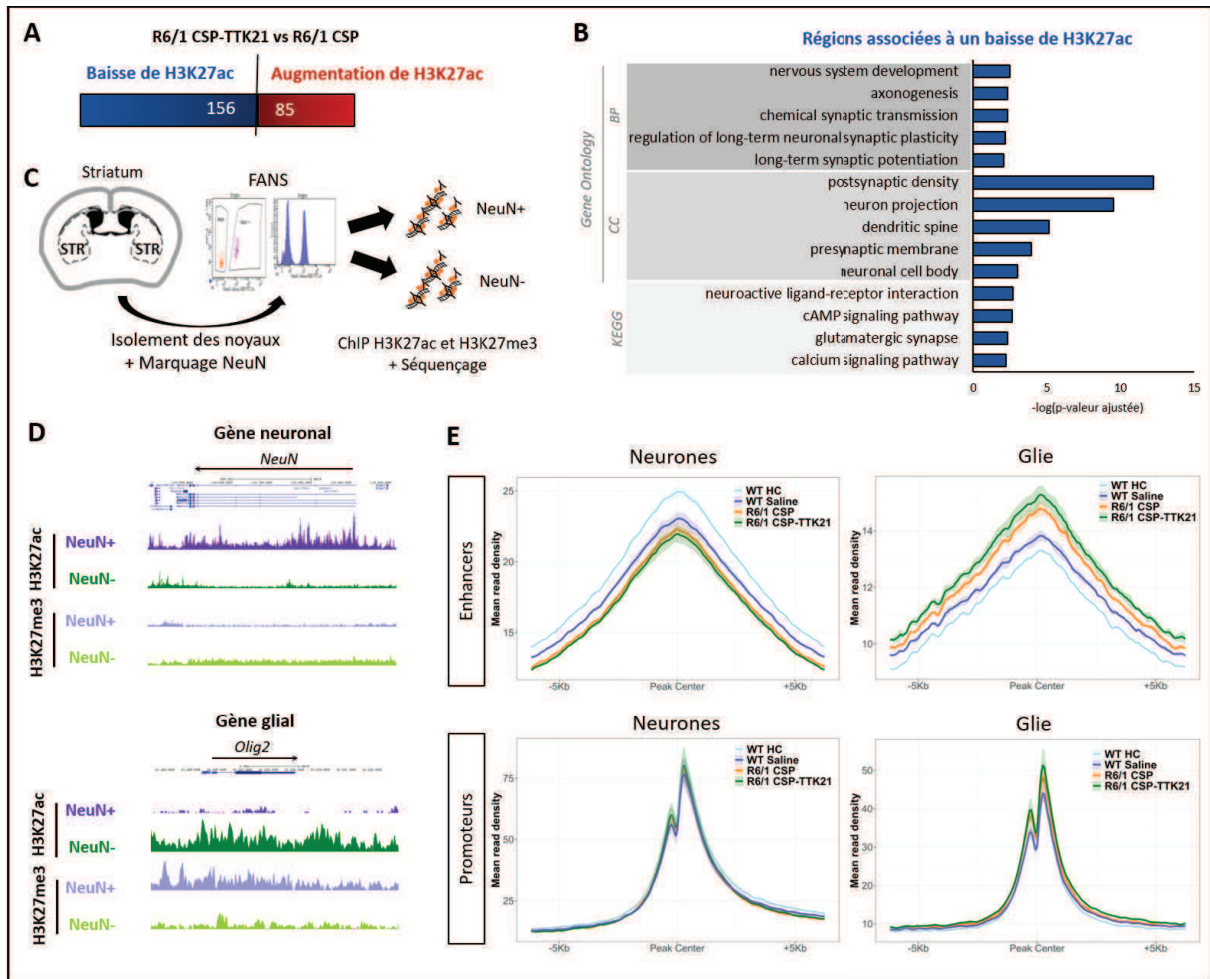
## Résultats

Dans ce but, nous avons utilisé des données CHIP-seq réalisées récemment au laboratoire par le Dr. Rafael ALCALA VIDA (données non publiées), à partir des neurones et des cellules gliales du striatum de souris WT ([Figure 67C](#)).

Ces données ont été générées en triant les noyaux du striatum de souris grâce à un immunomarquage avec le marqueur neuronal NeuN. La chromatine issue des noyaux NeuN+ (enrichis en noyaux neuronaux) et NeuN- (enrichis en noyaux gliaux) a ensuite été immunoprécipitée avec un anticorps anti-H3K27ac (qui marque les enhanceurs actifs) et un anticorps anti-H3K27me3 (associé à de la répression transcriptionnelle), puis les échantillons ont été séquencés ([Figure 67C](#)). L'analyse comparative des données CHIP-seq générées à partir des noyaux NeuN+ et NeuN- a permis d'identifier les régions « enhanceurs » spécifiques des neurones et spécifiques des cellules gliales (données non publiées). Par exemple, les neurones montrent un enrichissement important en H3K27ac au niveau du gène *NeuN*, enrichissement qui n'est pas retrouvé dans la glie ([Figure 67D](#)). Inversement, H3K27me3 est enrichie dans la glie au niveau de *NeuN*, mais pas dans les neurones ([Figure 67D](#)). Des profils opposés sont observés pour le gène glial *Olig2* ([Figure 67D](#)).

Nous avons évalué le signal H3K27ac au niveau des enhanceurs neuronaux et gliaux. Nos données indiquent que H3K27ac est globalement (et faiblement) augmenté par le traitement CSP-TTK21 au niveau des enhanceurs gliaux ([Figure 67E](#)). Cet effet apparait spécifique car nous ne l'observons pas au niveau des enhanceurs neuronaux. De plus la molécule CSP-TTK21 n'a pas d'effet au niveau des promoteurs, qu'ils soient neuronaux ou gliaux ([Figure 67E](#)).

En résumé, les résultats de CHIP-seq indiquent que CSP-TTK21 cible H3K27ac sélectivement au niveau de la glie du striatum chez les souris R6/1. Les effets épigénétiques et transcriptionnels observés dans les neurones (diminutions en H3K27ac et baisses transcriptionnelles) sont vraisemblablement des effets indirects du traitement, résultant possiblement d'une modification du métabolisme des cellules gliales.



**Figure 67 : Evaluation des changements d'acétylation de H3K27 dans le striatum des souris R6/1 CSP-TTK21.**

Les listes des régions différemment enrichies en H3K27ac ont été sélectionnées avec un  $\log(\text{FC}) \leq 0$  ou  $\log(\text{FC}) > 0$  et une p-valeur ajustée  $< 0,1$ . **(A)** Nombre de régions du génome des souris R6/1 CSP-TTK21 associées à une augmentation ou une baisse de H3K27ac par rapport aux souris R6/1 CSP. **(B)** Enrichissement fonctionnel des régions associées à une baisse de H3K27ac. Aucune signature fonctionnelle significative n'est observée pour les régions associées à une augmentation de H3K27ac. L'analyse fonctionnelle a été réalisée avec DAVID et les termes des bases de données Gene Ontology (Biological Process -BP- ; Cellular Component -CC-) et KEGG ont été analysés. **(C)** Schéma de la génération des données ChIP-seq pour les marques H3K27ac et H3K27me3, sur le striatum de souris WT dont les noyaux ont été triés par FANS (*Fluorescence-Activated Nuclei Sorting*) (réalisé au laboratoire par Rafael ALCALA VIDA). **(D)** Exemple de métaprofiles H3K27ac et H3K27me3 d'un gène neuronal (*NeuN*) et glial (*Olig2*). **(E)** Les régions associées aux enhancers et promoteurs neuronaux et gliaux ont été sélectionnés selon leur profil H3K27ac et H3K27me3 en utilisant les données de ChIP-seq des souris WT. Nous avons croisé les données spécifiques des types cellulaires du striatum de WT avec nos données de ChIP-seq des animaux WT HC, WT Saline, R6/1 CSP et R6/1 CSP-TTK21 pour analyser le profil H3K27ac des échantillons de striatum des différents groupes expérimentaux au niveau des enhancers et promoteurs neuronaux et gliaux.

## DISCUSSION

---



Il est établi que dans la MH, les réponses comportementales sous le contrôle du striatum et les mécanismes moléculaires sous-jacents sont altérés très précocement. Or, d'un point de vue thérapeutique, l'amélioration de ces dysfonctionnements nécessite une compréhension de la relation de cause à effet qui les relie. Cette relation est encore mal comprise et sa caractérisation constitue l'objectif de ma thèse.

Le premier axe de travail de ma thèse a consisté à évaluer les changements transcriptionnels dans le striatum des souris WT et R6/1 en réponse à une situation d'apprentissage et de mémorisation. Nous avons évalué la mémoire procédurale, dépendante du striatum, des souris WT et R6/1 à l'aide d'une nouvelle tâche comportementale : le labyrinthe en double-H. Nous avons ensuite analysé le transcriptome striatal des souris WT et R6/1 induit par l'établissement d'une mémoire procédurale, afin d'évaluer les signatures transcriptionnelles associées à l'apprentissage dans le striatum et de les corrélérer avec le phénotype comportemental de souris WT et R6/1.

Le deuxième axe de travail de ma thèse a consisté à caractériser la relation de cause à effet entre les altérations épigénétiques, transcriptionnelles et comportementales du striatum des souris R6/1. Pour cela, nous les avons traitées avec un activateur des HAT CBP et p300, la molécule CSP-TTK21. Ce traitement nous a permis d'évaluer l'effet d'une augmentation de l'acétylation des histones sur le transcriptome striatal induit par le processus de mémorisation et sur le phénotype comportemental des souris R6/1.

### **1. CARACTERISATION DE LA MEMOIRE PROCEDURALE DES SOURIS WT ET R6/1 DANS LE LABYRINTHE EN DOUBLE-H**

Pour caractériser les troubles cognitifs dépendants du striatum chez les souris R6/1, nous avons utilisé le labyrinthe en double-H, un nouveau test aquatique initialement développé au laboratoire pour le Rat (Pol-Bodetto et al., 2011; Cassel et al., 2012).

Notre étude est la première à avoir utilisé le labyrinthe en double-H pour évaluer la mémoire procédurale de la Souris. Nos résultats comportementaux montrent que les souris WT utilisent majoritairement une stratégie procédurale pour retrouver la plateforme dans le dispositif et sont capables, si nécessaire, d'adapter leur comportement à la faveur d'une stratégie spatiale. Le protocole que nous avons utilisé a été précédemment testé dans



## Discussion

plusieurs études réalisées chez le Rat. Les résultats que nous avons obtenus sont comparables à ceux de ces études (Pol-Bodetto et al., 2011; Cassel et al., 2012).

De plus, nous avons montré que le comportement des souris dans le labyrinthe en double-H corrèle avec l'engagement du striatum et de l'hippocampe au cours de la tâche. En effet, nos données de comptage neuronal par stéréologie des protéines Egr1 et Fos mettent en évidence un engagement du striatum dorsal au cours de la tâche. Plus précisément, la formation, puis l'utilisation d'une stratégie procédurale chez les souris WT, corrélient avec un engagement initial du DMS, et secondairement du DLS, ce qui est en accord avec les données de la littérature.

En effet, plusieurs études chez le Rat et chez l'Homme évaluant l'interaction entre les systèmes de mémoire dépendants du striatum et de l'hippocampe montrent des résultats similaires aux nôtres (Dickinson, 1994; Dickinson et al., 1995; Tricomi et al., 2009; Rice et al., 2015; Ferbinteanu, 2016; Siller-Pérez et al., 2017). Il a été décrit que l'hippocampe et le DLS interagissent de manière compétitive, avec une sollicitation préférentielle d'un système de mémoire par rapport à l'autre en fonction du principe de la tâche comportementale. Ainsi, dans l'étude de Ferbinteanu (2016), deux cohortes de rats sont entraînées dans un dispositif de labyrinthe en croix surélevé, dont l'un des bras est appâté par de la nourriture (Ferbinteanu, 2016). Le premier groupe a été entraîné avec un protocole spatial (2 points de lâcher, bras appâté constant) et le deuxième avec un protocole procédural mobilisant un comportement dirigé vers un but (R-O) (point de lâcher et bras appâté randomisés, bras appâté toujours indicé). Après 2 jours d'entraînement, une lésion du DLS, du DMS ou de l'hippocampe est réalisée sur les rats de chaque groupe. L'effet des lésions a été évalué par un deuxième entraînement de 5 jours, identique au premier. Les résultats montrent que les performances des rats en navigation spatiale étaient altérées après lésion de l'hippocampe, mais également après lésion du DMS impliqué dans l'apprentissage d'un comportement dirigé vers un but et dans la flexibilité cognitive. Inversement, l'apprentissage procédural est altéré chez les rats ayant subi une lésion du DLS, impliqué dans l'acquisition des habitudes, mais également chez les rats ayant subi une lésion du DMS. Ces résultats corrélient avec nos données démontrant un engagement du DLS lorsque les animaux utilisent une stratégie procédurale, et un engagement de l'hippocampe et du DMS lorsque les souris apprennent la

## Discussion

tâche et mobilisent une stratégie plus spatiale, tant que la mémoire procédurale n'est pas ancrée.

Avec le protocole que nous avons utilisé dans le labyrinthe en double-H, nous avons observé un changement de stratégie des souris WT au cours du test de rappel (procédurale puis spatiale), suggérant une coopération des systèmes de mémoire dépendants du striatum et de l'hippocampe au cours de la tâche. En effet, il est également décrit dans la littérature que l'interaction entre les systèmes de mémoire n'est pas uniquement de nature compétitive mais elle serait également coopérative, l'animal pouvant basculer entre des systèmes dépendants de l'hippocampe ou du DLS, tout en naviguant dans un environnement au sein d'un essai donné (Balleine and O'Doherty, 2010; Rice et al., 2015; Ferbinteanu, 2016; Siller-Pérez et al., 2017). Les résultats de Ferbinteanu (2016) confortent cette hypothèse. Les performances d'une cohorte de rats dans un protocole mixte du labyrinthe en croix surélevé ont été évaluées. Les rats ont réalisé quotidiennement des entraînements successifs, basés sur les protocoles décrits précédemment (spatial et procédural). De façon intéressante, au cours de cet entraînement mixte, la navigation spatiale des rats est altérée après lésion du DLS et, inversement, la lésion de l'hippocampe affecte l'apprentissage procédural. Ainsi, lorsque l'entraînement implique l'acquisition de deux tâches simultanées, l'engagement sélectif des structures cérébrales n'est plus observé, les systèmes de mémoire dépendants du striatum et de l'hippocampe sont en coopération.

D'autres études ont également décrit cette coopération et ont, en outre, observé des changements de stratégies se produisant de manière séquentielle en fonction du temps : la mémoire spatiale dépendante de l'hippocampe étant exprimée au début d'un entraînement et la mémoire procédurale dépendante du DLS étant exprimée de manière plus tardive (Packard et al., 1989; Rice et al., 2015). Les travaux de Rice et collaborateurs (2015) réalisés chez le Rat avec une adaptation du protocole de la piscine de Morris mettent en évidence ce changement de stratégie au cours du temps (Rice et al., 2015). Des rats ayant subi une lésion de l'hippocampe ou du DLS ont été entraînés à nager vers une plateforme indiquée à partir de deux points de lâcher différents dans la piscine. Ainsi, les rats pouvaient apprendre la localisation de la plateforme dans le dispositif à l'aide des indices visuels (stratégie spatiale) ou apprendre à nager vers l'indice positionné sur la plateforme (stratégie procédurale). Lorsque les rats atteignaient directement la plateforme pendant 3 jours consécutifs, leurs

## Discussion

stratégies d'apprentissage étaient évaluées lors d'un test de rappel sans plateforme. Les auteurs ont observé que les rats dont l'hippocampe avait été lésé présentaient des performances altérées lors du test de rappel, tandis que les rats contrôles (sans lésion) et les rats avec le DLS lésé étaient capables de retrouver l'emplacement de la plateforme. Ces résultats suggèrent que les rats dont l'hippocampe a été lésé ont utilisé une stratégie procédurale pour retrouver la plateforme lors de l'apprentissage. Après le test de rappel, les rats étaient à nouveau entraînés pendant 3 jours à retrouver la plateforme indiquée positionnée dans un quadrant différent de celui du premier apprentissage. Les rats avec la lésion du DLS présentaient des performances altérées et passaient plus de temps dans le quadrant où était anciennement positionnée la plateforme, par rapport aux rats contrôles et aux rats avec la lésion de l'hippocampe. Les auteurs ont conclu qu'une lésion de l'hippocampe perturbe les trajectoires initiales basées sur l'utilisation d'une stratégie spatiale au début de l'essai, tandis que la lésion du DLS perturbe les trajectoires plus tardives basées sur l'utilisation d'une stratégie procédurale. Les résultats que nous avons obtenus avec les souris dans le labyrinthe en double-H et les résultats de comptage neuronal des protéines issues des IEGs *Egr1* et *Fos* sont cohérents avec l'étude de Rice et collaborateurs (2015). En effet, nous avons décrit un engagement préférentiel de l'hippocampe et du DMS après 2 jours d'entraînement dans le labyrinthe en double-H, tandis que le DLS est engagé plus tardivement, après 5 jours.

Par ailleurs, chez les souris R6/1, nous avons montré une altération de leurs performances lors de l'acquisition dans le labyrinthe en double-H, dès l'âge de 11 semaines, un stade précoce de la pathologie pour ces souris dont la mort survient vers 40 semaines. Ce déficit progresse entre 11 et 14 semaines. Lors du test de rappel, les souris R6/1 privilégient une stratégie de recherche spatiale au détriment d'une stratégie procédurale, suggérant un déficit de mémoire procédurale chez ces souris, observé à la fois chez les mâles et femelles, dès l'âge de 11 semaines. La mémoire spatiale, en revanche, semble relativement préservée, une hypothèse appuyée par nos données comportementales (Piscine de Morris, tâche de localisation d'objets) et transcriptomiques. De plus, la mémoire spatiale pourrait compenser le déficit de mémoire procédurale, comme nos résultats de comptage neuronal le suggèrent : une diminution du marquage de la protéine *Egr1* est observée dans le striatum des souris R6/1, mais pas dans leur hippocampe où une augmentation du marquage est même mise en

## Discussion

évidence dans leur DG. Egr1 joue un rôle essentiel dans la consolidation mnésique et pourrait être impliquée dans un mécanisme de compensation de la fonction striatale par l'hippocampe.

Quelques études précédentes se sont intéressées à la mémoire procédurale chez les souris R6/2 (Lione et al., 1999; Ciamei and Jennifer Morton, 2009), mais notre étude est la première à démontrer une altération claire de la mémoire procédurale chez les souris R6/1. En effet, peu de tests comportementaux permettant d'évaluer la mémoire procédurale ont été décrits. Les tests de référence actuellement utilisés pour évaluer les déficits cognitifs des modèles murins de la MH ciblent soit la mémoire spatiale ou la flexibilité cognitive (Lione et al., 1999; Brooks et al., 2012; Rattray et al., 2013b), soit des comportements qui, respectivement, nécessitent principalement un engagement de l'hippocampe et de l'axe cortico-striatal. Par exemple, contrairement aux fonctions motrices et à la mémoire spatiale des souris R6/1 qui paraissent relativement préservées dans notre étude à 14 semaines, Brooks et collaborateurs (2012) ont décrit des déficits moteurs et cognitifs dépendants de l'hippocampe chez les souris R6/1 dès l'âge de 12 semaines (Brooks et al., 2012). Ils ont testé les performances cognitives des souris en piscine de Morris, mais ils n'ont pas évalué les fonctions cognitives associées au striatum. Rattray et collaborateurs (2013) ont quant à eux, décrit une altération du phénotype moteur des souris R6/1 dans le test du rotarod dès l'âge de 11 semaines (Rattray et al., 2013b). Ils ont également testé la flexibilité cognitive des souris à l'aide d'un labyrinthe aquatique en T, dans lequel ils ont positionné une plateforme cachée. Lors d'une première phase d'apprentissage, la position de la plateforme était changée aléatoirement à chaque essai mais celle-ci était toujours indiquée. La flexibilité cognitive a été évaluée avec un deuxième apprentissage au cours duquel les souris étaient exposées à la même situation, à la seule différence que l'indice n'était plus indicatif de la localisation de la plateforme car il était systématiquement positionné dans le bras opposé de celle-ci. Dans cette tâche impliquant l'axe cortico-striatal, les souris R6/1 présentaient un déficit cognitif à l'âge de 15 semaines (Rattray et al., 2013b), suggérant une altération de la fonction striatale, ce qui est cohérent avec le déficit de mémoire procédurale dépendant du striatum que nous avons décrit chez les souris R6/1 à 11 et 14 semaines.

L'hétérogénéité des résultats de ces différentes études comportementales peut être expliquée par la variabilité des tests et des protocoles utilisés, ainsi que par la variabilité du fond génétique des souris, qui est mixte (CBA X C57BL/6) dans l'étude de Rattray et

## Discussion

collaborateurs (2013) et pur (C57BL/6) dans notre étude et celle de Brooks et collaborateurs (2012). La taille de l'expansion CAG joue également un rôle dans l'hétérogénéité des résultats, celle-ci pouvant varier d'une lignée R6/1 à l'autre de par son instabilité : 115 CAG ont été observés dans l'article décrivant la création du modèle R6/1 (Mangiarini et al., 1996), 127 CAG dans l'étude de Brooks et collaborateurs (2012), 123 CAG pour Rattray et collaborateurs (2013) et nos souris R6/1 avaient une expansion de 140 CAG quand nous avons réalisé notre étude.

Dans le cadre de la MH, une seule étude a été précédemment réalisée avec le labyrinthe en double-H : Kirch et collaborateurs (2013) ont testé la mémoire procédurale d'un rat modèle de la MH (TgHD) à l'aide de ce dispositif. Toutefois, les résultats obtenus ne mettaient pas en évidence un déficit de mémoire procédurale, probablement lié au fait que les rats TgHD utilisés dans l'étude ont un phénotype comportemental très modéré (Kirch et al., 2013).

Par ailleurs, une seule étude réalisée avec des souris R6/2 (Ciamei and Morton, 2009) rapporte des conclusions similaires à celles que nous avons décrites avec les souris R6/1 dans le labyrinthe en double-H. Dans cette étude, les auteurs ont utilisé une adaptation du test de la piscine de Morris : les souris étaient entraînées à rejoindre une plateforme indiquée qui, lors du rappel, était déplacée par une rotation de 180°. Une plateforme supplémentaire, cachée, était par ailleurs placée à la position initiale de la plateforme indiquée. Les souris allant sur la plateforme indiquée utilisaient ainsi une stratégie de recherche basée sur un comportement dirigé vers un but (R-O) nécessitant l'engagement du striatum, et celles allant sur la plateforme cachée utilisaient une stratégie basée sur l'utilisation des indices visuels dépendante de l'hippocampe. Les résultats de Ciamei et Morton (2009) suggèrent un déficit de la stratégie striatale au profit de la stratégie hippocampique. Toutefois, contrairement à notre protocole de double-H où les souris apprennent une séquence motrice et engagent le DLS, les travaux de Ciamei et Morton (2009) n'évaluent pas strictement un comportement basé sur l'utilisation de la mémoire procédurale. En effet, en apprenant à nager vers une plateforme indiquée, les souris mettaient en œuvre un comportement dirigé vers un but qui engageait principalement le DMS et non le DLS. De plus, aucune analyse histologique ou transcriptionnelle n'a été réalisée dans cette étude permettant d'associer des corrélats moléculaires aux stratégies comportementales utilisées par les souris lors de la tâche.

## Discussion

Plusieurs études réalisées chez l'Homme ont évalué la mémoire procédurale de patients Huntington, mais les résultats sont hétérogènes. Contrairement aux résultats que nous avons obtenus avec les souris R6/1, les travaux de Majerova et collaborateurs en 2012 ne montrent pas de déficit de mémoire procédurale chez les patients Huntington dans un dispositif analogue à la piscine de Morris chez les souris. Dans ce test, les sujets devaient localiser un but sur le sol d'une large enceinte circulaire entourée d'un rideau bleu foncé. Les auteurs ont testé trois protocoles : un premier protocole spatial, avec des indices visuels positionnés sur le rideau, sans indication concernant le point de départ qui était modifié aléatoirement au cours du test ; un second protocole procédural, sans indices visuels mais avec une indication de la position de départ, constante au cours de l'essai ; un troisième protocole mixte, avec des indices visuels et une indication du point de départ gardé constant durant le test. Les résultats montrent que les performances de navigation spatiale des patients sont préservées dans les stades précoces de la MH et se détériorent ensuite dans les stades plus tardifs, tout comme les performances de navigation procédurale (Majerova et al., 2012). Cependant, la petite taille de l'effectif considéré limite les conclusions de l'étude.

D'autre part, une étude d'imagerie fonctionnelle a mis en évidence que les patients Huntington présentaient une baisse d'activité striatale lors d'une tâche de reconnaissance d'itinéraire, tandis que celle de l'hippocampe serait augmentée pour maintenir des performances équivalentes à celles des sujets sains (Voermans et al., 2004). L'hippocampe semblerait donc compenser l'altération du striatum, comme le montrent nos résultats obtenus avec les souris R6/1.

Les résultats des études cliniques, combinées à ceux que nous avons obtenus avec les souris R6/1, suggèrent qu'il serait intéressant de tester les performances de patients atteints de la MH dans une version du labyrinthe en double-H adaptée à l'Homme. Une version virtuelle de cette tâche comportementale a été testée de façon préliminaire au laboratoire (J-C Cassel ; O. Desprès).

## 2. SIGNATURES TRANSCRIPTIONNELLES DU STRIATUM INDUITES LORS DE LA FORMATION D'UNE MEMOIRE PROCEDURALE

Nous avons montré que la formation d'une mémoire procédurale engendrait une expression dynamique de gènes dans les neurones et les cellules gliales du striatum des souris WT, caractérisée par au moins deux vagues transcriptionnelles. La première vague contient des gènes qui codent principalement pour des facteurs de transcription, en particulier des IEGs (facteurs AP-1, facteurs de la famille *Egr*). La seconde vague de transcription induite par l'activité neuronale inclut des gènes effecteurs associés à des processus impliqués dans la communication cellulaire et la plasticité neuronale.

Plusieurs études se sont intéressées à ces réponses transcriptionnelles induites par une stimulation neuronale. Les comparaisons entre études sont difficiles car les paradigmes expérimentaux sont très variables d'une étude à l'autre : les modèles (*in vivo*, *in vitro*), les tissus cérébraux (cortex, hippocampe), la nature de la stimulation neuronale (comportementale, pharmacologique) ou encore les délais utilisés entre la stimulation et les analyses d'expression génique varient (Flavell and Greenberg, 2008; Benito et al., 2015; Mardinly et al., 2016; Hrvatin et al., 2018; Yap and Greenberg, 2018; Fernandez-Albert et al., 2019). L'induction extrêmement rapide des IEGs suggère que leur activation ne dépend pas de la synthèse des protéines, mais repose plutôt sur des facteurs de transcription préexistants qui sont activés rapidement, entraînant ainsi la transcription des IEGs (Benito et al., 2015; Mardinly et al., 2016). Parmi ces facteurs sont retrouvés CREB et SRF qui contrôlent l'expression des facteurs AP-1 (*Fos* et *Fosb* par exemple) et des gènes de la famille *Egr* (Kim et al., 2010; Benito et al., 2015; Yap and Greenberg, 2018). Il est décrit que les gènes induits lors de la deuxième vague plus tardive sont spécifiques du type de neurone activé et codent pour les protéines effectrices qui régulent les processus cellulaires liés à la plasticité synaptique (Mardinly et al., 2016; Hrvatin et al., 2018; Jaeger et al., 2018). Cette vague transcriptionnelle tardive reste peu caractérisée dans la littérature et résulterait de l'activation de gènes cibles des facteurs de transcription induits lors de la première vague, tels que les facteurs de la famille AP-1 (*Fos*, *Jun*, *Fosb*, *Fosl1*, *Fosl2*, *Junb*, *Jund*) ou *Egr* (*Egr1*, *Egr2*, *Egr3*, *Egr4*) (Vierbuchen et al., 2017; Hrvatin et al., 2018; Yap and Greenberg, 2018).

## Discussion

Les études évaluant la dynamique d'induction des gènes à l'échelle du transcriptome ont été réalisées dans le cortex ou l'hippocampe de souris. Notre étude est la première à évaluer cette dynamique dans le striatum et à caractériser les réponses transcriptionnelles au cours de plusieurs jours d'apprentissage. Nos résultats présentent des similitudes avec les travaux récents de Jaeger et collaborateurs (2018) réalisés dans le DG de l'hippocampe de souris. Dans cette étude, les auteurs ont exposé les souris à un nouvel environnement et ont ensuite réalisé un séquençage des ARNs à partir des noyaux du DG marqués par l'expression protéique des gènes *Fos* et/ou *Arc*. Les protéines Fos et Arc marquent les neurones activés respectivement à des délais de 1h et 5h après la tâche comportementale. Les auteurs de l'étude ont observé que les gènes induits précocement (1h après stimulation) sont enrichis dans des termes associés à la régulation de la transcription tandis que les gènes induits plus tardivement (5h après stimulation) présentent une signature fonctionnelle liée à la membrane synaptique et à la signalisation calcique, qui pourrait refléter des mécanismes de plasticité synaptique (Jaeger et al., 2018), comme nous l'avons décrit dans le striatum de souris après 5 jours d'apprentissage dans le labyrinthe en double-H. Malgré des tâches comportementales différentes et des délais d'analyse différents, ces résultats et ceux que nous avons obtenus dans le striatum confortent l'hypothèse que l'activité neuronale est accompagnée d'un changement dynamique du type de gènes induits au cours du temps. Cette dynamique débiterait par l'expression précoce de gènes régulateurs de la transcription (première vague transcriptionnelle) et évoluerait vers l'expression de gènes effecteurs impliqués dans la plasticité synaptique (deuxième vague transcriptionnelle).

Une hypothèse quant au rôle des gènes « maintenus » au cours de l'activité neuronale serait qu'ils pourraient jouer un rôle dans la transition entre les processus biologiques de la réponse transcriptionnelle précoce et tardive après une stimulation neuronale. Les gènes « maintenus » pourraient moduler l'expression de gènes impliqués de la plasticité neuronale dans le striatum, comme cela a été suggéré dans d'autres études (Lopez-Atalaya and Barco, 2014; Halder et al., 2016; Duke et al., 2017; Fernandez-Albert et al., 2019).

Cette dynamique transcriptionnelle est anormale chez les souris R6/1. Nos résultats montrent pour la première fois une altération des régulations transcriptomiques dans le striatum d'un modèle souris de la MH, induites par une situation d'apprentissage. En effet, contrairement aux souris WT, très peu de gènes sont exprimés en réponse au processus de



## Discussion

mémorisation et ceux-ci ne présentent pas de signature fonctionnelle significative. De façon intéressante, les IEGs *Fos* et *Fosb* sont augmentés après stimulation des neurones du striatum des souris R6/1, mais également *Egr1*, bien que son niveau d'expression soit globalement diminué par rapport aux souris WT. En revanche, le nombre de gènes tardivement exprimés au cours de l'apprentissage est largement diminué chez les souris R6/1 par rapport aux souris WT. Bien que l'altération du nombre de gènes exprimés en réponse au processus de mémorisation chez les souris R6/1 soit globale, les catégories de gènes induits dans le striatum Huntington semblent différentiellement affectées : la catégorie des gènes « tardifs » dans le striatum des souris R6/1 ne comporte pas les mêmes gènes que celle des souris WT, la catégorie des gènes « précoces » est, en revanche, essentiellement commune aux gènes exprimés chez les souris WT.

Nos données RNA-seq générées en condition basale montrent que le transcriptome striatal des souris R6/1 âgées de 14 semaines est fortement altéré ; en particulier, les gènes de l'identité neuronale sont diminués. Nos données épigénomiques (ChIP-seq, R. Alcalá Vida & K. Merienne, communication personnelle) montrent également que l'épigénome striatal est affecté chez ces souris. Ces résultats amènent à l'hypothèse que l'inhibition de la réponse transcriptionnelle induite par la situation d'apprentissage chez les souris R6/1 est la conséquence des altérations transcriptionnelles et/ou épigénétiques observées en condition basale.

Pour la première fois, nous avons montré dans le striatum que l'activité neuronale s'accompagne de changements dynamiques du transcriptome chez des souris WT. De plus, nous avons mis en évidence qu'en réponse à une situation d'apprentissage chez une souris modèle de la MH, l'induction du transcriptome striatal est altérée. Ce dysfonctionnement transcriptionnel corrèle avec le déficit de mémoire procédurale des souris R6/1 et pourrait être causé par la dérégulation de l'épigénome du striatum Huntington (Achour et al., 2015; Francelle et al., 2017; Le Gras et al., 2017; Langfelder et al., 2018; Merienne et al., 2019). Pour compléter notre étude, des données de ChIP-seq ont été générées au laboratoire en condition basale et après 5 jours d'apprentissage dans le labyrinthe en double-H, à partir du striatum des souris WT et R6/1. Ces données sont en cours d'analyse et pourraient nous permettre de corréler les changements épigénétiques causés par l'activité neuronale avec l'induction du

transcriptome striatal. Une meilleure compréhension de ces mécanismes permettrait d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

### **3. EVALUATION DE L'EFFET DE LA MOLECULE CSP-TTK21 SUR LE TRANSCRIPTOME STRIATAL ET LA MEMOIRE PROCEDURALE DES SOURIS R6/1**

Nous avons montré que le traitement des souris R6/1 avec la molécule CSP-TTK21 (Chatterjee et al., 2013, 2018), un activateur des histones acétyltransférases CBP/p300, améliorait partiellement leur déficit de mémoire procédurale. L'effet comportemental de la molécule s'accompagne d'une modulation du transcriptome striatal en faveur d'une activation du métabolisme du cholestérol et vraisemblablement des mécanismes de défense cellulaire. Ces changements transcriptionnels et comportementaux corrélient avec une augmentation globale et modérée de l'acétylation de H3K27, spécifiquement au niveau des enhanceurs des cellules gliales du striatum des souris R6/1.

Notre étude est la première à avoir évalué l'effet d'un activateur de HAT, la molécule CSP-TTK21, sur un modèle murin de la MH. Cette stratégie potentiellement alternative aux HDACi a révélé un effet bénéfique sur la mémoire procédurale des souris R6/1. Nos données montrent aussi une tendance à l'amélioration des performances motrices des souris R6/1 après traitement avec la molécule CSP-TTK21. De nombreuses études utilisant des HDACi ont montré une amélioration des déficits moteurs chez des souris modèles de la MH (Ferrante et al., 2003; Hockly et al., 2003; Mielcarek et al., 2011; Jia et al., 2012b, 2016; Chopra et al., 2016; Suelves et al., 2017), mais très peu d'études se sont intéressées à l'effet des HDACi sur le phénotype cognitif Huntington. Les travaux de Suelves et collaborateurs (2017) ont montré une amélioration des déficits cognitifs observés dans des tâches de reconnaissance et de localisation d'objets, dépendantes de l'hippocampe (Suelves et al., 2017). Notre étude est la seule à évaluer l'effet thérapeutique d'une stratégie épigénétique sur les fonctions cognitives dépendantes du striatum, dans un modèle murin de la MH. Par ailleurs, les HDACi manquent de spécificité et peu d'études à l'échelle du génome ont été réalisées pour évaluer leur impact sur le transcriptome et l'épigénome. De plus, ils présentent une certaine toxicité limitant leur usage à long terme (Boutillier et al., 2003; Sasakawa et al., 2005; Dietz and Casaccia, 2010; Ganai et al., 2016). La molécule CSP-TTK21 est un composé qui n'avait encore jamais été testé sur un modèle murin de la MH. Nos données obtenues dans le striatum des souris R6/1 et

## Discussion

celles obtenues dans l'hippocampe d'un modèle murin de la maladie d'Alzheimer indiquent que cet activateur de CBP n'entraîne pas d'effets secondaires toxiques (Chatterjee et al., 2013, 2018).

Seules deux études *in vivo* basées sur l'utilisation du composé CSP-TTK21 chez la souris ont été réalisées précédemment. L'une a été menée avec des souris WT (Chatterjee et al., 2013) et l'autre avec un modèle murin de la maladie d'Alzheimer (Chatterjee et al., 2018). Les résultats de ces études démontrent un effet bénéfique du traitement avec la molécule CSP-TTK21 sur les performances cognitives des souris. Ces travaux ont été réalisés sur des fonctions cognitives dépendantes de l'hippocampe. Néanmoins, dans le cadre de la MH, nous avons également observé une amélioration du phénotype cognitif associé au striatum des souris R6/1 CSP-TTK21. Chatterjee et collaborateurs (2018) ont analysé le transcriptome de souris modèles de la maladie d'Alzheimer, les souris THY-Tau22, traitées avec la molécule CSP-TTK21. Ils ont décrit une restauration de l'expression de gènes impliqués dans l'apprentissage et la mémoire dans l'hippocampe des souris, notamment des IEGs (Chatterjee et al., 2018). Cet effet s'accompagne d'une normalisation de la signature épigénomique dans l'hippocampe des souris Alzheimer traitées, avec une augmentation de l'acétylation de H2B au niveau de gènes associés à des processus neuronaux (Chatterjee et al., 2018). Il est important de noter que la différence de résultats entre notre étude et celle de Chatterjee et collaborateurs (2018) peut être liée au tissu cérébral analysé (hippocampe vs striatum), mais également à la sévérité du modèle R6/1 par rapport au modèle THY-Tau22 dont le transcriptome et l'épigénome sont faiblement altérés en condition basale par rapport aux souris R6/1 (Fischer, 2014; Benito et al., 2015; Chatterjee et al., 2018).

Dans notre étude, au niveau épigénétique, nous nous attendions à augmenter spécifiquement l'acétylation de H3K27 au niveau des enhanceurs neuronaux afin de restaurer l'expression des gènes de l'identité neuronale, sous-exprimés dans le striatum Huntington. De façon inattendue, nos résultats mettent en évidence une augmentation de H3K27ac spécifiquement au niveau des enhanceurs des cellules gliales. Cet effet corrèle avec une modulation du transcriptome striatal des souris R6/1 traitées avec la molécule CSP-TTK21, particulièrement au niveau des cellules gliales. Le traitement des souris R6/1 n'a aucun effet sur l'expression génique et protéique des marqueurs d'identité des neurones du striatum (par exemple *Drd1*, *Drd2*, *Pde10a*, *Darpp32*). En revanche, l'expression de gènes impliqués dans le

## Discussion

stress oxydant (par exemple *Romo1*, *Bad*, *Atp5d*, *Ndufa13*) est normalisée par la molécule CSP-TTK21.

De façon inattendue, nos données transcriptomiques montrent un effet significatif du composé CSP-TTK21 sur la biosynthèse du cholestérol. Cet effet n'a pas été observé dans l'hippocampe des souris modèles de la maladie d'Alzheimer dans l'étude de Chatterjee et collaborateurs (2018).

Le cholestérol étant un composant structural essentiel de la myéline et des membranes cellulaires, il est nécessaire au maintien de la morphologie des neurones et des astrocytes, mais il est également impliqué dans la transmission synaptique, le guidage axonal et la physiologie des neurones (Posse de Chaves et al., 1997; Björkhem et al., 2004; Dietschy and Turley, 2004; Goritz et al., 2005; Pfrieger and Ungerer, 2011; Zhang and Liu, 2015; Hussain et al., 2019). Le cholestérol est synthétisé de manière endogène dans le cerveau, particulièrement dans les astrocytes et, de manière moins efficace, dans les neurones (Björkhem et al., 2004; Nieweg et al., 2009; Pfrieger and Ungerer, 2011; Zhang and Liu, 2015; Hussain et al., 2019). Le fonctionnement neuronal dépend donc principalement du cholestérol exogène synthétisé en excès par les astrocytes pour répondre aux besoins fonctionnels des neurones (Zhang and Liu, 2015).

La MH est caractérisée par une altération de l'homéostasie du cholestérol. L'expression des gènes impliqués dans sa synthèse (par exemple *HmgCoaR*, *CYP51*) et la quantité de métabolites associés au cholestérol sont diminués dans le striatum et le cortex de modèles murins de la MH, mais également dans les tissus corticaux *post-mortem* des patients (Valenza et al., 2005; Kreilau et al., 2016; Shankaran et al., 2017). Par des approches *in cellulo*, les travaux de Valenza et collaborateurs (2015) démontrent que les astrocytes « Huntington » affectent la fonction neuronale en raison de leur synthèse réduite de cholestérol (Valenza et al., 2015b). De façon intéressante, nous avons observé que la molécule CSP-TTK21 avait un impact sur les gènes des cellules gliales et normalisait l'expression de plusieurs gènes codants pour des enzymes limitantes de la synthèse du cholestérol dans le striatum des souris R6/1. L'effet transcriptomique de la molécule CSP-TTK21 sur la biosynthèse du cholestérol pourrait sous-tendre l'amélioration partielle de la mémoire procédurale des souris R6/1 CSP-TTK21 observée dans le labyrinthe en double-H.

## Discussion

En effet, nos résultats corrèlent avec ceux de Valenza et collaborateurs (2015) qui ont testé l'effet de l'administration exogène de cholestérol sur le phénotype de souris R6/2 *via* des nanoparticules biodégradables lui permettant de traverser la barrière hémato-encéphalique. Les auteurs ont décrit que la supplémentation en cholestérol améliorait le dysfonctionnement synaptique des MSNs et les déficits cognitifs des souris R6/2 dans une tâche de reconnaissance d'un nouvel objet qui dépend de l'hippocampe (Valenza et al., 2015a). En revanche, ils n'ont pas testé l'effet de ce traitement sur les fonctions cognitives dépendantes du striatum. La supplémentation en cholestérol ne semblait pas améliorer les déficits moteurs des souris R6/2 (Valenza et al., 2015a). L'effet bénéfique sur les fonctions cognitives mais non sur les fonctions motrices pourrait être associé à des rôles spécifiques du cholestérol dans la fonction neuronale qui ne seraient pas modifiés par l'activation de sa biosynthèse dans les cellules gliales. Une autre hypothèse serait qu'une augmentation du cholestérol ne serait pas suffisante pour améliorer toutes les anomalies associées à la neuropathologie des modèles murins de la MH.

Dans la MH, le dysfonctionnement du métabolisme du cholestérol ne se traduit pas uniquement par une réduction de sa synthèse, mais également par une accumulation de cholestérol, particulièrement délétère pour les neurones (Trushina et al., 2006; Del Toro et al., 2010; Leoni and Caccia, 2015). Une baisse de l'expression de l'enzyme limitante CYP46A1, impliquée dans la dégradation du cholestérol, une dérégulation des facteurs de transcription (LXR, SREBP) impliqués dans les boucles de rétro-contrôle de la synthèse du cholestérol, ou encore l'altération du transport du cholestérol, contribuent à son accumulation dans les neurones (Valenza et al., 2010; Leoni and Caccia, 2015; Boussicault et al., 2016, 2018; Kreilau et al., 2016; Kacher et al., 2019).

En complément des travaux visant à stimuler la biosynthèse du cholestérol, d'autres études ont cherché à activer sa dégradation. Récemment, une restauration de la transcription de l'enzyme de dégradation du cholestérol CYP46A1 dans le striatum Huntington a montré un effet neuroprotecteur (Boussicault et al., 2016, 2018; Kacher et al., 2019). Les travaux de Boussicault et collaborateurs (2016) mettent en évidence une amélioration des déficits moteurs de souris R6/2 dont l'expression de CYP46A1 a été restaurée, ainsi qu'une réduction de l'atrophie neuronale et de la quantité d'agrégats de HTT mutée (Boussicault et al., 2016). Cette stratégie augmente également l'expression neuronale des enzymes de synthèse du

## Discussion

cholestérol, du facteur de transcription SREBP2 et de la protéine ApoE impliquée dans le transport du cholestérol (Kacher et al., 2019). Ces résultats indiquent une amélioration globale du métabolisme du cholestérol corrélée à une amélioration de la neuropathologie du striatum et des déficits moteurs des modèles murins de la MH. De façon intéressante, la restauration de l'expression de CYP46A1 entraîne également la normalisation de l'expression de gènes striataux dérégulés par la mutation Huntington et impliqués dans la neurotransmission et l'activité synaptique (Kacher et al., 2019), un effet que nous n'avons pas observé avec la molécule CSP-TTK21.

Par rapport aux résultats de ces études, la molécule CSP-TTK21 a un effet plus modéré sur le phénotype global des souris R6/1 qui peut être expliqué par un impact du traitement au niveau transcriptomique et épigénétique essentiellement sur les cellules gliales du striatum, tandis que la restauration de l'expression de CYP46A1 est réalisée directement dans les MSNs. Nos données transcriptomiques montrent que la molécule CSP-TTK21 n'augmente pas l'expression des enzymes de dégradation du cholestérol, telles que CYP46A1, mais elle semble agir sur des facteurs associés au transport du cholestérol.

En effet, la molécule CSP-TTK21 tend à moduler l'expression de gènes codant pour des facteurs LXR (*Nr1h2*) et SREBP (*Srebf1*). Ces facteurs jouent un rôle dans les boucles de rétro-contrôle de la synthèse de cholestérol et leur activité est directement modulée par la quantité endogène de cholestérol (Leoni and Caccia, 2015; Mouzat et al., 2019). Ces gènes sont sur-exprimés chez les souris R6/1 par rapport aux souris WT, probablement en raison de l'altération de la biosynthèse du cholestérol dans le striatum Huntington. Leur expression étant normalisée par la molécule CSP-TTK21, le traitement pourrait favoriser une réduction de l'accumulation de cholestérol dans les cellules du striatum des souris R6/1. Cette hypothèse est également appuyée par l'effet de traitement sur l'expression du gène codant pour la cavéoline-1 (*Cav1*), une protéine membranaire constitutive des cavéoles, qui lie le cholestérol et joue un rôle important dans son transport (Frank et al., 2006). En effet, la cavéoline-1, par sa capacité à migrer des cavéoles vers le réticulum endoplasmique, pourrait directement transférer le cholestérol nouvellement synthétisé du réticulum endoplasmique vers la membrane plasmique (Smart et al., 1996; Frank et al., 2006; Qin et al., 2016). La protéine SCP-2, en se liant au cholestérol, permet également son transport à la membrane et son action est améliorée par sa liaison avec la cavéoline-1 (Zhou et al., 2004). La baisse

## Discussion

d'expression de la cavéoline-1 chez les souris R6/1 par rapport aux souris WT favoriserait donc l'accumulation du cholestérol dans les cellules. Nos données transcriptomiques montrent que l'expression du gène codant pour la cavéoline-1 est normalisée avec le traitement CSP-TTK21, appuyant l'hypothèse que la molécule pourrait avoir un effet sur l'accumulation du cholestérol intracellulaire.

Comme pour la majorité des modificateurs épigénétiques testés dans le cadre de la MH, le mécanisme d'action du composé CSP-TTK21 nécessite d'être caractérisé plus en détail. Il serait donc intéressant de séquencer les ARNs issus spécifiquement des MSNs et des cellules gliales des souris R6/1 CSP-TTK21 et de mesurer la concentration du cholestérol et ses métabolites par spectrométrie de masse dans ces deux types cellulaires.

Néanmoins, sur la base de nos données transcriptomiques, une hypothèse sur le mode d'action de la molécule CSP-TTK21 dans le striatum des souris R6/1 a pu être établie. En effet, nos résultats indiquent une tendance à l'augmentation de l'expression des enzymes acétyl-CoA synthétases *Acss1* et *Acss2*, chez les souris R6/1 CSP-TTK21 par rapport aux souris R6/1 CSP. L'acétyl-CoA est un métabolite précurseur de la biosynthèse du cholestérol et est également impliqué dans l'acétylation des histones, de par son rôle de donneur de groupements acétyles (Pietrocola et al., 2015). En augmentant l'acétylation des histones *via* l'activation de l'activité HAT de CBP, la molécule CSP-TTK21 pourrait indirectement entraîner une augmentation de la synthèse d'acétyl-CoA, ce qui aurait pour conséquence d'activer le métabolisme du cholestérol.

Plusieurs études montrent que l'acétylation des histones est un mécanisme sensible à la disponibilité en acétyl-CoA (Takahashi et al., 2006; Cai et al., 2011; Gut and Verdin, 2013; Moussaieff et al., 2015; Pietrocola et al., 2015; Mews et al., 2017; Sidoli et al., 2019). L'interaction dynamique entre le métabolisme et l'acétylation des histones semble être un mécanisme clé, impliqué dans diverses fonctions cellulaires comme la transcription globale des gènes, la glycolyse ou encore la résistance au stress oxydant (Takahashi et al., 2006; Wellen et al., 2009; Cai et al., 2011; Shimazu et al., 2013; Moussaieff et al., 2015; Pietrocola et al., 2015; Mews et al., 2017).

Ces mécanismes sont encore peu décrits dans le cadre des maladies neurodégénératives et aucune étude n'a évalué le lien entre l'altération du métabolisme

## Discussion

énergétique et les dérégulations épigénétiques et transcriptionnelles dans la MH. Néanmoins, de façon intéressante, une étude sur les tumeurs cérébrales montre que l'acétate fonctionne comme un régulateur épigénétique, permettant d'améliorer la synthèse des lipides et favorisant la survie des cellules tumorales en condition hypoxique (Gao et al., 2016). Dans leur étude, Gao et collaborateurs (2016) ont traité des cellules tumorales en condition hypoxique avec de l'acétate. Ils ont observé que l'acétate entraînait une augmentation de l'acétylation de H3K9, H3K27 et H3K56. Cet effet est corrélé à une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme des lipides, dont la biosynthèse du cholestérol, ainsi qu'une augmentation de l'expression de *Acss1* et *Acss2* (Gao et al., 2016). Ces mécanismes sont proches de ceux que nous avons décrits avec la molécule CSP-TTK21 qui, en augmentant H3K27ac, stimule préférentiellement l'expression de *Acss1*, *Acss2* et l'expression de gènes impliqués dans la biosynthèse du cholestérol. Les auteurs ont également décrit une augmentation de la survie cellulaire corrélée à l'activation du métabolisme lipidique par le traitement à l'acétate (Gao et al., 2016). Parallèlement à nos résultats, les mécanismes décrits par Gao et collaborateurs (2016) suggèrent que la molécule CSP-TTK21 pourrait améliorer la survie neuronale chez les souris R6/1 en activant le métabolisme du cholestérol.

Une étude récente démontre un lien entre métabolisme énergétique et plasticité neuronale, en mettant en évidence un rôle de l'enzyme ACSS2 dans l'acétylation des histones et l'expression des gènes de mémoire et de plasticité neuronale (par exemple *Arc*, *Egr2*, *Nr2f2*, *Fos*, *Sgk1*) (Mews et al., 2017). Mews et collaborateurs (2017) ont réalisé des analyses transcriptomiques et épigénomiques à l'aide d'une lignée de cellules cathécholaminergiques de souris qui se différencient en cellules excitables de façon semblable aux neurones fonctionnels. Les auteurs ont observé que la différenciation des cellules entraînait la translocation d'ACSS2, initialement cytoplasmique, dans le noyau, ainsi qu'une augmentation de l'expression de gènes neuronaux. Leurs données de CHIP-seq révèlent que ces changements transcriptomiques sont associés à une augmentation de l'acétylation des histones (H3K9ac, H4K5ac, H4K12ac) au niveau de ces gènes. Inversement, une baisse de l'expression d'*Acss2* entraîne une réduction de l'expression des gènes neuronaux induits par la différenciation, une baisse de H3K27ac, de H3K9ac et de la quantité d'acétyl-CoA. Les auteurs ont ensuite réalisé une analyse de la liaison d'ACSS2 à la chromatine par CHIP-seq et ont observé que les régions associées à une liaison d'ACSS2 correspondent aux gènes



## Discussion

neuronaux induits par la différenciation. De plus, ces régions sont enrichies en motifs YY1 (*Yin Yang1*) recrutant les HAT CBP et p300 (Aoyama et al., 2010) et présentent une augmentation de l'acétylation des histones. Ainsi, ACSS2, en se liant à la chromatine au niveau du promoteur des gènes, pourrait fournir une source locale d'acétyl-CoA aux HAT, favorisant l'acétylation des histones et la transcription des gènes neuronaux induits par la différenciation cellulaire. Mews et collaborateurs (2017) ont également évalué l'effet d'une réduction de l'expression d'*Acss2*, par une injection virale d'ARNi dans l'hippocampe de souris WT. La réduction de l'expression d'*Acss2* entraîne une altération de la mémoire spatiale des souris dans une tâche de localisation d'objets, associée à une altération de l'induction des gènes de l'hippocampe après la tâche, notamment des IEGs (*Egr2*, *Fos*, *Nr2f2*, *Sgk1*, *Arc*) (Mews et al., 2017).

Cette étude indique qu'ACSS2, une fois transloqué dans le noyau, peut moduler la quantité d'acétyl-CoA et par conséquent, augmenter l'acétylation des histones par liaison directe à la chromatine. Ce mécanisme dans l'hippocampe entraîne l'expression de gènes neuronaux induits par l'apprentissage et la mémoire, modulant ainsi les performances mnésiques des souris au cours d'une tâche comportementale. Nos analyses indiquent que CSP-TTK21 affecte principalement le métabolisme de la glie du striatum chez les souris R6/1 et qu'il ne modifie pas l'expression des IEGs, bien qu'il induise une augmentation de l'expression d'*Acss2*. Ainsi, il est vraisemblable que les mécanismes favorisant le processus de mémoire dans notre étude et dans celle de Mews et collaborateurs (2017) soient de nature très différente, tout en sollicitant ACSS2 dans les deux cas.

## **CONCLUSION & PERSPECTIVES**





## Conclusion & Perspectives

Les travaux que j'ai réalisés au cours de ma thèse apportent de nouveaux éléments sur la compréhension des mécanismes moléculaires sous-jacents aux altérations comportementales associées à la MH. Ma thèse a permis de mettre en évidence une relation de cause à effet entre les troubles comportementaux, en particulier cognitifs, et les dérégulations transcriptionnelles et épigénétiques observées dans le striatum Huntington. Nous avons observé que l'acquisition d'une mémoire procédurale entraînait l'induction séquentielle de vagues transcriptionnelles dans le striatum des souris, favorisant vraisemblablement la plasticité neuronale. Ces mécanismes sont altérés dans le striatum Huntington et corrèlent avec le déficit de mémoire procédurale des souris R6/1. Par ailleurs, en testant pour la première fois dans le cadre de la MH, le potentiel thérapeutique d'un activateur des histones acétyltransférases CBP et p300, nous avons observé qu'une modulation de l'acétylation des histones entraînait des changements transcriptionnels ciblant le métabolisme du cholestérol dans le striatum Huntington, corrélés à une amélioration du phénotype comportemental des souris R6/1.

De nombreuses questions subsistent quant aux mécanismes moléculaires sous-jacents à la plasticité neuronale dans le striatum, mais également dans les autres structures cérébrales. L'apparition de nouveaux outils et méthodes d'analyse au niveau moléculaire ouvre de nouvelles stratégies pour comprendre ces mécanismes. Des approches permettent aujourd'hui d'analyser avec une grande spécificité le transcriptome et l'épigénome d'un type cellulaire spécifique, par exemple en isolant et triant les noyaux provenant d'une population cellulaire particulière (FANS – *Fluorescent-activated nuclei sorting*) (Benito et al., 2015; Fernandez-Albert et al., 2019). Plus récemment, d'autres techniques ont été décrites dans la littérature, comme la microdissection par capture laser (LCM – *Laser Capture Microdissection*) (Cheng et al., 2013a; Merienne et al., 2019) qui permet d'isoler spécifiquement des cellules à partir d'une coupe de tissu. Merienne et collaborateurs (2019) par exemple ont utilisé cette technique pour isoler des populations neuronales de plusieurs souris transgéniques exprimant une protéine fluorescente dans un type cellulaire particulier du striatum (MSNs-D1, MSNs-D2, astrocytes ou microglie). Une approche par purification des ribosomes par chromatographie d'affinité à partir de tissus (TRAP – *Translating Ribosome Affinity Purification*) a également été développée pour réaliser des analyses spécifiques d'un type cellulaire (Dougherty, 2017; Fernandez-Albert et al., 2019). Cette technique est basée sur l'utilisation de souris

## Conclusion & Perspectives

transgéniques exprimant une protéine ribosomale couplée à la protéine fluorescente GFP (*Green-Fluorescent Protein*) dans un type cellulaire spécifique. Les cellules exprimant la GRP sont ensuite sélectionnées avec une colonne d'affinité contenant des billes d'agarose couplées à des anticorps anti-GFP. La technique TRAP permet ainsi l'analyse des ARNm traduits dans un type cellulaire particulier.

Ces approches sont particulièrement intéressantes pour les études évaluant les signatures transcriptionnelles qui diffèrent entre les neurones et les cellules gliales dans la MH ou après une situation d'apprentissage. Il serait donc intéressant, pour compléter notre étude, de réaliser des analyses transcriptomiques sur les noyaux triés de neurones et cellules gliales du striatum des souris WT et R6/1 après un apprentissage dans le labyrinthe en double-H. Il serait également intéressant de caractériser les changements épigénétiques induits par une stimulation neuronale dans le striatum des souris WT et R6/1. Dans ce but, le Dr. Rafael ALCALA VIDA, post-doctorant de notre équipe, a généré des données de CHIP-seq pour les marques H3K27ac et H3K27me3 dans le striatum des souris WT et R6/1 après 5 jours d'entraînement dans le labyrinthe en double-H. L'analyse de ces données est en cours ; elle nous permettra d'évaluer si les changements épigénétiques induits après une stimulation neuronale corrént avec l'induction des vagues transcriptionnelles au cours de l'acquisition d'une mémoire procédurale. Par ailleurs, Rafael ALCALA VIDA a également généré des données de 4C-seq (*Chromosome Conformation Capture-on-Chip*) dans le striatum des souris WT et R6/1 au cours du processus de mémorisation dans le labyrinthe en double-H. Ces données nous permettront de déterminer si les changements transcriptomiques induits par l'activité neuronale corrént avec une modification de la conformation de la chromatine, en particulier au niveau des IEGs et si la mutation Huntington a un impact sur ces régulations.

L'effet de la molécule CSP-TTK21 semblant affecter plus particulièrement les cellules gliales, il serait également intéressant de préciser les signatures transcriptomiques des neurones et des cellules gliales du striatum des souris R6/1.

Par ailleurs, l'effet inattendu de la molécule CSP-TTK21 sur le métabolisme du cholestérol et la synthèse des acétyl-CoA dans le striatum des souris R6/1 ouvre de nouvelles perspectives. En effet, nos données suggèrent que le composé CSP-TTK21 chez les souris R6/1 a pour conséquence d'améliorer le couplage entre métabolisme énergétique et acétylation des histones, en particulier dans les cellules gliales du striatum. Cet effet implique

## Conclusion & Perspectives

possiblement la stimulation du métabolisme de l'acétyl-CoA *via* l'activation d'enzymes telles que ACSS2. Dans ce contexte, l'activation de gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol, en réponse au traitement CSP-TTK21, est peut-être le reflet d'une réponse adaptative, permettant aux cellules gliales du striatum des souris R6/1 de « profiter » du bénéfice énergétique entraîné par la stimulation du métabolisme de l'acétyl-CoA.

ACSS2 est un régulateur transcriptionnel clé dans le couplage entre le métabolisme énergétique et l'acétylation des histones, en particulier dans une situation de stress énergétique où il favorise l'acétylation des histones et la transcription de gènes impliqués dans la survie neuronale (en activant le métabolisme des lipides et l'autophagie) (Gao et al., 2016). Dans l'hippocampe de souris, il a été montré qu'ACSS2 favorise l'acétylation des histones et la transcription de gènes impliqués dans les processus de plasticité synaptique et de mémoire (Mews et al., 2017). Pour compléter notre étude, il serait donc intéressant de manipuler l'expression d'*Acss2* dans les neurones ou les cellules gliales du striatum Huntington afin de caractériser son rôle dans la pathologie et de préciser la relation de cause à effet entre métabolisme énergétique et acétylation des histones.

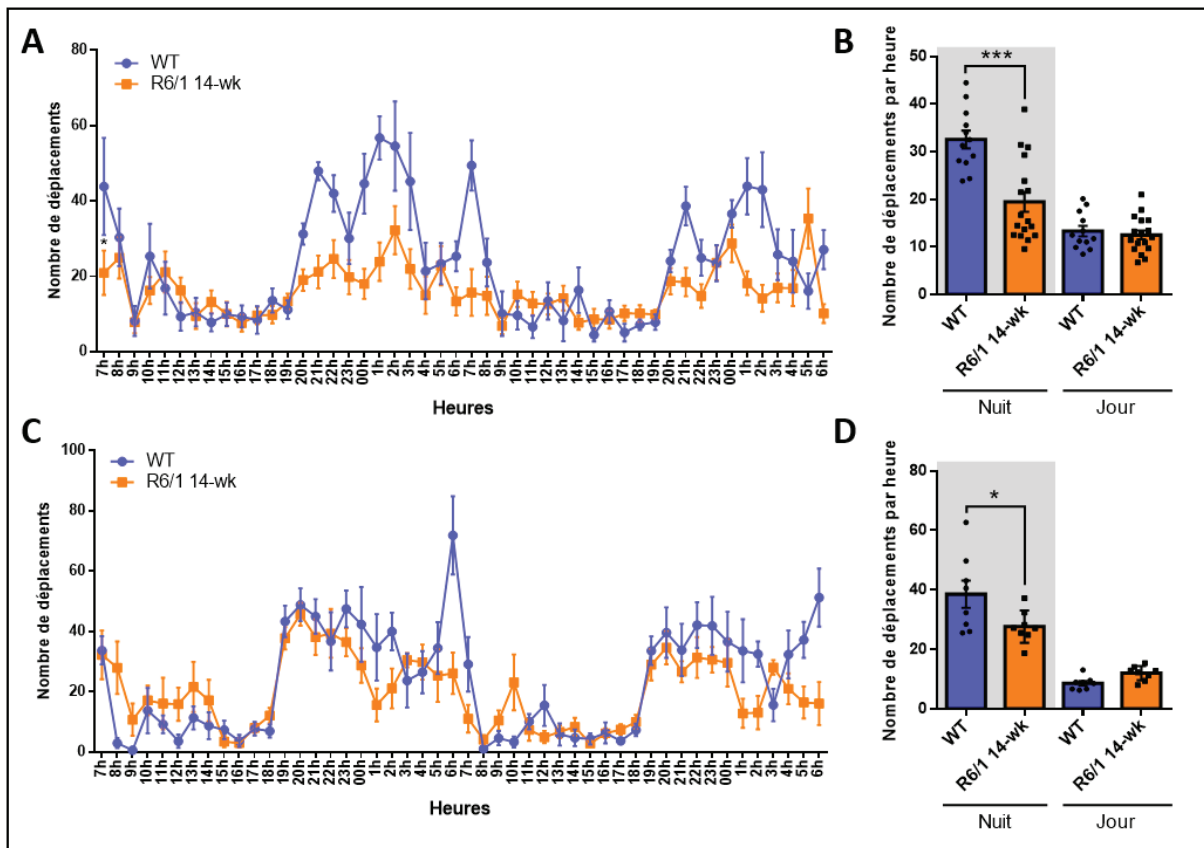


# ANNEXES

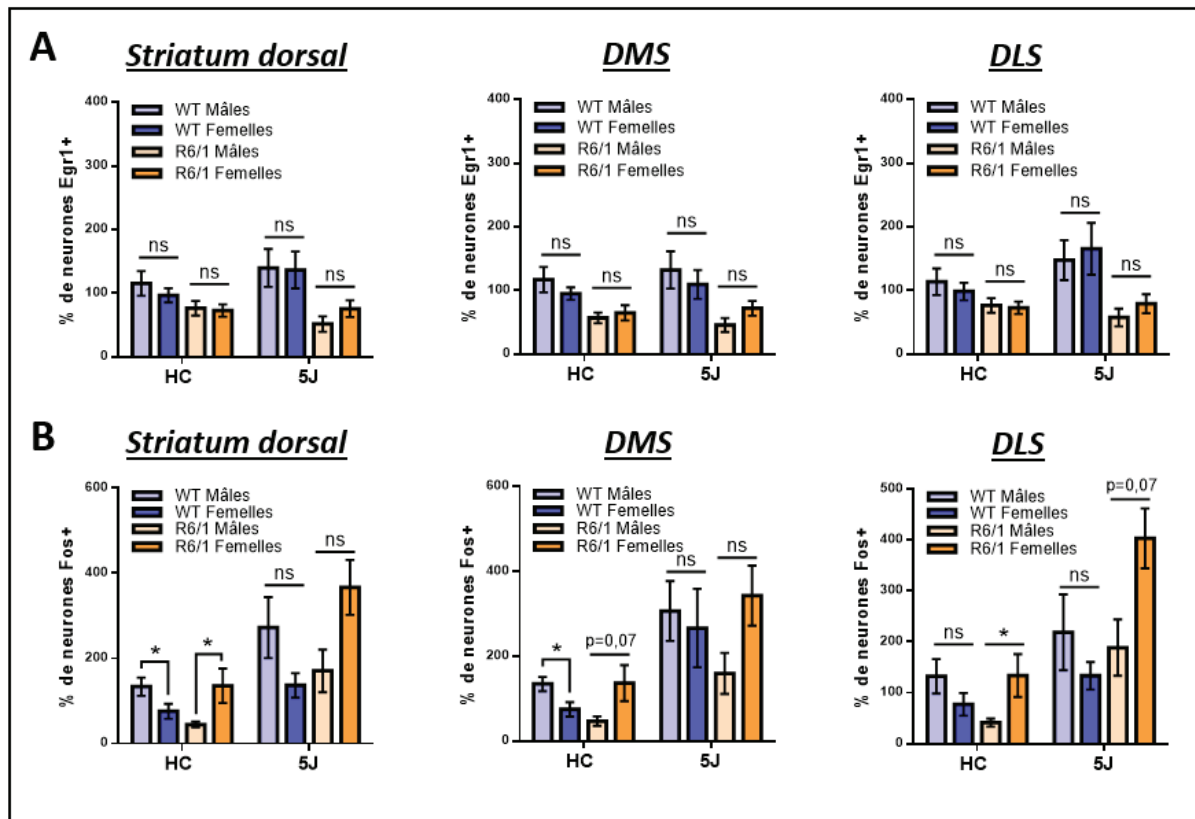






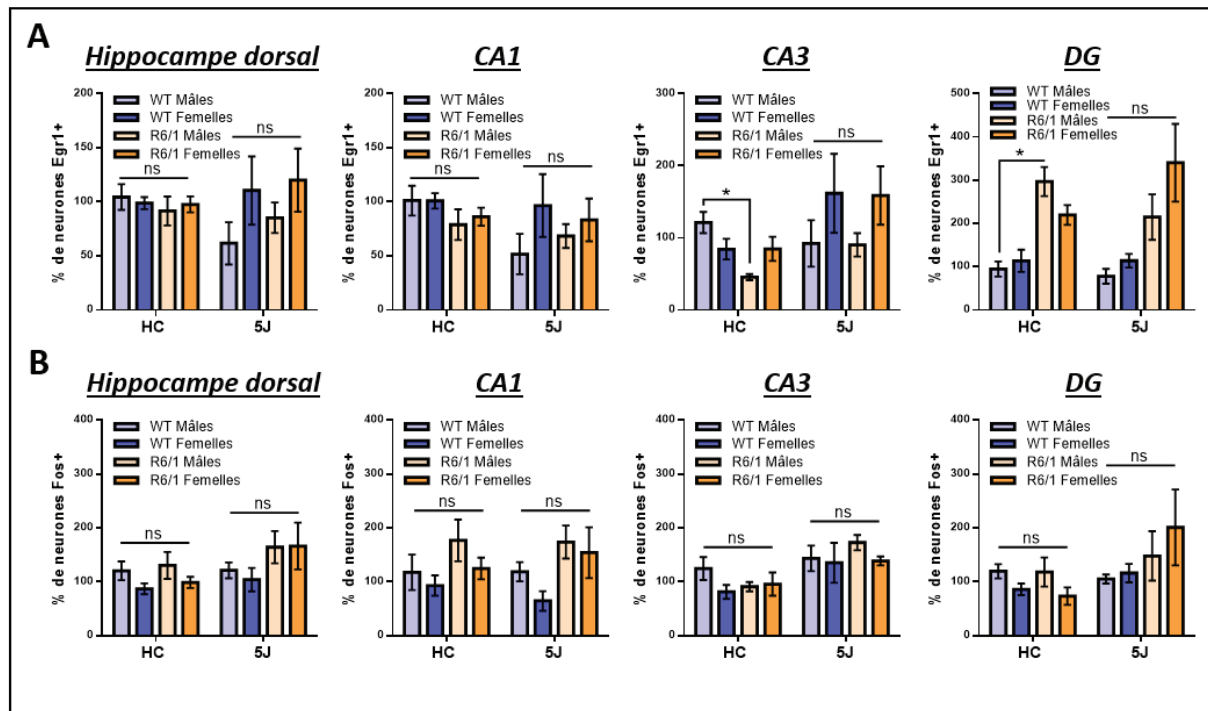


**Annexe 1 : Activité locomotrice spontanée des souris WT et R6/1, mâles et femelles, âgées de 14 semaines.**  
**(A)** Nombre de déplacements des souris WT et R6/1 mâles par heure, mesuré par actographie au cours de 48h (ANOVA à deux facteurs à mesures répétées : effet heures  $F(47, 1269)=8,79$   $p<0,0001$  ; effet génotype  $F(1, 27)=13,61$   $p<0,0001$  ; interaction heures x génotype  $F(47, 1269)=3,24$   $p<0,0001$ ). **(B)** Moyenne des déplacements des souris WT et R6/1 mâles au cours de la nuit (19h-7h) et de la journée (7h-19h) (Test de Kruskal-Wallis, comparaisons multiples avec le test de Dunn :  $k=29,60$   $p<0,0001$ ). **(C)** Nombre de déplacements des souris WT et R6/1 femelles par heure, mesuré par actographie au cours de 48h (ANOVA à deux facteurs à mesures répétées : effet heures  $F(47, 658)=11,44$   $p<0,0001$  ; effet génotype  $F(1, 14)=1,70$   $p=0,21$  ; interaction heures x génotype  $F(47, 658)=2,64$   $p<0,0001$ ). **(D)** Moyenne des déplacements des souris WT et R6/1 femelles au cours de la nuit (19h-7h) et de la journée (7h-19h) (Test de Kruskal-Wallis, comparaisons multiples avec le test de Dunn :  $k=25,45$   $p<0,0001$ ). Effectifs :  $n=12$  WT ♂,  $n=8$  WT ♀,  $n=17$  R6/1 14-wk ♂,  $n=8$  R6/1 14-wk ♀. Les résultats ne diffèrent pas significativement entre les souris mâles et femelles (ANOVA à 2 facteurs à mesures répétées, effet sexe : WT,  $F(1, 18)=0,001$   $p=0,96$  ; R6/1  $F(1, 23)=2,72$   $p=0,11$ ). Statistiques : \*  $p<0,05$  et \*\*\*  $p<0,005$  R6/1 14-wk vs WT.



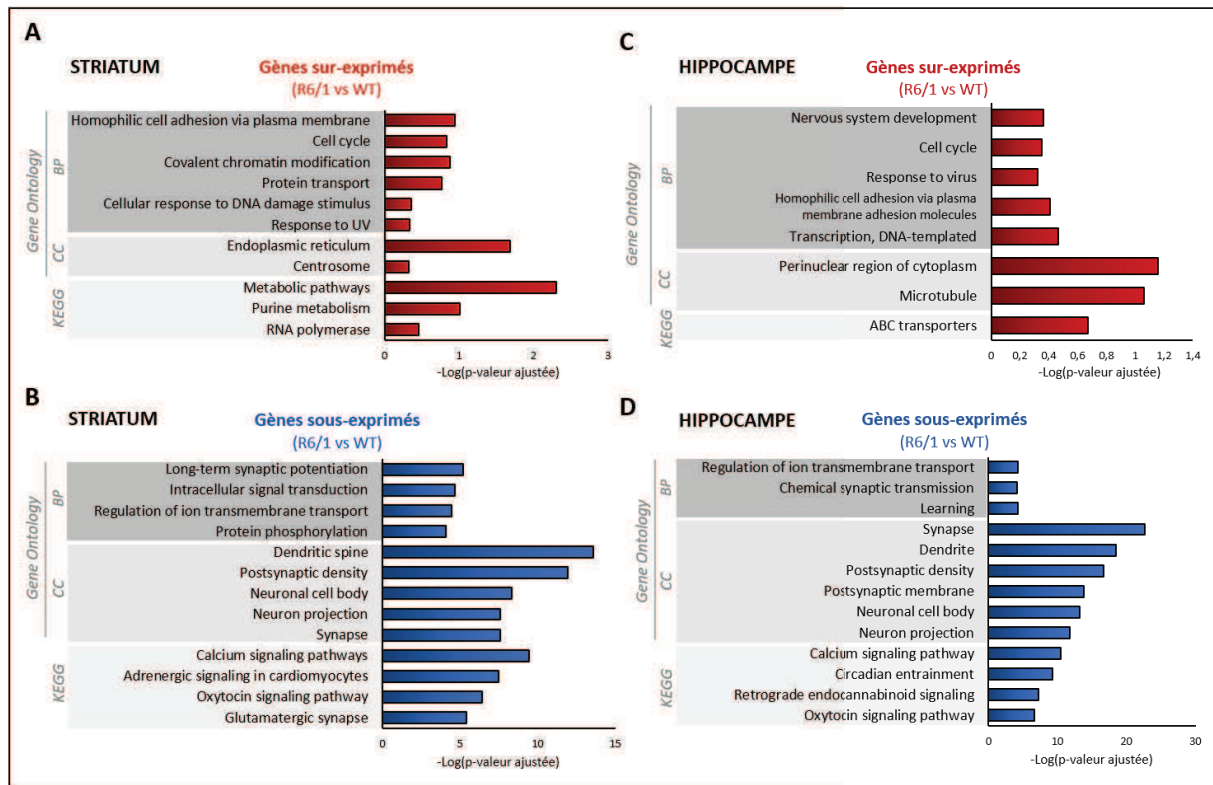
**Annexe 2 : Quantification de l'expression des protéines Egr1 et Fos dans le striatum des souris WT et R6/1, mâles et femelles, en condition basale et après un apprentissage dans le labyrinthe en double-H.**

(A) Pourcentage de neurones marqués positivement pour la protéine Egr1 dans le striatum dorsal et ses sous-régions, le striatum dorsomédian (DMS) et le striatum dorsolatéral (DLS), chez les souris WT et R6/1, en condition basale et après 5 jours d'apprentissage dans le labyrinthe en double-H (Différence WT et R6/1 - Test de Kruskal-Wallis, comparaisons multiples avec le test de Dunn : Striatum dorsal  $k=13,5$   $p=0,06$  ; DMS  $k=14,3$   $p=0,04$  ; DLS  $k=16,09$   $p=0,02$ ). (B) Pourcentage de neurones marqués positivement pour la protéine Fos dans le striatum dorsal et ses sous-régions, le striatum dorsomédian (DMS) et le striatum dorsolatéral (DLS), chez les souris WT et R6/1, en condition basale et après 5 jours d'apprentissage dans le labyrinthe en double-H (Différence WT et R6/1 - Test de Kruskal-Wallis, comparaisons multiples avec le test de Dunn : Striatum dorsal  $k=22,08$   $p=0,02$  ; DMS  $k=25,1$   $p=0,0007$  ; DLS  $k=18,26$   $p=0,01$ ). Effectifs :  $n=8$  WT HC♂,  $n=9$  WT HC♀,  $n=5$  R6/1 HC♂,  $n=6$  R6/1 HC♀,  $n=5$  WT 5J♂,  $n=3$  WT 5J♀,  $n=5$  R6/1 5J♂,  $n=3$  R6/1 5J♀. Les données ne diffèrent pas statistiquement entre les souris mâles et femelles pour la protéine Egr1 (Différence mâles et femelles - Test de Mann-Whitney : Striatum dorsal, WT HC  $U=28$   $p=0,70$ , R6/1 HC  $U=12$   $p=0,64$ , WT 5J  $U=7$   $p=0,85$ , R6/1 5J  $U=3$   $p=0,21$  ; DMS, WT HC  $U=25$   $p=0,49$ , R6/1 HC  $U=15$   $p>0,99$ , WT 5J  $U=5$   $p=0,50$ , R6/1 5J  $U=3$   $p=0,25$  ; DLS, WT HC  $U=29$   $p=0,77$ , R6/1 HC  $U=12$   $p=0,64$ , WT 5J  $U=6$   $p=0,78$ , R6/1 5J  $U=3$   $p=0,25$ ) et la protéine Fos (Différence mâles et femelles - Test de Mann-Whitney : Striatum dorsal, WT HC  $U=11$   $p=0,02$ , R6/1 HC  $U=4$   $p=0,05$ , WT 5J  $U=3$   $p=0,25$ , R6/1 5J  $U=2$   $p=0,14$  ; DMS, WT HC  $U=9$   $p=0,01$ , R6/1 HC  $U=50$   $p=0,06$ , WT 5J  $U=6$   $p=0,67$ , R6/1 5J  $U=2$   $p=0,14$  ; DLS, WT HC  $U=21$   $p=0,27$ , R6/1 HC  $U=3$   $p=0,02$ , WT 5J  $U=5$   $p=0,50$ , R6/1 5J  $U=3$   $p=0,07$ ). Statistiques : \*  $p<0,05$  entre les groupes.



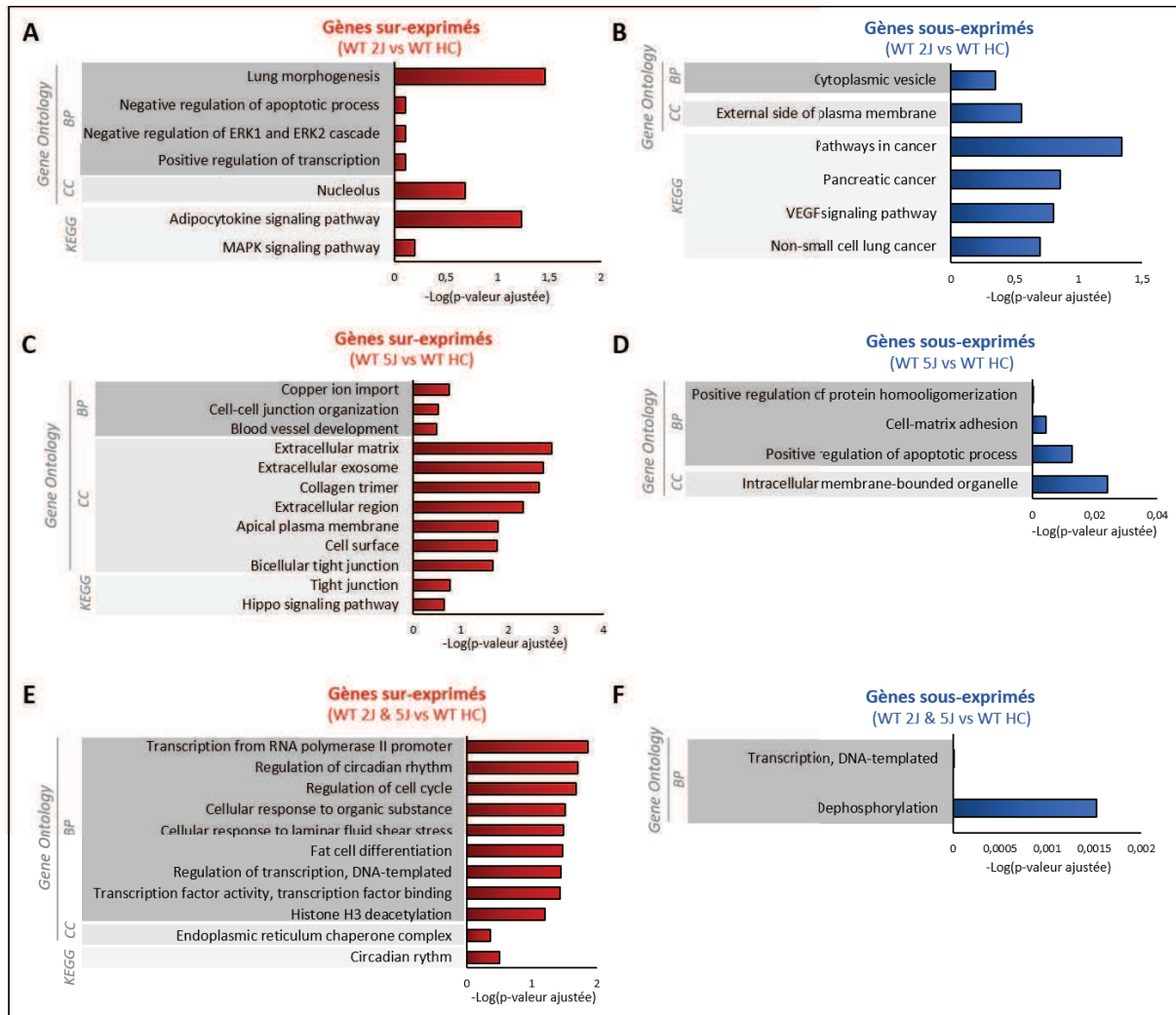
**Annexe 3 : Quantification de l'expression des protéines Egr1 et Fos dans l'hippocampe des souris WT et R6/1, mâles et femelles, en condition basale et après un apprentissage dans le labyrinthe en double-H.**

**(A)** Pourcentage de neurones marqués positivement pour la protéine Egr1 dans l'hippocampe dorsal et ses sous-régions, CA1, CA3 et le gyrus denté (DG), chez les souris WT et R6/1, en condition basale et après 5 jours d'apprentissage dans le labyrinthe en double-H (Différence WT et R6/1 - Test de Kruskal-Wallis, test de Dunn : Hippocampe dorsal  $k=7,49$ ,  $p=0,37$  ; CA1  $k=10,41$ ,  $p=0,16$  ; CA3  $k=15,51$ ,  $p=0,03$  ; DG  $k=24,59$ ,  $p=0,0009$ ). **(B)** Pourcentage de neurones marqués positivement pour la protéine Fos dans l'hippocampe dorsal et ses sous-régions, CA1, CA3 et le gyrus denté (DG), chez les souris WT et R6/1, en condition basale et après 5 jours d'apprentissage dans le labyrinthe en double-H (Différence WT et R6/1 - Test de Kruskal-Wallis, test de Dunn : Hippocampe dorsal  $k=10,71$ ,  $p=0,15$  ; CA1  $k=10,48$ ,  $p=0,16$  ; CA3  $k=13,16$ ,  $p=0,06$  ; DG  $k=10,53$ ,  $p=0,16$ ). Effectifs :  $n=8$  WT HC♂,  $n=9$  WT HC♀,  $n=5$  R6/1 HC♂,  $n=6$  R6/1 HC♀,  $n=5$  WT 5J♂,  $n=3$  WT 5J♀,  $n=5$  R6/1 5J♂,  $n=3$  R6/1 5J♀. Les données ne diffèrent pas statistiquement entre les souris mâles et femelles pour la protéine Egr1 (Différence mâles et femelles - Test de Mann-Whitney : Hippocampe dorsal, WT HC  $U=16$ ,  $p=0,10$ , R6/1 HC  $U=14$ ,  $p=0,87$ , WT 5J  $U=2$ ,  $p=0,22$ , R6/1 5J  $U=3$ ,  $p=0,40$  ; CA1, WT HC  $U=26$ ,  $p=0,56$ , R6/1 HC  $U=13$ ,  $p=0,74$ , WT 5J  $U=2$ ,  $p=0,22$ , R6/1 5J  $U=3$ ,  $p=0,40$  ; CA3, WT HC  $U=14$ ,  $p=0,06$ , R6/1 HC  $U=4,5$ ,  $p=0,06$ , WT 5J  $U=4$ ,  $p=0,62$ , R6/1 5J  $U=2$ ,  $p=0,22$  ; DG, WT HC  $U=28$ ,  $p=0,70$ , R6/1 HC  $U=6$ ,  $p=0,12$ , WT 5J  $U=3$ ,  $p=0,40$ , R6/1 5J  $U=3$ ,  $p=0,40$ ) et la protéine Fos (Différence mâles et femelles - Test de Mann-Whitney : Hippocampe dorsal, WT HC  $U=17$ ,  $p=0,12$ , R6/1 HC  $U=10$ ,  $p=0,42$ , WT 5J  $U=3$ ,  $p=0,25$ , R6/1 5J  $U=4$ ,  $p=0,62$  ; CA1, WT HC  $U=31$ ,  $p=0,93$ , R6/1 HC  $U=9$ ,  $p=0,32$ , WT 5J  $U=2$ ,  $p=0,14$ , R6/1 5J  $U=5$ ,  $p=0,74$  ; CA3, WT HC  $U=16$ ,  $p=0,09$ , R6/1 HC  $U=15$ ,  $p>0,99$ , WT 5J  $U=6,5$ ,  $p=0,87$ , R6/1 5J  $U=2$ ,  $p=0,22$  ; DG, WT HC  $U=17$ ,  $p=0,12$ , R6/1 HC  $U=7$ ,  $p=0,17$ , WT 5J  $U=7$ ,  $p>0,99$ , R6/1 5J  $U=4$ ,  $p=0,62$ ). Statistiques : \*  $p<0,05$  entre les groupes.



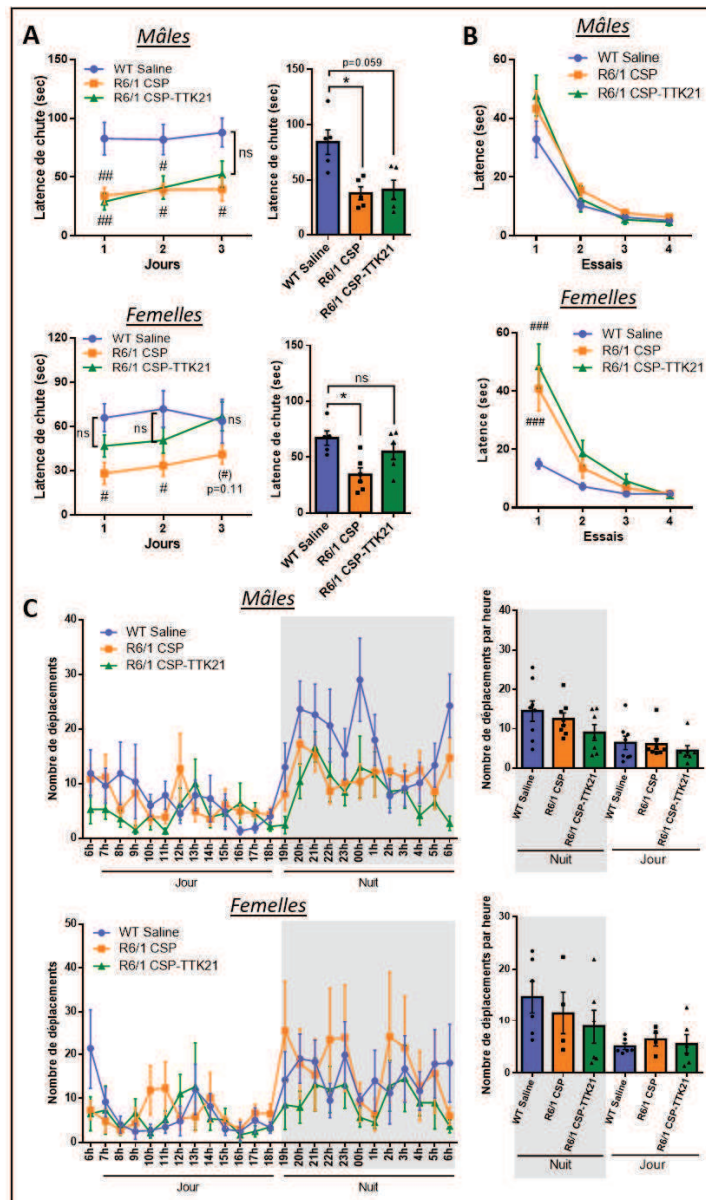
**Annexe 4 : Signatures fonctionnelles des gènes sur- et sous-exprimés dans le striatum et l’hippocampe des souris R6/1.**

Les listes de gènes ont été sélectionnées avec un  $\log(FC) < 0$  ou  $\log(FC) > 0$  et une p-valeur ajustée  $< 0,05$ . Les analyses fonctionnelles ont été réalisées avec DAVID et les termes des bases de données Gene Ontology (Biological Process –BP- ; Cellular Component –CC-) et KEGG ont été analysés. **(A-B)** Enrichissement fonctionnel des gènes conjointement sur-exprimés **(A)** et sous-exprimés **(B)** dans le striatum des souris R6/1 HC, 2J et 5J par rapport aux souris WT. **(C-D)** Enrichissement fonctionnel des gènes conjointement sur-exprimés **(C)** et sous-exprimés **(D)** dans l’hippocampe des souris R6/1 HC, 2J et 5J par rapport aux souris WT.



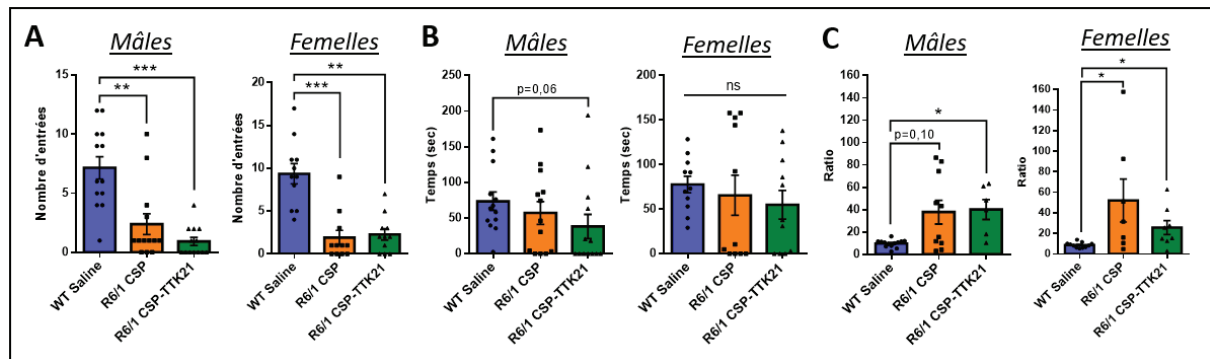
**Annexe 5 : Signatures fonctionnelles des gènes sur- et sous-exprimés dans le striatum des souris WT au cours du processus de mémorisation.**

Les listes de gènes ont été sélectionnées avec un  $\log(\text{FC}) \leq 0$  ou  $\log(\text{FC}) > 0$  et une p-valeur ajustée  $< 0,1$ . Les analyses fonctionnelles ont été réalisées avec DAVID et les termes des bases de données Gene Ontology (Biological Process –BP- ; Cellular Component –CC-) et KEGG ont été analysés. **(A-B)** Enrichissement fonctionnel des gènes sur-exprimés **(A)** et sous-exprimés **(B)** dans le striatum des souris WT après 2 jours d'apprentissage dans le labyrinthe en double-H. **(C-D)** Enrichissement fonctionnel des gènes sur-exprimés **(C)** et sous-exprimés **(D)** dans le striatum des souris WT après 5 jours d'apprentissage dans le labyrinthe en double-H. **(E-F)** Enrichissement fonctionnel des gènes conjointement sur-exprimés **(E)** et sous-exprimés **(F)** dans le striatum des souris WT après 2 et 5 jours d'apprentissage dans le labyrinthe en double-H.



### Annexe 6 : Evaluation de l'effet du traitement CSP-TTK21 sur le phénotype moteur des souris R6/1, mâles et femelles.

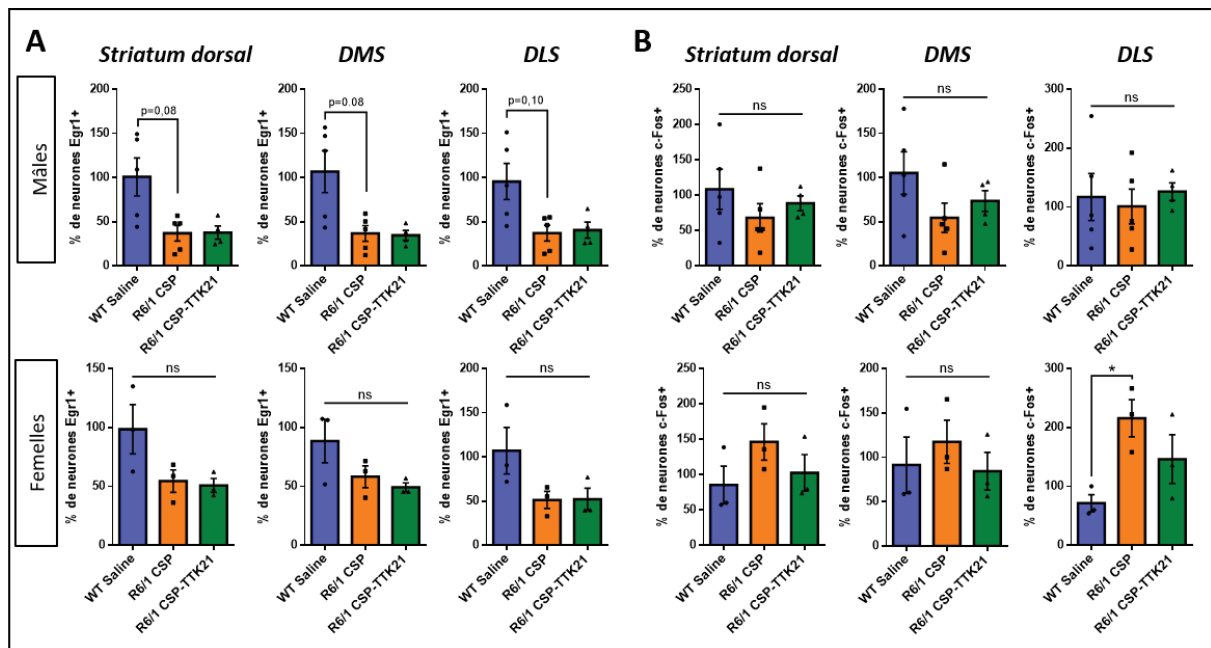
(A-B) Evaluation de l'effet du traitement CSP-TTK21 sur la coordination motrice des souris R6/1 avec le rotarod (A) et le test de la barre (B). (A) Latence de chute des souris, mâles et femelles, au cours des 3 jours d'apprentissage dans le rotarod (Différence Mâles/Femelles, ANOVA à deux facteurs à mesures répétées : effet sexe WT  $F(1, 8)=1,76$   $p=0,22$  ; effet sexe R6/1 CSP  $F(1, 9)=0,15$   $p=0,70$  ; effet sexe R6/1 CSP-TTK21  $F(1, 9)=1,59$   $p=0,23$ ) (Différence génotype, ANOVA à deux facteurs à mesures répétées : Mâles, effet jour  $F(2, 24)=2,374$   $p=0,11$ , effet génotype  $F(2, 12)=8,57$   $p=0,004$ , interaction jours x génotype  $F(4, 24)=0,74$   $p=0,57$  ; Femelles, effet jour  $F(2, 28)=1,22$   $p=0,30$ , effet génotype  $F(2, 14)=6,21$   $p=0,011$ , interaction jours x génotype  $F(4, 28)=0,71$   $p=0,58$ ). Moyenne de la latence de chute des souris mâles et femelles (Test de Kruskal-Wallis : Mâles  $k=7,98$   $p=0,01$  ; Femelles  $k=6,94$   $p=0,02$ ). (B) Latence nécessaire pour que les souris traversent la barre et rejoignent leur cage (Différence mâles/femelles, ANOVA à deux facteurs et à mesures répétées : effet sexe WT  $F(1, 16)=6,37$ ,  $p=0,02$  ; effet sexe R6/1 CSP  $F(1, 16)=0,30$ ,  $p=0,58$  ; effet sexe R6/1 CSP-TTK21  $F(1, 16)=0,31$ ,  $p=0,58$ ) (Différence génotype, ANOVA à mesures répétées et à deux facteurs : Mâles, effet essai  $F(3, 78)=88,69$   $p<0,0001$ , effet génotype  $F(2, 26)=1,14$   $p=0,0025$ , interaction essai x génotype  $F(6, 78)=1,45$   $p=0,20$  ; Femelles, effet essai  $F(3, 66)=59,48$ , effet génotype  $F(2, 22)=5,90$   $p=0,0088$  ; interaction essais x génotype  $F(6, 66)=6,57$   $p<0,0001$ ). (C) Représentation du nombre de déplacements des souris dans leur cage chaque heure pendant 24h (Différence mâles/femelles, ANOVA à deux facteurs et à mesures répétées : effet sexe WT Saline  $F(1, 12)=0,20$   $p=0,66$  ; effet sexe R6/1 CSP  $F(1, 12)=0,33$   $p=0,57$  ; effet sexe R6/1 CSP-TTK21  $F(1, 11)=0,11$   $p=0,74$ ) (Différence génotype, ANOVA à deux facteurs et à mesures répétées, test de Sidak : Mâles, effet heure  $F(48, 480)=5,524$   $p<0,0001$ , effet génotype  $F(2, 20)=2,616$   $p=0,09$  ; interaction heures x génotype  $F(48, 480)=1,388$   $p=0,048$  ; Femelles, effet heures  $F(24, 360)=3,368$   $p<0,0001$ , effet génotype  $F(2, 15)=0,397$   $p=0,67$  ; interaction heures x génotype  $F(48, 360)=0,832$   $p=0,77$ ). Nombre moyen de déplacements des souris par heure durant la journée (7h-19h) et la nuit (19h-7h) (Test de Kruskal-Wallis, test de Dunn : Mâles,  $k=17,87$ ,  $p=0,003$  ; Femelles,  $k=8,62$   $p=0,12$ ). Les données sont représentées par la moyenne  $\pm$  SEM. Effectifs : Rotarod,  $n=5\text{♂}$ ,  $6\text{♀}$  par groupe ; Test de la barre,  $n=10\text{♂}$ ,  $8\text{♀}$  WT,  $n=10\text{♂}$ ,  $8\text{♀}$  R6/1 CSP,  $n=9\text{♂}$ ,  $9\text{♀}$  R6/1 CSP-TTK21 ; Actographie,  $n=8\text{♂}$ ,  $6\text{♀}$  par groupe. Statistiques : \*  $p<0,05$  entre les groupes ; #  $<0,05$ , ##  $p<0,01$  et ###  $p<0,005$  R6/1 CSP-TTK21 et R6/1 CSP vs WT Saline.



### Annexe 7 : Evaluation de l'anxiété des souris WT Saline, R6/1 CSP et R6/1 CSP-TTK21, mâles et femelles.

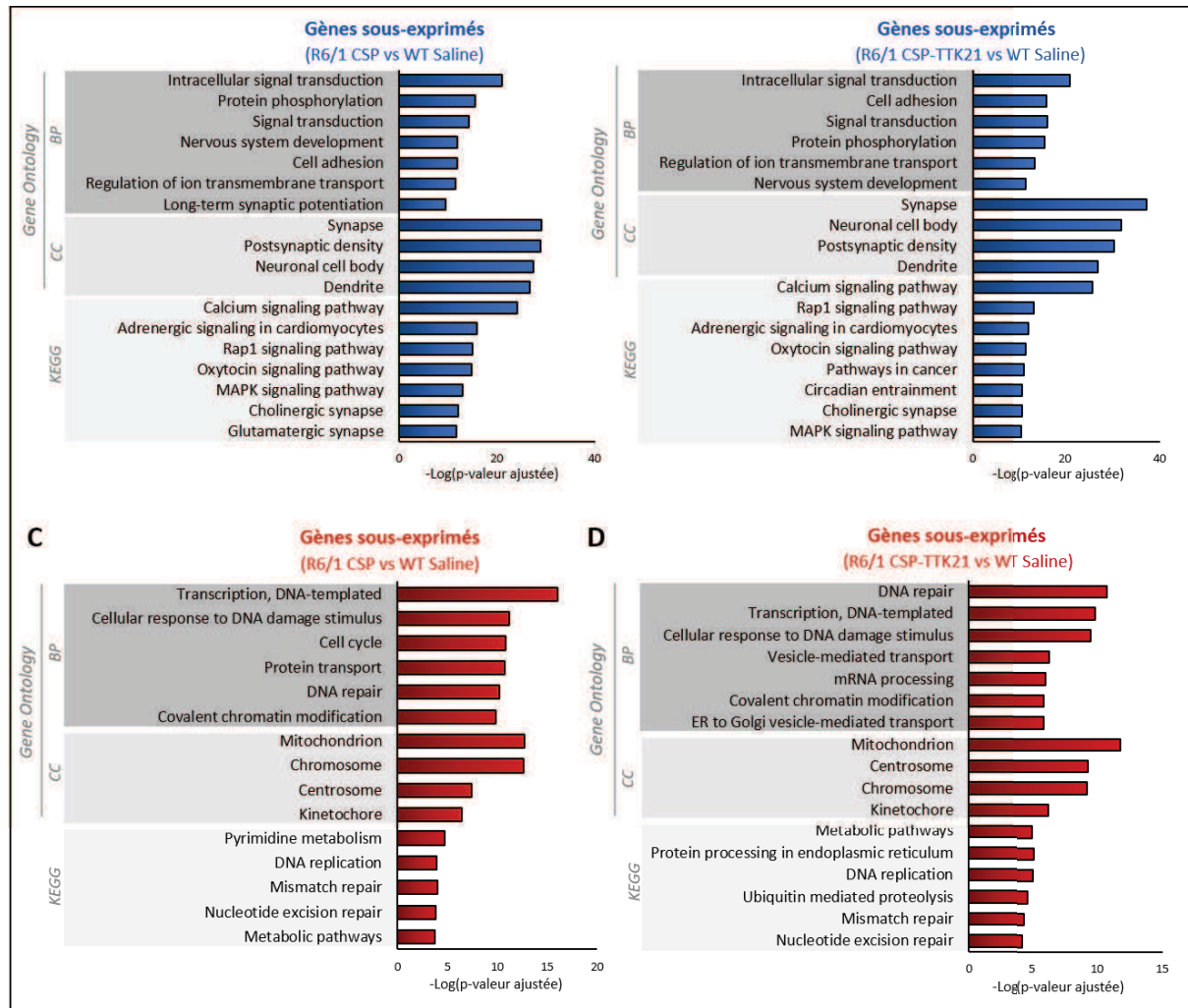
L'anxiété a été mesurée chez des souris mâles et femelles, avec le dispositif du test de transition clair/obscur, en relevant : **(A)** le nombre d'entrées effectuées dans le compartiment éclairé (Différence mâles/femelles, test de Mann-Whitney : WT  $U=52$   $p=0,26$  ; R6/1 CSP  $U=62,5$   $p=0,60$  ; R6/1 CSP-TTK21  $U=43$   $p=0,08$ ) (Différence génotype, test de Kruskal-Wallis : Mâles,  $k=19,28$   $p<0,0001$  ; Femelles  $k=17,86$   $p=0,0001$  ; comparaisons multiples : Test de Dunn) ; **(B)** le temps total cumulé passé par les souris dans le compartiment éclairé (Différence mâles/femelles, test de Mann-Whitney : WT  $U=62$   $p=0,60$  ; R6/1 CSP  $U=69$   $p=0,90$  ; R6/1 CSP-TTK21  $U=51,5$   $p=0,23$ ) (Différence génotypes, test de Kruskal-Wallis : Mâles,  $k=5,32$   $p=0,069$  ; Femelles,  $k=1,097$   $p=0,57$  ; Comparaisons multiples : Test de Dunn). **(C)** Temps moyen passé par les souris par entrée dans le compartiment éclairé (Ratio : Temps total / Nombre d'entrées) (Différence mâles/femelles, test de Mann-Whitney : WT  $U=55$   $p=0,35$  ; R6/1 CSP  $U=28$   $p=0,53$  ; R6/1 CSP-TTK21  $U=15$   $p=0,28$ ) (Différence génotypes, test de Kruskal-Wallis : Mâles,  $k=8,19$   $p=0,016$  ; Femelles,  $k=9,05$   $p=0,010$  ; Comparaisons multiples : Test de Dunn). Les données sont représentées par la moyenne  $\pm$  SEM. Effectifs :  $n=13\text{♂}$ ,  $11\text{♀}$  par groupe. Statistiques : \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$  et \*\*\* $p<0,005$  entre les groupes.





**Annexe 8 : Quantification de l'expression des protéines Egr1 et Fos dans le striatum des souris WT Saline, R6/1 CSP et R6/1 CSP-TTK21 après le test de rappel dans le labyrinthe en double-H.**

**(A)** Pourcentage de neurones marqués positivement pour la protéine Egr1 dans le striatum dorsal, le striatum dorsomédian (DMS) et le striatum dorsolatéral (DLS), des souris WT Saline, R6/1 CSP et R6/1 CSP-TTK21, mâles et femelles (*Différence Mâles/Femelles, test de Mann-Withney : Striatum dorsal, WT Saline U=7 p=0,85, R6/1 CSP U=3 p=0,21, R6/1 CSP-TTK21 U=2 p=0,22 ; DMS, WT Saline U=5 p=0,50, R6/1 CSP U=3 p=0,25, R6/1 CSP-TTK21 U=2 p=0,20 ; DLS, WT Saline U=6 p=0,78, R6/1 CSP U=3 p=0,25, R6/1 CSP-TTK21 U=4 p=0,62*). Le nombre de neurones Egr1+ de chaque groupe a été rapporté à celui des WT HC (*Différence génotype, Test de Kruskal-Wallis : Mâles, Striatum dorsal K=6,09 p=0,03, DMS K=6,16 p=0,03, DLS K=5,46 p=0,05 ; Femelles, Striatum dorsal K=4,35 p=0,13, DMS K=2,77 p=0,29, DLS K=4,35 p=0,13*). **(B)** Pourcentage de neurones marqués positivement pour la protéine Fos dans le striatum dorsal, le striatum dorsomédian (DMS) et le striatum dorsolatéral (DLS), des souris WT Saline, R6/1 CSP et R6/1 CSP-TTK21, mâles et femelles (*Différence Mâles/Femelles, test de Mann-Withney : Striatum dorsal, WT Saline U=6 p=0,67, R6/1 CSP U=2 p=0,14, R6/1 CSP-TTK21 U=4,5 p=0,71 ; DMS, WT Saline U=6 p=0,67, R6/1 CSP U=2 p=0,14, R6/1 CSP-TTK21 U=5 p=0,85 ; DLS, WT Saline U=5 p=0,50, R6/1 CSP U=1 p=0,07, R6/1 CSP-TTK21 U=6 p>0,99*). Le nombre de neurones Fos+ de chaque groupe a été rapporté à celui des WT HC (*Différence génotype, Test de Kruskal-Wallis : Mâles, Striatum dorsal K=1,36 p=0,52, DMS K=2,78 p=0,26, DLS K=0,77 p=0,71 ; Femelles, Striatum dorsal K=2,22 p=0,38, DMS K=1,68 p=0,51, DLS K=5,40 p=0,07*). Les données sont représentées par la moyenne  $\pm$  SEM. Effectifs : n=5♂, 3♀ WT Saline, n=5♂, 3♀ R6/1 CSP, n=4♂, 3♀ WT R6/1 CSP-TTK21. Statistiques : \* p<0,05 entre les groupes.



### Annexe 9 : Effet de la molécule CSP-TTK21 sur les signatures transcriptomiques du striatum des souris R6/1.

Les listes de gènes ont été sélectionnées avec un  $\log(\text{FC}) \leq 0$  ou  $\log(\text{FC}) > 0$  et une p-valeur ajustée  $< 0,01$ . Les analyses fonctionnelles ont été réalisées avec DAVID et les termes des bases de données Gene Ontology (Biological Process –BP- ; Cellular Component –CC-) et KEGG ont été analysés. (A-B) Enrichissement fonctionnel des gènes sous-exprimés dans le striatum des souris R6/1 CSP (A) et R6/1 CSP-TTK21 (B) par rapport aux souris WT après le test de rappel dans le labyrinthe en double-H. (C-D) Enrichissement fonctionnel des gènes sur-exprimés dans le striatum des souris R6/1 CSP (C) et R6/1 CSP-TTK21 (D) par rapport aux souris WT après le test de rappel dans le labyrinthe en double-H.



**Annexe 10 : Revue collaborative**

*« Contribution of Neuroepigenetics to Huntington's disease »*

*Francelle L., Lotz C., Outeiro T., Brouillet E., Merienne K.*





# Contribution of Neuroepigenetics to Huntington's Disease

Laetitia Francelle<sup>1\*</sup>, Caroline Lotz<sup>2</sup>, Tiago Outeiro<sup>1</sup>, Emmanuel Brouillet<sup>3</sup> and Karine Merienne<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of NeuroDegeneration and Restorative Research, University Medical Center Goettingen, Goettingen, Germany,

<sup>2</sup> CNRS UMR 7364, Laboratory of Cognitive and Adaptive Neurosciences, University of Strasbourg, Strasbourg, France,

<sup>3</sup> Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives, Département de Recherche Fondamentale, Institut d'Imagerie Biomédicale, Molecular Imaging Center, Neurodegenerative diseases Laboratory, UMR 9199, CNRS Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Fontenay-aux-Roses, France

Unbalanced epigenetic regulation is thought to contribute to the progression of several neurodegenerative diseases, including Huntington's disease (HD), a genetic disorder considered as a paradigm of epigenetic dysregulation. In this review, we attempt to address open questions regarding the role of epigenetic changes in HD, in the light of recent advances in neuroepigenetics. We particularly discuss studies using genome-wide scale approaches that provide insights into the relationship between epigenetic regulations, gene expression and neuronal activity in normal and diseased neurons, including HD neurons. We propose that cell-type specific techniques and 3D-based methods will advance knowledge of epigenome in the context of brain region vulnerability in neurodegenerative diseases. A better understanding of the mechanisms underlying epigenetic changes and of their consequences in neurodegenerative diseases is required to design therapeutic strategies more effective than current strategies based on histone deacetylase (HDAC) inhibitors. Researches in HD may play a driving role in this process.

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Daniela S. Andres,  
ETH Zurich, Switzerland

### Reviewed by:

Anthony John Hannan,  
Florey Institute of Neuroscience  
and Mental Health, Australia  
Elizabeth A. Thomas,  
Scripps Research Institute, USA  
Martin Radrizzani,  
National University of San Martín,  
Argentina

### \*Correspondence:

Laetitia Francelle  
laetitia.francelle@hotmail.fr

**Received:** 07 November 2016

**Accepted:** 10 January 2017

**Published:** 30 January 2017

### Citation:

Francelle L, Lotz C, Outeiro T,  
Brouillet E and Merienne K (2017)  
Contribution of Neuroepigenetics  
to Huntington's Disease.  
*Front. Hum. Neurosci.* 11:17.  
doi: 10.3389/fnhum.2017.00017

**Keywords:** neuroepigenetics, Huntington's disease, epigenomics, transcriptomics, neuronal activity, HDAC inhibitors, neurodegenerative diseases

## INTRODUCTION

Huntington's disease (HD) is a genetic disease affecting preferentially medium spiny neurons (MSN) of the striatum. Increasing numbers of studies provide evidence for altered epigenetic regulations in HD. Here, after a summary of general epigenetic mechanisms in neurons, we review the state-of-the-art of epigenetic changes in HD. We discuss the mechanisms underlying these changes and their consequences, particularly on expression of neuronal identity genes. Current challenges to improve our understanding of the role of epigenetic mechanisms in HD are discussed, including the development of new technologies to profile neuronal epigenomes at single-cell or cell-type specific levels. Epigenetic modifications represent promising therapeutics. We discuss the need of identifying new epigenetic targets for therapy, representing alternatives to histone deacetylase (HDAC) inhibitors.

## Epigenetic Mechanisms: General Rules

The current definition of epigenetics relates to "the study of phenomena and mechanisms that cause chromosome-bound, heritable changes to gene expression that are not dependent on

changes to DNA sequence” (Deans and Maggert, 2015). Epigenetic mechanisms actually regulate several DNA/RNA-mediated processes, including transcription, DNA repair and DNA replication, through modulation of the structure of chromatin, a macromolecular complex of DNA, RNA and proteins such as histones. Two major epigenetic mechanisms influence chromatin structure: histone modifications and DNA methylation (Allis and Jenuwein, 2016) (**Figure 1**).

In the nucleus, DNA is wrapped around core particles of chromatin, the nucleosomes, which are formed of octamers of histones, including H2A, H2B, H3, and H4. Histones are subject to various post-translational modifications (PTM) such as acetylation, methylation, phosphorylation and ubiquitylation. These histone modifications modulate the degree of compaction of nucleosomes, thereby affecting chromatin accessibility to various factors, particularly transcriptional regulators. (Jenuwein and Allis, 2001; Borrelli et al., 2008; Wang and Jin, 2010; Tsompana and Buck, 2014; Xu et al., 2014). Importantly, histone residues can be modified in a combinatorial, reversible, and targeted manner (**Figure 1**). For instance, histone acetyltransferases (HAT) and HDAC are involved in acetylation and deacetylation of specific histone residues, respectively (**Figure 1**). Similarly, methylases and demethylases regulate the addition and removal of methyl groups on histone residues (**Figure 1**). The combinatorial, reversible and targeted nature of histone modifications is the basis of the so-called ‘histone code’. It permits to achieve specificity in the outcome, through the action of proteins interpreting the code (e.g., “readers”) (Jenuwein and Allis, 2001; Bannister and Kouzarides, 2011; Jones et al., 2016). One major outcome is transcription. General rules of the “transcriptional” histone code are relatively well defined. For instance, histone acetylation, whatever the histone or the residue modified, promotes relaxed chromatin and is associated with transcriptional activation, whereas histone methylation, depending on the specific residue that is modified, can lead to transcriptional repression or activation. For instance, H3K9 methylation is associated with transcription repression, whereas H3K4 methylation correlates with transcription activation. Moreover, the genome comprises different regulatory regions, including promoters and enhancers (i.e., regulatory regions distal to promoters) playing specific roles in transcriptional regulation. These regions display specific histone modifications. For instance, promoters and enhancers of active genes are enriched in trimethylated H3K4 (H3K4me3) and in acetylated H3K27 (H3K27ac) respectively, further illustrating the targeting precision permitted by the histone code.

DNA methylation, another important epigenetic mechanism, consists in adding a methyl group to cytosines by DNA methyltransferases (DNMT), particularly at C5 position of cytosine in cytosine-guanine dinucleotide sequences (CpG), creating 5-methylcytosine (5-mC). DNMT1 is implicated in the maintenance of methylation patterns during DNA replication. In contrast, DNMT3a and DNMT3b have been associated with *de novo* DNA methylation (Jeltsch, 2006; Feng et al., 2010). Though DNA methylation was long considered as a stable process, it is now clear that post-mitotic cells can undergo active DNA demethylation, through a mechanism implicating TET proteins

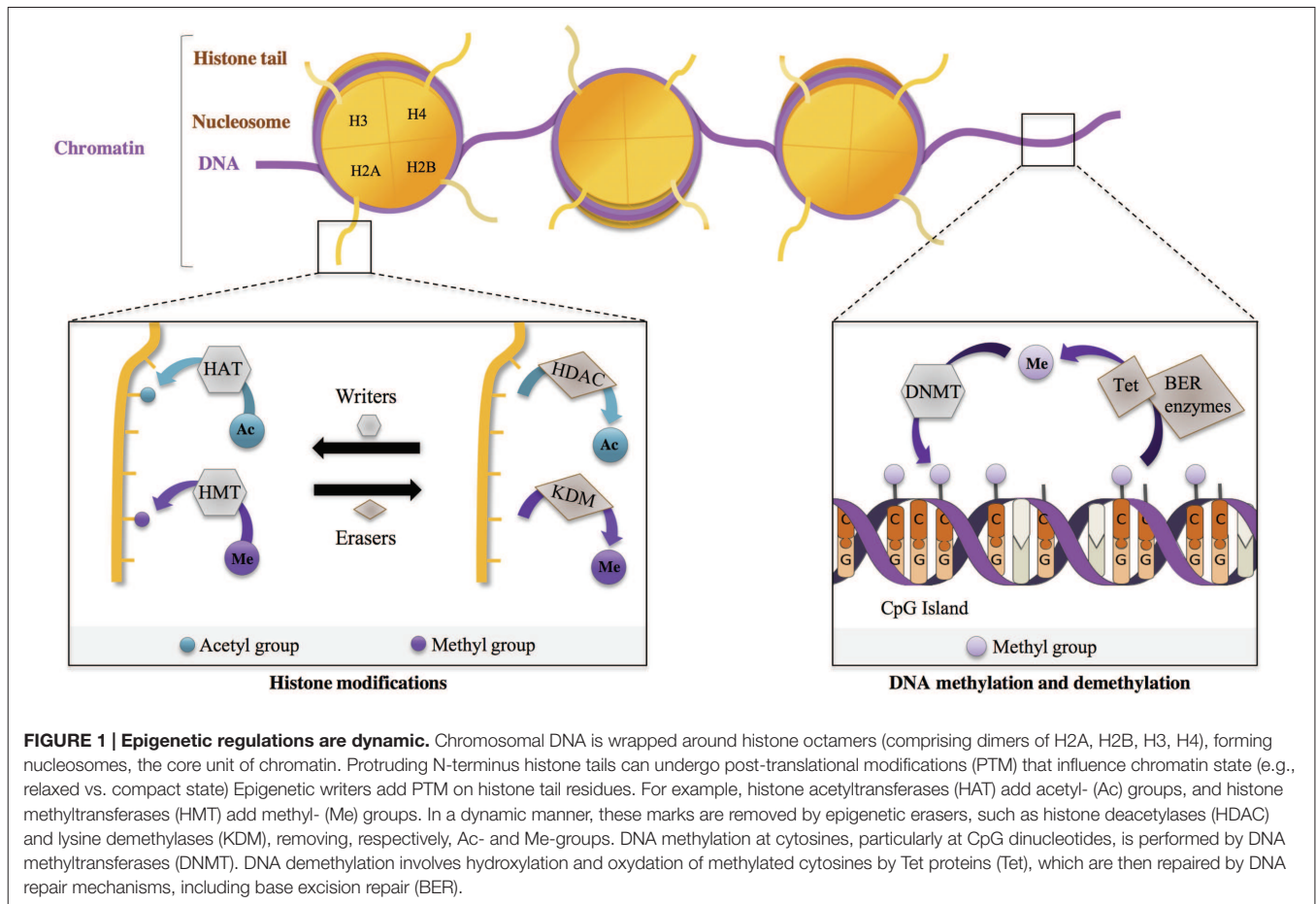
(Pastor et al., 2013). TET proteins induce hydroxylation of 5-mC (leading to 5-hmC) and are further involved in their oxidation. Oxidized 5-hmC are then processed by DNA repair mechanisms and converted back to their unmethylated state (Guo et al., 2011; Feng et al., 2015). 5-hmC is particularly extended in neurons, suggesting that regulation of DNA methylation is highly dynamic in these cells (Song et al., 2011; Szulwach et al., 2011). 5-mC are bound by several classes of methyl-binding proteins (such as MeCP2), which associate with other protein partners, including HDAC, forming co-repressor complexes (Urduingio et al., 2009; Du et al., 2015). DNA methylation at gene promoters, generally enriched in CpG sites and forming so-called CpG islands, is an important mechanism involved in gene repression (Deaton and Bird, 2011) (**Figure 1**).

The collection of epigenetic modifications (e.g., the epigenome) can be assessed at genome-wide scale, using next generation sequencing-based techniques such as chromatin-immunoprecipitation-sequencing (ChIP-seq). Generation and integration of epigenomic data with transcriptomic and/or functional data to fully decode epigenomes at cell-type specific level is a major current challenge that requires the development of new techniques and analysis methods (Marconett et al., 2013; Shin et al., 2014). In particular, methods to process low cell numbers/single-cell need to be developed as well as powerful bioinformatics tools (Bock et al., 2016).

### Neuroepigenetics: Why are Neurons Specific?

Epigenetic mechanisms, interfacing individual genomes with environmental factors, are essential to the regulation of fundamental biological processes. Historically, epigenetic mechanisms have been primarily explored in the context of development, including cellular differentiation and the establishment of stable cellular identity (Holliday, 2006; Roth and Sweatt, 2011; Boland et al., 2014). In fact, cell state transitions during development require massive epigenetic changes, whose stabilization enables the maintenance of cell-type specific identity. The mechanisms involve the establishment of defined transcriptional programs. As a result, the epigenome is a gatekeeper of cell-type specific identity. However, this view of stable epigenetics has been challenged, due to evidence showing that massive and dynamic epigenetic changes can be implicated in the regulation of cellular activity. Such “plasticity” of epigenetic regulations is particularly critical to neuronal cell activity; hence the concept of neuroepigenetics (Borrelli et al., 2008; Riccio, 2010; Sweatt, 2013; Deans and Maggert, 2015).

Neuronal excitability is one major property of neuronal cells. In response to environmental experience, including learning, drug exposure, psychological and physical stress environmental signals, neurons undergo reversible transitions from resting to active (or excited) states, which influence synaptic plasticity and promote adaptive behavior, such as learning and memory (Sultan and Day, 2011; Sweatt, 2016). These processes are highly dynamic, and can also be long-lasting. Increasing evidence indicates that epigenetic mechanisms regulate the transition from resting to active neuronal state (Korzus, 2010; Landgrave-Gomez et al., 2015; Meadows et al., 2016).



Learning and memory processes are associated with synaptic plasticity, leading to the rapid formation of new synapses, which can be strengthened or lost over time. Synaptic plasticity correlates with dynamic changes at the level of histone modifications. Specifically, changes in acetylation of histones, including H3 and H4 have been associated with early formation of new synapses (Federman et al., 2009; Chatterjee et al., 2013; Graff and Tsai, 2013; Peixoto and Abel, 2013; Benito et al., 2015). Moreover, neuronal activity can be associated with memory storage and consolidation, which may involve long-term remodeling of neuronal networks at system levels. Epigenetic regulations have also been implicated in these processes. Upon learning paradigms, the chromatin in brain tissues implicated in memory formation and/or consolidation, such as the hippocampus and the cortex, undergoes extensive modifications, including increased histone acetylation and DNA methylation changes (Day and Sweatt, 2011; Bousiges et al., 2013; Zovkic et al., 2013; Halder et al., 2016). DNA methylation and histone modifications both control memory processes, through transcriptional effects that comprise the activation of synaptic plasticity genes, including immediate early genes (IEGs) like *Fos*, *Egr1*, or *Arc* (Minatohara et al., 2015; Thakurela et al., 2015). Remarkably, these transcriptional effects that are experience-driven and epigenetically regulated can be long lasting. Activation

of specific signaling pathways, such as the cAMP/CREB/CREB-binding protein (CBP) pathway, is involved in the coupling between epigenetic and transcriptional responses, promoting the recruitment of protein complexes at target genes, which induces chromatin remodeling and drive transcription (Cedar and Bergman, 2009; Tie et al., 2014; Alberini and Kandel, 2015; Ortega-Martinez, 2015).

However, although tight coupling between neuronal-activity-regulated epigenetic and transcriptional changes remains a favored hypothesis, recent data, integrating epigenomic, and transcriptomic data suggest that the link between both events may not be as clear as anticipated (Lopez-Atalaya and Barco, 2014; Liu et al., 2015; Valor, 2015b). Recently, contextual fear conditioning in mice was used as a learning paradigm to examine the spatiotemporal correlation between epigenetic and transcriptional modifications in neurons (Halder et al., 2016). Specifically, DNA methylation and seven histone modifications were assessed at a genome-wide scale using hippocampal and cortical neurons of mice that were subjected to contextual fear conditioning. To specify the timing of epigenetic changes in these tissues, analyses were performed at different time points with respect to contextual fear conditioning, associated with different memory processes, including memory formation and consolidation. Transcriptomic analyses were also performed



on the same tissues. Generally, histone modifications were extensively modulated during memory formation, and these widespread changes weakly correlated with gene-selective transcriptional changes. In contrast, DNA methylation changes were rather locus-specific and correlated with transcriptional changes, including splicing events (Lev Maor et al., 2015; Halder et al., 2016). Thus, the coupling between epigenetic and transcriptional changes may depend on chromatin modifications. Additional studies are required to specify causal relationship between the two events. Other neuronal cells/tissues and experimental paradigms may be used, which would permit to investigate the interplay between epigenetics and transcription in brain cells/tissues associated with additional brain functions, including other cognitive functions, motor functions and functions linked to emotion and motivation regulation.

Thus, it appears that epigenetic mechanisms in neurons not only control their identity, like in other cell types, but also regulate neuronal activation, including the ability to undergo dynamic plasticity in response to environmental signals. Then, the question arising is what is going on in pathological situations, when neuronal function is impaired? Does it result from altered activation capacity of affected neurons or from a loss of neuronal identity? Are impaired epigenetic regulations implicated in pathological processes? These questions are particularly relevant to neurodegenerative diseases where specific neuronal populations (or identities) are preferentially affected. In the following sections, we have chosen to focus on one such disease, HD, playing a pioneering role in the understanding of the epigenetic regulation mechanisms in brain diseases.

## EPIGENETICS IN HD

Huntington's disease is a neurodegenerative disease caused by an unstable expanded CAG repeats (>35–39 repeats) in the Huntingtin gene (*HTT*), which results in the production of mutant protein (mHtt) with a toxic polyglutamine (polyQ) tract (Landles and Bates, 2004). HD is characterized by specific symptoms, including motor impairment (e.g., chorea, bradykinesia, gait abnormalities, dystonia), cognitive deficits (motor skill learning deficits, planning, and attention troubles) and psychiatric alterations (depression, mania, apathy, suicide), usually appearing at adulthood (see as review, Roos, 2010). Since polyQ expansion toxicity is correlated with repeat size, HD patients with longer CAG expansions are more severely affected, showing earlier onset of symptoms and faster pathology progression. HD is characterized by a preferential and primary degeneration of two structures of the basal ganglia: the caudate nucleus and the putamen that form the neostriatum. However, additional brain regions, particularly the cortex, degenerate as the pathology progresses (Rosas et al., 2008). Remarkably, in HD striatum, selective neuronal populations, the GABAergic MSN, are more particularly vulnerable, whereas the large cholinergic interneurons, the medium size GABAergic interneurons and glial cells appear spared (Ferrante et al., 1987a,b; Cicchetti et al., 1996). From a biochemical point of view, polyQ-Htt presents a high propensity to misfold and aggregate, which leads to the formation

of nuclear inclusions, particularly in neurons (DiFiglia et al., 1997; Li L. et al., 2016). These aggregates, a disease hallmark, recruit a number of proteins, including transcriptional regulators (Steffan et al., 2000; Arrasate and Finkbeiner, 2012).

A long period of neuronal dysfunction precedes the death of neurons sensitive to the HD mutation. Several cellular processes are believed to contribute to neuronal dysfunction, including Htt cleavage and aggregation, abnormal protein-protein interactions, dysfunctional calcium signaling, abnormal axonal transport, impaired energy metabolism, dysregulation of neuronal activity, and altered transcription (see as reviews Landles and Bates, 2004; Zuccato et al., 2010; Labbadia and Morimoto, 2013; Saudou and Humbert, 2016).

## The “Neuronal” Signature of the HD Transcriptome

Transcriptional dysregulation plays a central role in HD pathogenesis (Seredenina and Luthi-Carter, 2012). Major transcriptional changes have been reported in the brains of HD patients (Hodges et al., 2006). This is also observed in HD mouse models, including transgenic and knock-in mice (Luthi-Carter et al., 2000; Luthi-Carter et al., 2002; Zucker et al., 2005; Roze et al., 2008). Transcriptomic studies using mice showed that transcriptional changes are progressive, CAG repeat-length-dependent and most extended in the striatum (Desplats et al., 2006; Kuhn et al., 2007; Becanovic et al., 2010; Langfelder et al., 2016). In the striatum of HD models, transcriptional changes occur in both directions: many genes are down- and up-regulated (Seredenina and Luthi-Carter, 2012; Francelle et al., 2014). Remarkably, down-regulated genes display a neuronal signature, since decreased genes in HD striatum are enriched in genes that define striatal neuron identity and function, such as *Darpp32*, *Rgs9*, *Drd1* or *Drd2* (Hodges et al., 2006; Kuhn et al., 2007; Vashishtha et al., 2013; Achour et al., 2015; Langfelder et al., 2016). In the other affected brain regions such as the cortex, fewer genes are down-regulated. However, they also present a neuronal signature, reflecting tissue identity (Vashishtha et al., 2013; Langfelder et al., 2016).

Interestingly, a recent study using RNAseq revealed a developmental signature associated with differentially expressed genes in post-mortem prefrontal cortex of HD patients. Specifically, Hox genes and additional homeobox genes were re-expressed in HD brains, suggesting that the transcriptome of HD neurons resemble that of immature neurons (Labadorf et al., 2015). Thus, these results support the view that the transcriptional program involved in the maintenance of neuronal identity is impaired in HD neurons. Up-regulated genes in the striatum or cortex of HD patients were also enriched in biological processes linked to inflammation (Hodges et al., 2006; Labadorf et al., 2015). However, up-regulation of immune response genes is not that clear in mouse models (Achour et al., 2015; Langfelder et al., 2016). Thus, down- and up-regulated genes in HD brain tissues display distinct functional signatures, suggesting that different mechanisms may operate.

The mechanisms underlying mutant Htt-induced transcriptional effects are unclear. However, they are thought to

involve both altered regulation of transcription regulators and histone-modifying enzymes.

### HDACi in HD: What are the Targets?

The hypothesis of an epigenetic origin of transcriptional dysregulation in HD, particularly implicating histone acetylation, has received increasing support over the years (Jaenisch and Bird, 2003; Lee et al., 2013; Glajch and Sadri-Vakili, 2015). The assumption that altered histone acetylation might contribute to HD was made in the early 2000s, when it was found that the HAT CREB-binding protein CBP is recruited into aggregates of mutant Htt, and that HDAC inhibitors (HDACi) improve phenotypes of drosophila and mouse models of HD (Nucifora et al., 2001; Steffan et al., 2001; Kazantsev et al., 2002). As a result, epigenetic strategies using HDACi to increase histone acetylation have been early considered for HD. Several preclinical studies have been performed using broad-spectrum HDACi (e.g., suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA), Trichostatin A (TSA), phenylbutyrate, sodium butyrate (NaB)] that target non-selectively HDAC of class I and II (Ferrante et al., 2003; Hockly et al., 2003; Gardian et al., 2005; Sadri-Vakili et al., 2007; Sharma and Taliyan, 2015b).

Histone deacetylase inhibitors improve some phenotypes of HD mice, including neuropathology and motor function. However, it is unclear whether beneficial effects require increased histone acetylation. Instead, studies suggest that the mechanism may involve acetylation of non-histone proteins. In support to this view, inactivation of a target of SAHA, *Hdac 4*, ameliorates neurodegeneration in HD mice through an apparently, transcription-independent mechanism, acting on mutant Htt aggregation process (Mielcarek et al., 2011). Non-histone-mediated beneficial effects of HDACi have also been documented in models of Parkinson disease (PD; Godena et al., 2014), suggesting common mechanisms between several neurodegenerative diseases.

New compounds have been developed in an attempt to generate more selective HDACi and with less toxic side effects (Herman et al., 2006; Thomas et al., 2008). The compound HDACi 4b, which was reported to ameliorate disease phenotype of HD mice, show high potency for inhibiting HDAC1 and HDAC3 (Thomas et al., 2008; Jia et al., 2012). However, physicochemical properties and metabolic profile of this compound were found suboptimal for investigation of HDAC inhibition in mice per oral administration (Beconi et al., 2012). The effect of RGFP966, an HDAC3-selective inhibitor, was recently investigated using HD mice (Jia et al., 2016). The results suggest that the compound limits glial cell response, diminishing markers of glial cell activation. Surprisingly however, a heterozygous inactivation of the *Hdac3* gene in HD mice did not ameliorate disease-related phenotypes (Moumne et al., 2012), suggesting that more than 50% knock-down of the *Hdac3* gene might be needed to see a beneficial effect. More recently, beneficial transgenerational effects have been reported using HDACi 4b in HD mice (Jia et al., 2015). Thus, despite some beneficial effects, the mode of action of HDACi in HD models remains elusive and may not systematically implicate histone- and transcription-dependent mechanisms.

It is still unclear whether expression of neuronal identity genes in HD brain tissues is restored upon HDACi treatment (Coppede, 2014; Wang et al., 2014; Sharma et al., 2015; Valor, 2015a). Clinical studies using HDACi are ongoing and the results are awaited. So far, Phase II studies provide indication for safety and tolerability of several compounds, including phenylbutyrate (Hogarth et al., 2007; Westerberg et al., 2015).

But what exactly is the status of the HD epigenome? Is acetylation the only histone modification impaired in HD affected tissues, and to which extent? Are acetylated histone residues all affected the same way by the HD mutation? Is DNA methylation also impaired? Is the chromatin structure globally altered and repressed or is it altered at specific genomic regions or gene loci? What is the underlying mechanism? What are the consequences of chromatin structures changes? Do they underlie transcriptional changes? Addressing these questions is certainly a prerequisite to the development of new epigenetic therapies for HD.

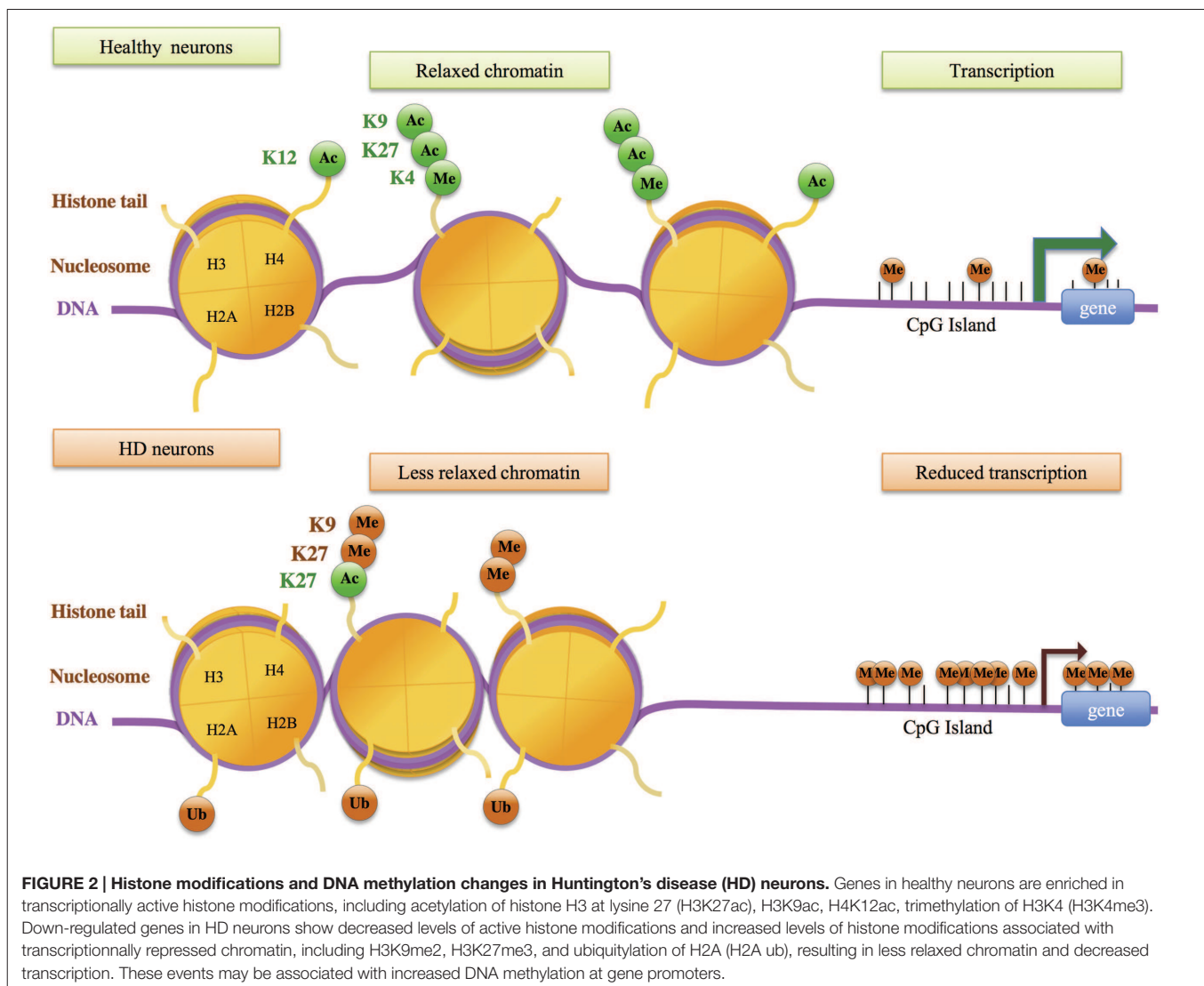
### HD Epigenome

Many studies have already been performed that attempt to address these issues (Lee et al., 2013; Valor and Guiretti, 2014; Glajch and Sadri-Vakili, 2015). It is expected that the use of genome-scale approaches, which has remained so far rather limited in the HD field, will improve our knowledge of HD epigenome as well as provide insights into the mechanism responsible for altered epigenetic regulation in HD.

### Relationship between Epigenetic and Transcriptional Changes in HD

#### *Histone acetylation*

Extensive changes in histone acetylation levels were observed in cellular systems based on mutant Htt overexpression (Steffan et al., 2001; Igarashi et al., 2003). However, global levels of H2B, H3 and H4 acetylation appeared unchanged between brain tissues of HD R6/2 and control mice (Hockly et al., 2003; Sadri-Vakili et al., 2007). Studies using the striatum of HD mice further suggested that decreased H3 acetylation occurs at selective gene loci, particularly at promoters of down-regulated genes such as *Drd2*, *Penk1*, *Actb*, or *Grin1* (Sadri-Vakili et al., 2007). Using chromatin immunoprecipitation paired with microarray hybridization (ChIP-chip), McFarland et al. (2012) assessed histone acetylation changes at genome-wide scale in the striatum of HD R6/2 transgenic mice. H3K9 and H3K14 acetylations (H3K9,14ac) and transcriptional changes between HD and WT striatum were poorly correlated in the striatum of HD R6/2 mice, suggesting that variation in H3K9,14ac levels alone may not be sufficient to account for gene expression changes in HD mice. Valor et al. (2013) reached similar conclusions by investigating changes in H3K9,14 ac and H4K12ac using a more powerful method –ChIPseq– on hippocampus and cerebellum of the HD transgenic N171-82Q mouse model (Figure 2). However, whereas data obtained by McFarland et al. (2012) suggest broad changes in histone acetylation in HD mouse striatum when compared to WT striatum, the results reported by Valor et al. (2013) indicate that changes are restricted to few loci. The absence of bulk changes in histone acetylation is further supported by a



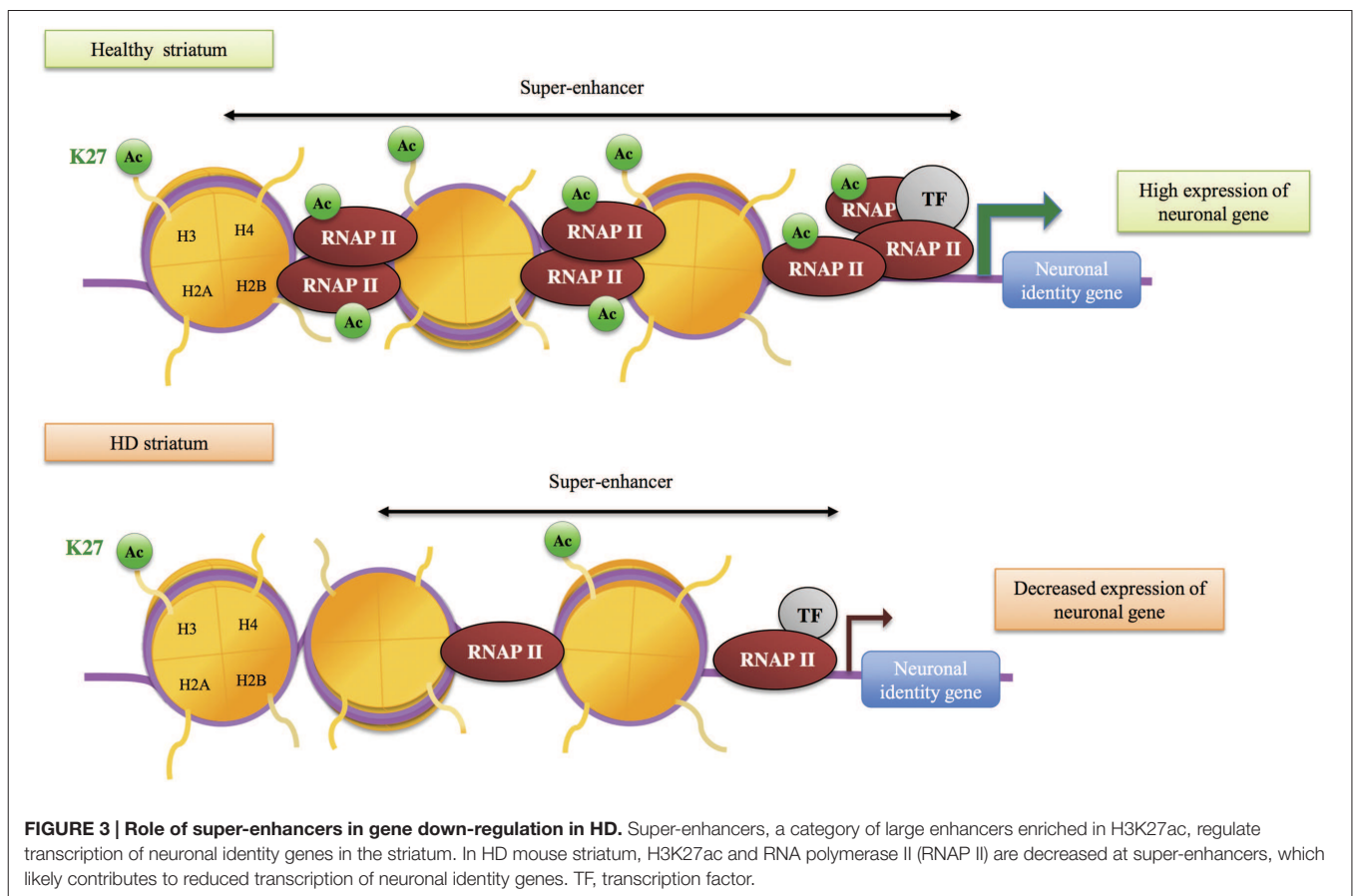
study showing promoter deacetylation of H3 at specific loci in HD models (Guiretti et al., 2016).

H3K27ac, a mark of active enhancers, was also selectively decreased in the striatum of HD R6/1 mice (Achour et al., 2015) (Figure 2). Integrating H3K27ac ChIPseq with RNA polymerase II (RNAPII) ChIPseq and RNAseq data, Achour et al. (2015) showed that H3K27ac and RNAPII are decreased at regions enriched in down-regulated genes, providing evidence for a strong correlation between decreased H3K27ac, decreased RNAPII and gene down-regulation in HD mouse striatum. Moreover, enhancer regions presenting reduced H3K27ac in HD R6/1 striatum were enriched in super-enhancers, a category of broad enhancers, regulating genes that define cell type-specific identity and function (Figure 3). In fact, striatal super-enhancer genes down-regulated in HD mouse striatum were enriched in genes controlling neuronal activity, including neuronal plasticity and transmission (Achour et al., 2015). Thus, the results suggest that selective decrease in super-enhancer activity underlies HD neuronal transcriptomic signature (e.g., down-regulation of

genes that define neuronal identity and function, referred to as neuronal identity genes thereafter). This supports an epigenetic origin of gene down-regulation in HD.

#### Other histone modifications

The above results support the view that specific regulatory elements, super-enhancers, are sensitive to the HD mutation. Recent data indicate that selective promoters are also impaired in the striatum of HD mice and patients. Investigating H3K4me3, a mark of active promoters, down-regulated genes in the striatum and cortex of HD R6/2 mice were found to preferentially associate with broad promoters, regulating genes enriched in biological processes linked to neuronal function (Vashishtha et al., 2013). Moreover, H3K4me3 appeared decreased at down-regulated genes in R6/2 vs. WT tissues (Figure 2). Thus, these results show that specific broad promoter signature associates with decreased expression of neuronal genes in the striatum and cortex of HD mice. It is very likely that target genes of broad promoters and super-enhancers in brain tissues overlap



and are enriched in neuronal identity genes. Moreover, in a study using ChIPseq on embryonic stem cells (ESC) and neural progenitor cells (NPC) expressing mutant Htt with various CAG sizes, a correlation was reported between CAG-repeat-dependent changes in gene expression and in H3K4me3 levels, particularly in NSC (Biagioli et al., 2015). This raises the hypothesis that mutant Htt might alter epigenetic regulation at early stage of neuronal differentiation. Finally, H3K4me3 has been investigated in the prefrontal cortex of HD patients using ChIPseq (Bai et al., 2015; Dong et al., 2015). In contrast to mouse data, human data indicate that epigenetic and transcriptional changes in HD vs control tissues are poorly correlated (Bai et al., 2015; Dong et al., 2015). However, in human experiments, sequencing depth appears suboptimal, which may have resulted in underestimation of H3K4me3 signals. Interestingly however, the study by Dong et al. (2015) indicates that promoters differentially enriched in H3K4me3 associate with genes involved in pathways or network linked to neuronal activity and inflammation, suggesting that transcriptional changes affecting inflammatory genes, in addition to those affecting neuronal genes, involve epigenetic mechanisms (Figure 2). The hypothesis that induction of inflammatory genes in HD neuronal tissues associates with loss of identity of glial cells would need to be investigated (Gabel et al., 2016).

Additional epigenetic modifications at regulatory regions might also be impaired. Increased levels of H3K9me2, a mark associated with heterochromatin, have been reported

in the striatum of HD patients and R6/2 mice, using immunohistological analyses (Ryu et al., 2006). Whether specific loci are more particularly sensitive to increased H3K9 methylation in HD models has yet to be investigated using genome-wide approach. Moreover, the level of H3K27me3, a repressive histone modification that can mark promoters and enhancers, was modulated by CAG-repeat size in both ESC and NPC (Seong et al., 2010; Biagioli et al., 2015). However, the transcriptional consequences of this effect were unclear. Finally, H2A ubiquitylation (H2Aub) was found increased at down-regulated genes in HD R6/2 mice (Kim et al., 2008), and ChIP-on-chip analysis of H2Aub changes in R6/2 striatum indicated that histone changes were not restricted to dysregulated genes (McFarland et al., 2012).

#### DNA methylation

Genome-wide analysis of DNA methylation was performed in HD cell models (Ng et al., 2013). Changes in DNA methylation in response to mutant Htt were observed at both promoter proximal and distal regulatory regions. Interestingly, a large fraction of the genes that changed in expression upon mutant Htt expression displayed changes in DNA methylation, suggestive of a causal relationship (Figure 2). DNA methylation was also profiled using post-mortem cortex and liver from HD patients (De Souza et al., 2016). The results revealed minimal evidence of HD-associated DNA methylation. However, the HTT

gene was methylated in a tissue-specific manner, which might lead to tissue-specific regulation of HTT promoter activity. Additionally, 5-hydroxymethylcytosine (5-hmC) and 7-methylguanine (7-MG) were globally reduced in brain tissues of HD mouse models, including YAC128 mice (5-hmC study), R6/2 and CAG140 knockin mice (7-MG study) (Thomas et al., 2013; Wang et al., 2013). While these studies further provide evidence for altered DNA methylation in HD brain tissues, transcriptional consequences of such impairments remains elusive. Analysis of DNA methylation has also been used to assess the epigenetic clock of HD patients (Horvath et al., 2016). Horvath recently developed an epigenetic measure of tissue age, so-called epigenetic age, estimated from DNA methylation levels of 353 CpG sites (Horvath, 2013). The study using brain tissues from HD patients showed accelerated epigenetic aging in HD brain, particularly in cortical tissues. However, this was not the case for striatal tissues, possibly due to excessive neuronal loss (Horvath et al., 2016). While transcriptional significance of accelerated aging in HD brain is unclear, the data might reveal an age-dependent alteration of epigenetic regulation. Finally, treatment of HD mice with the HDAC inhibitor HDACi 4b led to transgenerational effects, possibly mediated by increased DNA methylation at CpG sites associated with Kdm5d (Jia et al., 2015). Thus, DNA methylation may be a therapeutic target for HD.

## Mechanisms Involved in Altered Epigenetic Regulation in HD

As mentioned above, altered histone acetylation in HD has been proposed to result from decreased activity of the HAT CBP, due to CBP recruitment into aggregates of mutant Htt, CBP depletion in neurons expressing mutant Htt and/or through an aberrant interaction of CBP with soluble mutant Htt (Steffan et al., 2000; Nucifora et al., 2001; Jiang et al., 2006; Seredenina and Luthi-Carter, 2012; Glajch and Sadri-Vakili, 2015) (Figure 4). The effect appears specific to CBP since CBP-related HAT p300 was unable to rescue cell toxicity in overexpression assays (Nucifora et al., 2001). However, although studies manipulating CBP levels in HD models support a role for CBP in pathogenesis (Steffan et al., 2000; Klevytska et al., 2010), including cognitive deficits (Giralt et al., 2012), it is still unclear whether altered CBP underlies HD neuronal transcriptional signature.

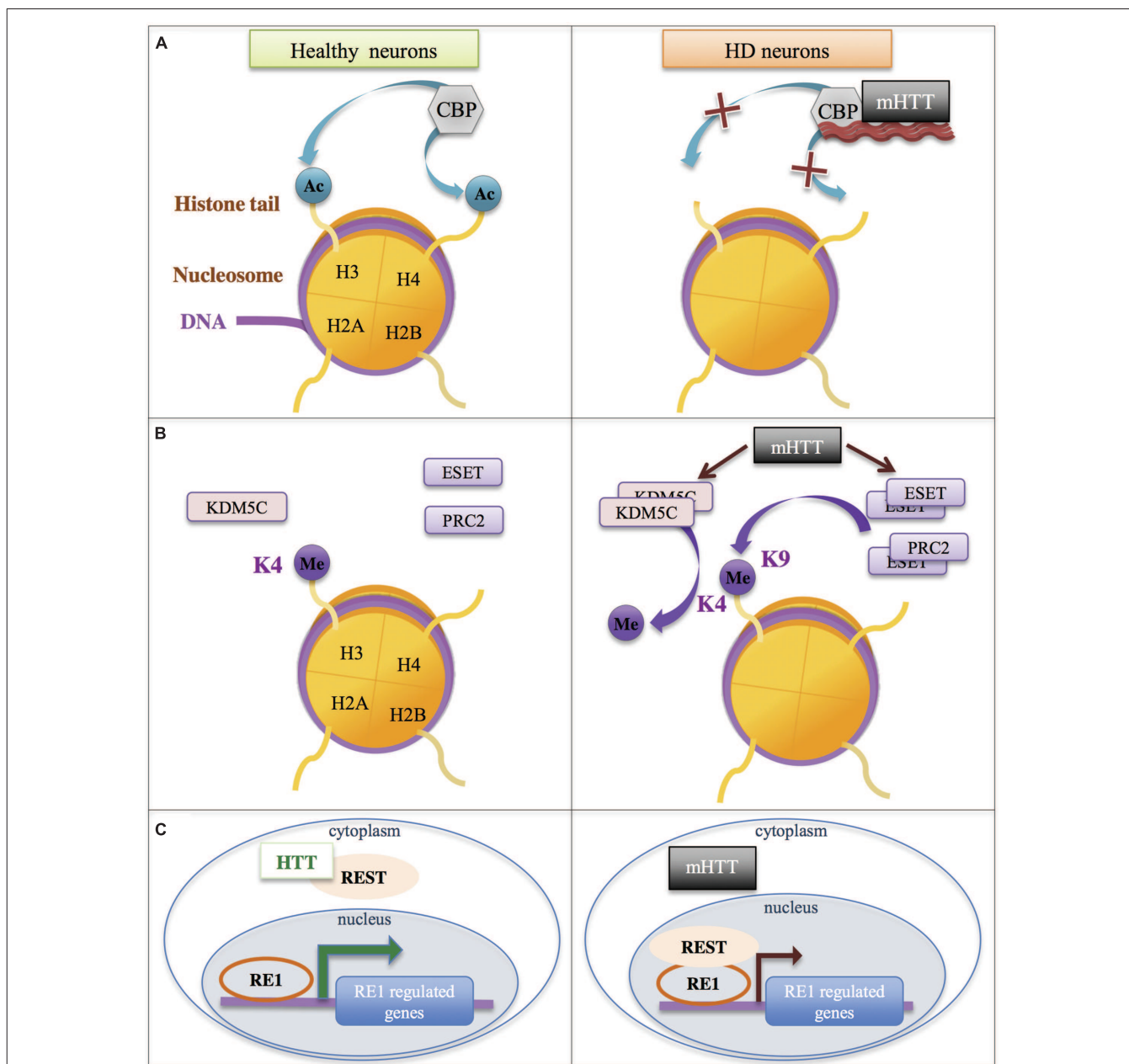
The activity of additional chromatin modulators was also found affected by Htt and/or mutant Htt. Htt was associated with polycomb repressive complex 2 (PRC2) in cell nucleus, which facilitated stimulation of PRC2 activity (Figure 4). Noticeably, CAG-expanded Htt further enhanced PRC2 activity in cell models (Seong et al., 2010). However, although H3K27me3 ChIPseq analyses revealed that Htt null mutation in ESC globally decreased H3K27me3, a result consistent with Htt-mediated stimulation of PRC2, the trend was opposite in NPC, suggesting that Htt may also be implicated in the process of H3K27me3 removal, and these different roles for Htt on H3K27me3 regulation may depend on cell differentiation state (Biagioli et al., 2015). Thus, the role of mutant Htt on genome-wide regulation of H3K27me3 needs to be further investigated, particularly in mature neurons. It is especially important to

specify this issue since PRC2 deficiency in adult neurons leads to molecular, electrophysiological and behavioral phenotypes reminiscent to those seen in HD mice (von Schimmelmann et al., 2016). In fact, inactivation of PRC2 in striatal neurons resulted in re-expression of transcription factors involved in neuronal differentiation and in down-regulation of striatal identity genes, suggesting that transcriptional signatures resulting from PRC2 inactivation and from the expression of mutant Htt in the striatum share similarities (von Schimmelmann et al., 2016).

Additional enzymes modulating histone methylation were also deregulated in HD models. ESET/SETB1, a H3K9 methyltransferase, was increased in the striatum and cortex of HD R6/2 mice due to SP1/SP3-mediated transcriptional activation, which resulted in increased histone H3K9 methylation (Ryu et al., 2006) (Figure 4). Moreover, KDM5C/JARID1C, an enzyme involved in demethylation of H3K4me3, was up-regulated in the striatum and cortex of HD R6/2 mice and proposed to contribute to decreased H3K4me3 in HD brain tissues (Ng et al., 2013; Vashishtha et al., 2013) (Figure 4). Other studies further suggest that Htt and/or mutant Htt affect chromatin structure through modulation of the activity of enzymes regulating histone methylation, including H3K9 and H3K4 methylation (Ooi and Wood, 2007; Lee et al., 2013; Dietz et al., 2015).

As already mentioned, transcription factors also contribute to remodel the chromatin through the recruitment of histone modifying enzymes, including enzymes involved in histone acetylation and methylation. For instance, following binding to their cognate DNA response element, several transcription factors can interact with CBP in a stimulus-dependent manner, thereby increasing CBP concentration and histone acetylation at selective gene regulatory elements (e.g., enhancers and/or promoters) (Sternier and Berger, 2000). Thus, impaired level or activity of transcription factors in HD may also affect epigenetic regulations. Many transcription factors, including REST, SP1, TAF130, p53, were found deregulated in cells expressing the HD mutation, due to aberrant interaction with mutant Htt or altered transcriptional regulations (Nucifora et al., 2001; Bae et al., 2005; Ravache et al., 2010; Zuccato et al., 2010; Moumne et al., 2013; Langfelder et al., 2016) (Figure 3). It is tempting to speculate that some of these factors, particularly those regulating neuronal differentiation or maintenance of neuronal fate (this is for instance the case of REST), might contribute to HD epigenetic and transcriptional alterations.

Additionally, the ability of transcription factors to interact with chromatin-modifying enzymes depends in some cases on the activation of specific signaling pathways, which permits to optimize the coupling between epigenetic and transcriptional responses after stimulation. This is the case for CREB, which needs to be phosphorylated in response to activation of cAMP signaling pathway, to bind and recruit CBP on chromatin (Cardinaux et al., 2000). The Ras/MAPK/MSK1 signaling pathway is another pathway, where transcriptional and epigenetic responses are coordinated through phosphorylation events targeting transcription factors and histones (e.g., ELK1 and H3 at serine 10, respectively) (Brami-Cherrier et al., 2009; Bahrami and Drablos, 2016). These pathways, which control



**FIGURE 4 | Additional mechanisms involved in gene down-regulation in HD.** Mutant HTT (mHTT) leads to the modulation of the activity of chromatin modifiers/complexes (e.g., CBP, ESET, KDM5C, PRC2) and transcriptional regulators (e.g., REST). **(A)** The HAT CBP is sequestered in mHTT aggregates and/or interacts with soluble mHTT, which reduces its activity, leading to reduction of histone acetylation. **(B)** Increased levels/activities of the H3K4me3 demethylase KDM5C, of the methyltransferase ESET and of polycomb repressive complex PRC2 lead to increased histone methylation. **(C)** HTT interacts with REST, limiting its availability in the nucleus. This interaction is impaired with mHTT, leading to increased binding of REST to RE1 elements and down-regulation of RE1-regulated genes. ESET, ERG-Associated Protein with SET Domain; HTT, Huntingtin; KDM5C, Lysine Demethylase 5C; PRC2, polycomb repressive complex 2; REST, RE1 Silencing Transcription Factor.

the dynamics of IEGs expression such as *Fos*, *Egr1*, and *Arc*, play a key role in the regulation of neuronal activity, including plasticity and excitability (Besnard et al., 2011; West and Greenberg, 2011; Lopez-Atalaya and Barco, 2014). Several studies suggest that these pathways are impaired in HD striatum, raising the hypothesis that the coupling between epigenetic

and transcriptional mechanisms regulating neuronal activity is altered in HD (Besnard et al., 2011; Langfelder et al., 2016), which might contribute to altered epigenetic regulations (Chawla et al., 2003).

Despite these hypotheses, it remains unclear how mutant Htt leads to selective alteration of the chromatin associated with

**TABLE 1 | Examples of histone deacetylase (HDAC)-alternative epigenetic therapies.**

Drug family	Target	Molecules	Mechanisms and effects	Reference
HAT activators	p300/CBP	N-(4-chloro-3-trifluoromethyl-phenyl)-2-ethoxy-6-pentadecyl-ben-zamide (CTPB)	CTPB leads to the neurite growth of a PD cell model, and protects them from cell death induced by the neurotoxin 6-hydroxydopamine.	Hegarty et al., 2016
	p300/CBP	CSP-TTK21	CSP-TTK21 promotes differentiation and maturation of young adult hippocampal neurons and improves long-term retention of a spatial memory.	Chatterjee et al., 2013
HAT inhibitors	p300	C646	C646 reduces amount of Tau and neurotoxicity in culture rat neurons. C646 enhances fear extinction memory and synaptic plasticity.	Min et al., 2010
Histone methyltransferase inhibitors	EZH2	3- deazaneplanocin A (DZNep)	DZNep reactivates silenced genes in cancer cells and developmental genes that are not silenced by DNA methylation. DZNep inhibits H3K27me3 and H4K20me3.	Miranda et al., 2009
DNA methyltransferase inhibitors	DNMT1&3	Nucleoside analog: 5-fluoro-2'-deoxycytidine (FdCyd)	FdCyd has neuroprotective effects against mutant Htt-induced toxicity in primary cortical neurons in cell viability and neurite degeneration assays.	Pan et al., 2016
	DNMT1&3	Non-nucleoside inhibitor : RG108	RG108 is a DNMT active site inhibitor. RG108 blocks the increase in 5-methylcytosine and prevents cell death in a mouse model of motor neuron disease model.	Chestnut et al., 2011
DNA methyltransferase activators	DNMT	PARP	Loss of nucleolar PARP-1 results in DNA methyltransferase activation. This may impact on ribosomal DNA silencing observed in AD.	Zeng et al., 2016
	DNMT1	Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 (LMP1)	LMP1 directly induces the dnmt1 promoter activity through its COOH-terminal activation region-2 YYD domain.	Tsai et al., 2006; Li J. et al., 2016

CBP, CREB-binding protein; EZH2, Enhancer of Zeste Homolog 2; DNMT, DNA MethylTransferase; HAT, Histone AcetylTransferase.

neuronal identity genes. The underlying mechanism may be the addition of direct effects of mutant Htt on the chromatin and transcription regulators described above (e.g., CBP, PRC2, ESET/SETB1, KDM5C/JARID1C, REST, SP1, CREB, TAF130, p53). Alternatively, it may be the result of an indirect mechanism caused by mutant Htt on neuronal homeostasis and activity that is yet to be identified.

## EMERGING PICTURE AND PERSPECTIVES

Here, we reviewed the current understanding of the role of neuroepigenetics in HD, in an attempt to uncover the significance of epigenetic changes in HD brain, a prerequisite to the rational design of epigenetic therapies.

Three main questions underlie the review: (1) What are epigenetic changes in HD? (2) What is the consequence of epigenetic changes in HD, particularly on transcriptional regulation? (3) What mechanism(s) cause(s) epigenetic changes in HD? Although, we still lack complete answers to any of these questions, an emerging picture arises, supporting the view that maintenance and/or establishment of neuron-specific chromatin identity is altered in HD, which leads to down-regulation of neuronal identity genes. This suggests that mutant Htt might interfere with neuronal differentiation, in agreement with recent studies (Molero et al., 2016). To investigate this hypothesis, it will be crucial to assess HD epigenome and transcriptome across time, including developmental stages. If altered epigenetic regulation

in HD brain results in down-regulation of neuronal identity genes, it is very likely to disturb neuronal activity, including synaptic plasticity and neuronal excitability, controlling learning and memory processes. This will need to be investigated. The issue of tissue-/cell-specificity of epigenetic alterations in HD also remains to be investigated. It is unclear whether the HD mutation induces similar epigenetic changes between cell types (e.g., neurons vs. glial cells) or between different tissues (e.g., striatum vs. cortex, hippocampus or cerebellum, neuronal tissue vs. non-neuronal tissue). It will also be crucial to investigate the timing of establishment of super-enhancer signatures relative to transcriptional changes to specify the relationship between epigenetic and transcriptional changes in HD brain tissues. Addressing these questions will certainly provide insights into the mechanism causing epigenetic and transcriptional changes in HD, which may be a key to the identification of new therapeutic targets.

Comprehensive analysis of the HD epigenome using various HD models and genome-wide techniques, including techniques that permit to investigate epigenomes at cell type-specific or single-cell scale and in 3D (using chromosome conformation capture- (3C)-based methods) is necessary to address these questions. Another challenge will be to develop bioinformatics methods to analyze the data and extract meaning. This may require the development of approaches that reduce complexity, such as network-based methods (Langfelder and Horvath, 2008; Parmentier et al., 2013).

Epigenetic therapies to treat neurodegenerative diseases have been first considered for HD, when Steffan et al. (2000) showed

that HDAC inhibitors improve the phenotype of HD flies. In fact, preclinical studies to evaluate the effect of HDAC inhibitors in HD have inspired other neurodegenerative diseases, including additional trinucleotide repeat (TNR) diseases (for review see Evans-Galea et al., 2013) PD, Alzheimer disease (AD), and amyotrophic lateral sclerosis (ALS) (Xu et al., 2011; Lazo-Gomez et al., 2013; Sharma and Taliyan, 2015a). Beneficial effects have been observed in preclinical models for these different diseases, though the effects of HDAC inhibitors appear partial and underlying mechanisms are unclear (Benito et al., 2015; Harrison et al., 2015). In the specific case of TNR diseases, HDAC inhibitors may affect disease progression through two independent mechanisms: (1) through a general effect on gene expression program, (2) through modulation of the stability of TNRs, which are subject to epigenetic regulations (Goula et al., 2012; Evans-Galea et al., 2013). To overcome limitations associated with the use of HDCAi, including the lack of specificity and toxicity, HDCAi-alternative epigenetic therapies are currently being developed that are based on HAT activators, histone methyltransferase inhibitors and DNMT modulators (Table 1).

Epigenomic studies on HD models might benefit from studies in other neurodegenerative diseases and reciprocally. Indeed,

the similarity of epigenomic and transcriptomic signatures between HD and AD models (e.g., neuronal and inflammation signatures) is intriguing and might suggest that common epigenetic mechanisms to several neurodegenerative diseases might operate (Gjoneska et al., 2015).

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

LF and KM developed the literature review. KM, LF, and EB wrote the manuscript. LF and CL built the figures. All the authors read and commented the article throughout the writing, and collaborated in the revision of the final manuscript before submission.

## FUNDING

This work was supported by funds from the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS). CL is a Ph.D. student supported by the French Research Ministry. LF is supported by a Postdoctoral Fellowship of the Alexander-von-Humboldt Foundation. TO is supported by the DFG Center for Nanoscale Microscopy and Molecular Physiology of the Brain (CNMPB).

## REFERENCES

- Achour, M., Le Gras, S., Keime, C., Parmentier, F., Lejeune, F. X., Boutillier, A. L., et al. (2015). Neuronal identity genes regulated by super-enhancers are preferentially down-regulated in the striatum of Huntington's disease mice. *Hum. Mol. Genet.* 24, 3481–3496. doi: 10.1093/hmg/ddv099
- Alberini, C. M., and Kandel, E. R. (2015). The regulation of transcription in memory consolidation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7:a021741. doi: 10.1101/cshperspect.a021741
- Allis, C. D., and Jenuwein, T. (2016). The molecular hallmarks of epigenetic control. *Nat. Rev. Genet.* 17, 487–500. doi: 10.1038/nrg.2016.59
- Arrasate, M., and Finkbeiner, S. (2012). Protein aggregates in Huntington's disease. *Exp. Neurol.* 238, 1–11. doi: 10.1016/j.expneurol.2011.12.013
- Bae, B. I., Xu, H., Igarashi, S., Fujimuro, M., Agrawal, N., Taya, Y., et al. (2005). p53 mediates cellular dysfunction and behavioral abnormalities in Huntington's disease. *Neuron* 47, 29–41. doi: 10.1016/j.neuron.2005.06.005
- Bahrami, S., and Drablos, F. (2016). Gene regulation in the immediate-early response process. *Adv. Biol. Regul.* 62, 37–49. doi: 10.1016/j.jbior.2016.05.001
- Bai, G., Cheung, I., Shulha, H. P., Coelho, J. E., Li, P., Dong, X., et al. (2015). Epigenetic dysregulation of hairy and enhancer of split 4 (HES4) is associated with striatal degeneration in postmortem Huntington brains. *Hum. Mol. Genet.* 24, 1441–1456. doi: 10.1093/hmg/ddu561
- Bannister, A. J., and Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* 21, 381–395. doi: 10.1038/cr.2011.22
- Becanovic, K., Pouladi, M. A., Lim, R. S., Kuhn, A., Pavlidis, P., Luthi-Carter, R., et al. (2010). Transcriptional changes in Huntington disease identified using genome-wide expression profiling and cross-platform analysis. *Hum. Mol. Genet.* 19, 1438–1452. doi: 10.1093/hmg/ddq018
- Beconi, M., Aziz, O., Matthews, K., Mounné, L., O'Connell, C., Yates, D., et al. (2012). Oral administration of the pimelic diphenylamide HDAC inhibitor HDACi 4b is unsuitable for chronic inhibition of HDAC activity in the CNS in vivo. *PLoS ONE* 7:e44498. doi: 10.1371/journal.pone.0044498
- Benito, E., Urbanke, H., Ramachandran, B., Barth, J., Halder, R., Awasthi, A., et al. (2015). HDAC inhibitor-dependent transcriptome and memory reinstatement in cognitive decline models. *J. Clin. Invest.* 125, 3572–3584. doi: 10.1172/JCI79942
- Besnard, A., Galan-Rodriguez, B., Vanhoutte, P., and Caboche, J. (2011). Elk-1 a transcription factor with multiple facets in the brain. *Front. Neurosci.* 5:35. doi: 10.3389/fnins.2011.00035
- Biagioli, M., Ferrari, F., Mendenhall, E. M., Zhang, Y., Erdin, S., Vijayvargia, R., et al. (2015). Htt CAG repeat expansion confers pleiotropic gains of mutant huntingtin function in chromatin regulation. *Hum. Mol. Genet.* 24, 2442–2457. doi: 10.1093/hmg/ddv006
- Bock, C., Farlik, M., and Sheffield, N. C. (2016). Multi-omics of single cells: strategies and applications. *Trends Biotechnol.* 34, 605–608. doi: 10.1016/j.tibtech.2016.04.004
- Boland, M. J., Nazor, K. L., and Loring, J. F. (2014). Epigenetic regulation of pluripotency and differentiation. *Circ. Res.* 115, 311–324. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.301517
- Borrelli, E., Nestler, E. J., Allis, C. D., and Sassone-Corsi, P. (2008). Decoding the epigenetic language of neuronal plasticity. *Neuron* 60, 961–974. doi: 10.1016/j.neuron.2008.10.012
- Bousiges, O., Neidl, R., Majchrzak, M., Muller, M. A., Barbelivien, A., Pereira, de Vasconcelos A, et al. (2013). Detection of histone acetylation levels in the dorsal hippocampus reveals early tagging on specific residues of H2B and H4 histones in response to learning. *PLoS ONE* 8:e57816. doi: 10.1371/journal.pone.0057816
- Brami-Cherrier, K., Roze, E., Girault, J. A., Betuing, S., and Caboche, J. (2009). Role of the ERK/MSK1 signalling pathway in chromatin remodelling and brain responses to drugs of abuse. *J. Neurochem.* 108, 1323–1335. doi: 10.1111/j.1471-4159.2009.05879.x
- Cardinaux, J. R., Notis, J. C., Zhang, Q., Vo, N., Craig, J. C., Fass, D. M., et al. (2000). Recruitment of CREB binding protein is sufficient for CREB-mediated gene activation. *Mol. Cell. Biol.* 20, 1546–1552. doi: 10.1128/MCB.20.5.1546-1552.2000
- Cedar, H., and Bergman, Y. (2009). Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nat. Rev. Genet.* 10, 295–304. doi: 10.1038/nrg2540
- Chatterjee, S., Mizar, P., Cassel, R., Neidl, R., Selvi, B. R., Mohankrishna, D. V., et al. (2013). A novel activator of CBP/p300 acetyltransferases promotes neurogenesis and extends memory duration in adult mice. *J. Neurosci.* 33, 10698–10712. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5772-12.2013
- Chawla, S., Vanhoutte, P., Arnold, F. J., Huang, C. L., and Bading, H. (2003). Neuronal activity-dependent nucleocytoplasmic shuttling of HDAC4



- and HDAC5. *J. Neurochem.* 85, 151–159. doi: 10.1046/j.1471-4159.2003.01648.x
- Chestnut, B. A., Chang, Q., Price, A., Lesuisse, C., Wong, M., and Martin, L. J. (2011). Epigenetic regulation of motor neuron cell death through DNA methylation. *J. Neurosci.* 31, 16619–16636. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1639-11.2011
- Cicchetti, F., Gould, P. V., and Parent, A. (1996). Sparing of striatal neurons coexpressing calretinin and substance P (NK1) receptor in Huntington's disease. *Brain Res.* 730, 232–237. doi: 10.1016/0006-8993(96)00307-1
- Coppede, F. (2014). The potential of epigenetic therapies in neurodegenerative diseases. *Front. Genet.* 5:220. doi: 10.3389/fgene.2014.00220
- Day, J. J., and Sweatt, J. D. (2011). Cognitive neuroepigenetics: a role for epigenetic mechanisms in learning and memory. *Neurobiol. Learn. Mem.* 96, 2–12. doi: 10.1016/j.nlm.2010.12.008
- De Souza, R. A., Islam, S. A., McEwen, L. M., Mathelier, A., Hill, A., Mah, S. M., et al. (2016). DNA methylation profiling in human Huntington's disease brain. *Hum. Mol. Genet.* 25, 2013–2030. doi: 10.1093/hmg/ddw076
- Deans, C., and Maggert, K. A. (2015). What do you mean, "epigenetic"? *Genetics* 199, 887–896. doi: 10.1534/genetics.114.173492
- Deaton, A. M., and Bird, A. (2011). CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev.* 25, 1010–1022. doi: 10.1101/gad.2037511
- Desplats, P. A., Kass, K. E., Gilmartin, T., Stanwood, G. D., Woodward, E. L., Head, S. R., et al. (2006). Selective deficits in the expression of striatal-enriched mRNAs in Huntington's disease. *J. Neurochem.* 96, 743–757. doi: 10.1111/j.1471-4159.2005.03588.x
- Dietz, K. N., Di, Stefano, L., Maher, R. C., Zhu, H., Macdonald, M. E., Gusella, J. F., et al. (2015). The Drosophila Huntington's disease gene ortholog dhht influences chromatin regulation during development. *Hum. Mol. Genet.* 24, 330–345. doi: 10.1093/hmg/ddu446
- DiFiglia, M., Sapp, E., Chase, K. O., Davies, S. W., Bates, G. P., Vonsattel, J. P., et al. (1997). Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science* 277, 1990–1993. doi: 10.1126/science.277.5334.1990
- Dong, X., Tsuji, J., Labadorf, A., Roussos, P., Chen, J. F., Myers, R. H., et al. (2015). The Role of H3K4me3 in transcriptional regulation is altered in Huntington's Disease. *PLoS ONE* 10:e0144398. doi: 10.1371/journal.pone.0144398
- Du, Q., Luu, P. L., Stirzaker, C., and Clark, S. J. (2015). Methyl-CpG-binding domain proteins: readers of the epigenome. *Epigenomics* 7, 1051–1073. doi: 10.2217/epi.15.39
- Evans-Galea, M. V., Hannan, A. J., Carroddus, N., Delatycki, M. B., and Saffery, R. (2013). Epigenetic modifications in trinucleotide repeat diseases. *Trends Mol. Med.* 19, 655–663. doi: 10.1016/j.molmed.2013.07.007
- Federman, N., Fustinana, M. S., and Romano, A. (2009). Histone acetylation is recruited in consolidation as a molecular feature of stronger memories. *Learn. Mem.* 16, 600–606. doi: 10.1101/lm.1537009
- Feng, J., Shao, N., Szulwach, K. E., Vialou, V., Huynh, J., Zhong, C., et al. (2015). Role of Tet1 and 5-hydroxymethylcytosine in cocaine action. *Nat. Neurosci.* 18, 536–544. doi: 10.1038/nn.3976
- Feng, J., Zhou, Y., Campbell, S. L., Le, T., Li, E., Sweatt, J. D., et al. (2010). Dnmt1 and Dnmt3a maintain DNA methylation and regulate synaptic function in adult forebrain neurons. *Nat. Neurosci.* 13, 423–430. doi: 10.1038/nn.2514
- Ferrante, R. J., Beal, M. F., Kowall, N. W., Richardson, E. P. Jr., and Martin, J. B. (1987a). Sparing of acetylcholinesterase-containing striatal neurons in Huntington's disease. *Brain Res.* 411, 162–166. doi: 10.1016/0006-8993(87)90694-9
- Ferrante, R. J., Kowall, N. W., Beal, M. F., Martin, J. B., Bird, E. D., and Richardson, E. P. Jr. (1987b). Morphologic and histochemical characteristics of a spared subset of striatal neurons in Huntington's disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 46, 12–27. doi: 10.1097/00005072-198701000-00002
- Ferrante, R. J., Kubilus, J. K., Lee, J., Ryu, H., Beesen, A., Zucker, B., et al. (2003). Histone deacetylase inhibition by sodium butyrate chemotherapy ameliorates the neurodegenerative phenotype in Huntington's disease mice. *J. Neurosci.* 23, 9418–9427.
- Francelli, L., Galvan, L., and Brouillet, E. (2014). Possible involvement of self-defense mechanisms in the preferential vulnerability of the striatum in Huntington's disease. *Front. Cell Neurosci.* 8:295. doi: 10.3389/fncel.2014.00295
- Gabel, S., Koncina, E., Dorban, G., Heurtaux, T., Birck, C., Glaab, E., et al. (2016). Inflammation Promotes a conversion of astrocytes into neural progenitor cells via NF-kappaB activation. *Mol. Neurobiol.* 53, 5041–5055. doi: 10.1007/s12035-015-9428-3
- Gardian, G., Browne, S. E., Choi, D. K., Klivenyi, P., Gregorio, J., Kubilus, J. K., et al. (2005). Neuroprotective effects of phenylbutyrate in the N171-82Q transgenic mouse model of Huntington's disease. *J. Biol. Chem.* 280, 556–563. doi: 10.1074/jbc.M410210200
- Giralt, A., Puigdel·l·ivol, M., Carret·n, O., Paoletti, P., Valero, J., Parra-Damas, A., et al. (2012). Long-term memory deficits in Huntington's disease are associated with reduced CBP histone acetylase activity. *Hum. Mol. Genet.* 21, 1203–1216. doi: 10.1093/hmg/ddr552
- Gjoneska, E., Pfenning, A. R., Mathys, H., Quon, G., Kundaje, A., Tsai, L. H., et al. (2015). Conserved epigenomic signals in mice and humans reveal immune basis of Alzheimer's disease. *Nature* 518, 365–369. doi: 10.1038/nature14252
- Glajch, K. E., and Sadri-Vakili, G. (2015). Epigenetic Mechanisms Involved in Huntington's Disease Pathogenesis. *J. Huntingtons Dis.* 4, 1–15. doi: 10.3233/JHD-159001
- Godena, V. K., Brookes-Hocking, N., Moller, A., Shaw, G., Oswald, M., Sancho, R. M., et al. (2014). Increasing microtubule acetylation rescues axonal transport and locomotor deficits caused by LRRK2 Roc-COR domain mutations. *Nat. Commun.* 5:5245. doi: 10.1038/ncomms6245
- Goula, A.-V., Stys, A., Chan, J. P. K., Trottier, Y., Festenstein, R., and Merienne, K. (2012). Transcription elongation and tissue-specific somatic CAG instability. *PLoS Genet.* 8:e1003051. doi: 10.1371/journal.pgen.1003051
- Graff, J., and Tsai, L. H. (2013). Histone acetylation: molecular mnemonics on the chromatin. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 97–111. doi: 10.1038/nrn3427
- Guiretti, D., Sempere, A., Lopez-Atalaya, J. P., Ferrer-Montiel, A., Barco, A., and Valor, L. M. (2016). Specific promoter deacetylation of histone H3 is conserved across mouse models of Huntington's disease in the absence of bulk changes. *Neurobiol. Dis.* 89, 190–201. doi: 10.1016/j.nbd.2016.02.004
- Guo, J. U., Su, Y., Zhong, C., Ming, G. L., and Song, H. (2011). Hydroxylation of 5-methylcytosine by TET1 promotes active DNA demethylation in the adult brain. *Cell* 145, 423–434. doi: 10.1016/j.cell.2011.03.022
- Halder, R., Hennion, M., Vidal, R. O., Shomroni, O., Rahman, R. U., Rajput, A., et al. (2016). DNA methylation changes in plasticity genes accompany the formation and maintenance of memory. *Nat. Neurosci.* 19, 102–110. doi: 10.1038/nn.4194
- Harrison, I. F., Crum, W. R., Vernon, A. C., and Dexter, D. T. (2015). Neurorestoration induced by the HDAC inhibitor sodium valproate in the lactacystin model of Parkinson's is associated with histone acetylation and up-regulation of neurotrophic factors. *Br. J. Pharmacol.* 172, 4200–4215. doi: 10.1111/bph.13208
- Hegarty, S. V., O'Leary, E., Solger, F., Stanicka, J., Sullivan, A. M., and O'Keefe, G. W. (2016). A small molecule activator of p300/CBP histone acetyltransferase promotes survival and neurite growth in a cellular model of parkinson's disease. *Neurotox. Res.* 30, 510–520. doi: 10.1007/s12640-016-9636-2
- Herman, D., Jentsen, K., Burnett, R., Soragni, E., Perlman, S. L., and Gottesfeld, J. M. (2006). Histone deacetylase inhibitors reverse gene silencing in Friedreich's ataxia. *Nat. Chem. Biol.* 2, 551–558. doi: 10.1038/nchembio815
- Hockly, E., Richon, V. M., Woodman, B., Smith, D. L., Zhou, X., Rosa, E., et al. (2003). Suberoylanilide hydroxamic acid, a histone deacetylase inhibitor, ameliorates motor deficits in a mouse model of Huntington's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 2041–2046. doi: 10.1073/pnas.0437870100
- Hodges, A., Strand, A. D., Aragaki, A. K., Kuhn, A., Sengstag, T., Hughes, G., et al. (2006). Regional and cellular gene expression changes in human Huntington's disease brain. *Hum. Mol. Genet.* 15, 965–977. doi: 10.1093/hmg/ddl013
- Hogarth, P., Lovrecic, L., and Krainc, D. (2007). Sodium phenylbutyrate in Huntington's disease: a dose-finding study. *Mov. Disord.* 22, 1962–1964. doi: 10.1002/mds.21632
- Holliday, R. (2006). Epigenetics: a historical overview. *Epigenetics* 1, 76–80. doi: 10.4161/epi.1.2.2762
- Horvath, S. (2013). DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biol.* 14:R115. doi: 10.1186/gb-2013-14-10-r115
- Horvath, S., Langfelder, P., Kwak, S., Aaronson, J., Rosinski, J., Vogt, T. F., et al. (2016). Huntington's disease accelerates epigenetic aging of human brain and disrupts DNA methylation levels. *Aging (Albany NY)* 8, 1485–1512. doi: 10.18632/aging.101005

- Igarashi, S., Morita, H., Bennett, K. M., Tanaka, Y., Engelender, S., Peters, M. F., et al. (2003). Inducible PC12 cell model of Huntington's disease shows toxicity and decreased histone acetylation. *Neuroreport* 14, 565–568. doi: 10.1097/00001756-200303240-00007
- Jaenisch, R., and Bird, A. (2003). Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat. Genet.* 33(Suppl.), 245–254. doi: 10.1038/ng1089
- Jeltsch, A. (2006). Molecular enzymology of mammalian DNA methyltransferases. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 301, 203–225.
- Jenuwein, T., and Allis, C. D. (2001). Translating the histone code. *Science* 293, 1074–1080. doi: 10.1126/science.1063127
- Jia, H., Kast, R. J., Steffan, J. S., and Thomas, E. A. (2012). Selective histone deacetylase (HDAC) inhibition imparts beneficial effects in Huntington's disease mice: implications for the ubiquitin-proteasomal and autophagy systems. *Hum. Mol. Genet.* 21, 5280–5293. doi: 10.1093/hmg/dd3379
- Jia, H., Morris, C. D., Williams, R. M., Loring, J. F., and Thomas, E. A. (2015). HDAC inhibition imparts beneficial transgenerational effects in Huntington's disease mice via altered DNA and histone methylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112, E56–E64. doi: 10.1073/pnas.1415195112
- Jia, H., Wang, Y., Morris, C. D., Jacques, V., Gottesfeld, J. M., Rusche, J. R., et al. (2016). The Effects of Pharmacological Inhibition of Histone Deacetylase 3 (HDAC3) in Huntington's Disease Mice. *PLoS ONE* 11:e0152498. doi: 10.1371/journal.pone.0152498
- Jiang, H., Poirier, M. A., Liang, Y., Pei, Z., Weiskittel, C. E., Smith, W. W., et al. (2006). Depletion of CBP is directly linked with cellular toxicity caused by mutant huntingtin. *Neurobiol. Dis.* 23, 543–551. doi: 10.1016/j.nbd.2006.04.011
- Jones, P. A., Issa, J. P., and Baylin, S. (2016). Targeting the cancer epigenome for therapy. *Nat. Rev. Genet.* 17, 630–641. doi: 10.1038/nrg.2016.93
- Kazantsev, A., Walker, H. A., Slepko, N., Bear, J. E., Preisinger, E., Steffan, J. S., et al. (2002). A bivalent Huntingtin binding peptide suppresses polyglutamine aggregation and pathogenesis in *Drosophila*. *Nat. Genet.* 30, 367–376. doi: 10.1038/ng864
- Kim, M. O., Chawla, P., Overland, R. P., Xia, E., Sadri-Vakili, G., and Cha, J. H. (2008). Altered histone monoubiquitylation mediated by mutant huntingtin induces transcriptional dysregulation. *J. Neurosci.* 28, 3947–3957. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5667-07.2008
- Klevytska, A. M., Tebbenkamp, A. T., Savonenko, A. V., and Borchelt, D. R. (2010). Partial depletion of CREB-binding protein reduces life expectancy in a mouse model of Huntington disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 69, 396–404. doi: 10.1097/NEN.0b013e3181d6c436
- Korzus, E. (2010). Manipulating the brain with epigenetics. *Nat. Neurosci.* 13, 405–406. doi: 10.1038/nn0410-405
- Kuhn, A., Goldstein, D. R., Hodges, A., Strand, A. D., Sengstag, T., Kooperberg, C., et al. (2007). Mutant huntingtin's effects on striatal gene expression in mice recapitulate changes observed in human Huntington's disease brain and do not differ with mutant huntingtin length or wild-type huntingtin dosage. *Hum. Mol. Genet.* 16, 1845–1861. doi: 10.1093/hmg/ddm133
- Labadorf, A., Hoss, A. G., Lagomarsino, V., Latourelle, J. C., Hadzi, T. C., Bregu, J., et al. (2015). RNA sequence analysis of human huntington disease brain reveals an extensive increase in inflammatory and developmental gene expression. *PLoS ONE* 10:e0143563. doi: 10.1371/journal.pone.0143563
- Labbadia, J., and Morimoto, R. I. (2013). Huntington's disease: underlying molecular mechanisms and emerging concepts. *Trends Biochem. Sci.* 38, 378–385. doi: 10.1016/j.tibs.2013.05.003
- Landgrave-Gomez, J., Mercado-Gomez, O., and Guevara-Guzman, R. (2015). Epigenetic mechanisms in neurological and neurodegenerative diseases. *Front. Cell Neurosci.* 9:58. doi: 10.3389/fncel.2015.00058
- Landles, C., and Bates, G. P. (2004). Huntingtin and the molecular pathogenesis of Huntington's disease. Fourth in molecular medicine review series. *EMBO Rep.* 5, 958–963. doi: 10.1038/sj.embor.7400250
- Langfelder, P., Cante, J. P., Chatzopoulou, D., Wang, N., Gao, F., Al-Ramahi, I., et al. (2016). Integrated genomics and proteomics define huntingtin CAG length-dependent networks in mice. *Nat. Neurosci.* 19, 623–633. doi: 10.1038/nn.4256
- Langfelder, P., and Horvath, S. (2008). WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis. *BMC Bioinformatics* 9:559. doi: 10.1186/1471-2105-9-559
- Lazo-Gomez, R., Ramirez-Jarquín, U. N., Tovar, Y. R. L. B., and Tapia, R. (2013). Histone deacetylases and their role in motor neuron degeneration. *Front. Cell Neurosci.* 7:243. doi: 10.3389/fncel.2013.00243
- Lee, J., Hwang, Y. J., Kim, K. Y., Kowall, N. W., and Ryu, H. (2013). Epigenetic mechanisms of neurodegeneration in Huntington's disease. *Neurotherapeutics* 10, 664–676. doi: 10.1007/s13311-013-0206-5
- Lev Maor, G., Yearim, A., and Ast, G. (2015). The alternative role of DNA methylation in splicing regulation. *Trends Genet.* 31, 274–280. doi: 10.1016/j.tig.2015.03.002
- Li, J., Liu, X., Liu, M., Che, K., and Luo, B. (2016). Methylation and expression of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1, 2A and 2B in EBV-associated gastric carcinomas and cell lines. *Dig. Liver Dis.* 48, 673–680. doi: 10.1016/j.dld.2016.02.017
- Li, L., Liu, H., Dong, P., Li, D., Legant, W. R., Grimm, J. B., et al. (2016). Real-time imaging of Huntingtin aggregates diverting target search and gene transcription. *Elife* 5:e17056. doi: 10.7554/eLife.17056
- Liu, L., Jin, G., and Zhou, X. (2015). Modeling the relationship of epigenetic modifications to transcription factor binding. *Nucleic Acids Res.* 43, 3873–3885. doi: 10.1093/nar/gkv255
- Lopez-Atalaya, J. P., and Barco, A. (2014). Can changes in histone acetylation contribute to memory formation? *Trends Genet.* 30, 529–539. doi: 10.1016/j.tig.2014.09.003
- Luthi-Carter, R., Strand, A., Peters, N. L., Solano, S. M., Hollingsworth, Z. R., Menon, A. S., et al. (2000). Decreased expression of striatal signaling genes in a mouse model of Huntington's disease. *Hum. Mol. Genet.* 9, 1259–1271. doi: 10.1093/hmg/9.9.1259
- Luthi-Carter, R., Strand, A. D., Hanson, S. A., Kooperberg, C., Schilling, G., La Spada AR, et al. (2002). Polyglutamine and transcription: gene expression changes shared by DRPLA and Huntington's disease mouse models reveal context-independent effects. *Hum. Mol. Genet.* 11, 1927–1937. doi: 10.1093/hmg/11.17.1927
- Marconett, C. N., Zhou, B., Rieger, M. E., Selamat, S. A., Dubourd, M., Fang, X., et al. (2013). Integrated transcriptomic and epigenomic analysis of primary human lung epithelial cell differentiation. *PLoS Genet.* 9:e1003513. doi: 10.1371/journal.pgen.1003513
- McFarland, K. N., Das, S., Sun, T. T., Leyfer, D., Xia, E., Sangrey, G. R., et al. (2012). Genome-wide histone acetylation is altered in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *PLoS ONE* 7:e41423. doi: 10.1371/journal.pone.0041423
- Meadows, J. P., Guzman-Karlsson, M. C., Phillips, S., Brown, J. A., Strange, S. K., Sweatt, J. D., et al. (2016). Dynamic DNA methylation regulates neuronal intrinsic membrane excitability. *Sci. Signal.* 9:ra83. doi: 10.1126/scisignal.aaf5642
- Mielcarek, M., Benn, C. L., Franklin, S. A., Smith, D. L., Woodman, B., Marks, P. A., et al. (2011). SAHA decreases HDAC 2 and 4 levels in vivo and improves molecular phenotypes in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. *PLoS ONE* 6:e27746. doi: 10.1371/journal.pone.0027746
- Min, S. W., Cho, S. H., Zhou, Y., Schroeder, S., Haroutunian, V., Seeley, W. W., et al. (2010). Acetylation of tau inhibits its degradation and contributes to tauopathy. *Neuron* 67, 953–966. doi: 10.1016/j.neuron.2010.08.044
- Minatohara, K., Akiyoshi, M., and Okuno, H. (2015). Role of immediate-early genes in synaptic plasticity and neuronal ensembles underlying the memory trace. *Front. Mol. Neurosci.* 8:78. doi: 10.3389/fnmol.2015.00078
- Miranda, T. B., Cortez, C. C., Yoo, C. B., Liang, G., Abe, M., Kelly, T. K., et al. (2009). DNep is a global histone methylation inhibitor that reactivates developmental genes not silenced by DNA methylation. *Mol. Cancer Ther.* 8, 1579–1588. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-09-0013
- Molero, A. E., Arteaga-Bracho, E. E., Chen, C. H., Gulino, M., Winchester, M. L., Pichamoorthy, N., et al. (2016). Selective expression of mutant huntingtin during development recapitulates characteristic features of Huntington's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113, 5736–5741. doi: 10.1073/pnas.1603871113
- Moumne, L., Betuing, S., and Caboche, J. (2013). Multiple aspects of gene dysregulation in Huntington's Disease. *Front. Neurol.* 4:127. doi: 10.3389/fneur.2013.00127
- Moumne, L., Campbell, K., Howland, D., Ouyang, Y., and Bates, G. P. (2012). Genetic knock-down of HDAC3 does not modify disease-related phenotypes

- in a mouse model of Huntington's disease. *PLoS ONE* 7:e31080. doi: 10.1371/journal.pone.0031080
- Ng, C. W., Yildirim, F., Yap, Y. S., Dalin, S., Matthews, B. J., Velez, P. J., et al. (2013). Extensive changes in DNA methylation are associated with expression of mutant huntingtin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 2354–2359. doi: 10.1073/pnas.1221292110
- Nucifora, F. C. Jr., Sasaki, M., Peters, M. F., Huang, H., Cooper, J. K., Yamada, M., et al. (2001). Interference by huntingtin and atrophin-1 with cbp-mediated transcription leading to cellular toxicity. *Science* 291, 2423–2428. doi: 10.1126/science.1056784
- Ooi, L., and Wood, I. C. (2007). Chromatin crosstalk in development and disease: lessons from REST. *Nat. Rev. Genet.* 8, 544–554. doi: 10.1038/nrg2100
- Ortega-Martinez, S. (2015). A new perspective on the role of the CREB family of transcription factors in memory consolidation via adult hippocampal neurogenesis. *Front. Mol. Neurosci.* 8:46. doi: 10.3389/fnmol.2015.00046
- Pan, Y., Daito, T., Sasaki, Y., Chung, Y. H., Xing, X., Pondugula, S., et al. (2016). Inhibition of DNA methyltransferases blocks mutant huntingtin-induced neurotoxicity. *Sci. Rep.* 6:31022. doi: 10.1038/srep31022
- Parmentier, F., Lejeune, F. X., and Neri, C. (2013). Pathways to decoding the clinical potential of stress response FOXO-interaction networks for Huntington's disease: of gene prioritization and context dependence. *Front. Aging Neurosci.* 5:22. doi: 10.3389/fnagi.2013.00022
- Pastor, W. A., Aravind, L., and Rao, A. (2013). TETonic shift: biological roles of TET proteins in DNA demethylation and transcription. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14, 341–356. doi: 10.1038/nrm3589
- Peixoto, L., and Abel, T. (2013). The role of histone acetylation in memory formation and cognitive impairments. *Neuropsychopharmacology* 38, 62–76. doi: 10.1038/npp.2012.86
- Ravache, M., Weber, C., Merienne, K., and Trotter, Y. (2010). Transcriptional activation of REST by Sp1 in Huntington's disease models. *PLoS ONE* 5:e14311. doi: 10.1371/journal.pone.0014311
- Riccio, A. (2010). Dynamic epigenetic regulation in neurons: enzymes, stimuli and signaling pathways. *Nat. Neurosci.* 13, 1330–1337. doi: 10.1038/nn.2671
- Roos, R. A. (2010). Huntington's disease: a clinical review. *Orphanet J. Rare Dis.* 5:40. doi: 10.1186/1750-1172-5-40
- Rosas, H. D., Salat, D. H., Lee, S. Y., Zaleta, A. K., Pappu, V., Fischl, B., et al. (2008). Cerebral cortex and the clinical expression of Huntington's disease: complexity and heterogeneity. *Brain* 131, 1057–1068. doi: 10.1093/brain/awn025
- Roth, T. L., and Sweatt, J. D. (2011). Annual research review: epigenetic mechanisms and environmental shaping of the brain during sensitive periods of development. *J. Child Psychol. Psychiatry* 52, 398–408. doi: 10.1111/j.1469-7610.2010.02282.x
- Roze, E., Betuing, S., Deyts, C., Marcon, E., Brami-Cherrier, K., Pagès, C., et al. (2008). Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 deficiency is involved in expanded-huntingtin-induced transcriptional dysregulation and striatal death. *FASEB J.* 22, 1083–1093. doi: 10.1096/fj.07-9814
- Ryu, H., Lee, J., Hagerty, S. W., Soh, B. Y., McAlpin, S. E., Cormier, K. A., et al. (2006). ESET/SETDB1 gene expression and histone H3 (K9) trimethylation in Huntington's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 19176–19181. doi: 10.1073/pnas.0606373103
- Sadri-Vakili, G., Bouzou, B., Benn, C. L., Kim, M. O., Chawla, P., Overland, R. P., et al. (2007). Histones associated with downregulated genes are hypoacetylated in Huntington's disease models. *Hum. Mol. Genet.* 16, 1293–1306. doi: 10.1093/hmg/ddm078
- Saudou, F., and Humbert, S. (2016). The biology of huntingtin. *Neuron* 89, 910–926. doi: 10.1016/j.neuron.2016.02.003
- Seong, I. S., Woda, J. M., Song, J. J., Lloret, A., Abeyrathne, P. D., Woo, C. J., et al. (2010). Huntingtin facilitates polycomb repressive complex 2. *Hum. Mol. Genet.* 19, 573–583. doi: 10.1093/hmg/ddp524
- Seredenina, T., and Luthi-Carter, R. (2012). What have we learned from gene expression profiles in Huntington's disease? *Neurobiol. Dis.* 45, 83–98. doi: 10.1016/j.nbd.2011.07.001
- Sharma, S., and Taliyan, R. (2015a). Targeting histone deacetylases: a novel approach in Parkinson's disease. *Parkinsons Dis.* 2015:303294. doi: 10.1155/2015/303294
- Sharma, S., and Taliyan, R. (2015b). Transcriptional dysregulation in Huntington's disease: the role of histone deacetylases. *Pharmacol. Res.* 100, 157–169. doi: 10.1016/j.phrs.2015.08.002
- Sharma, S., Taliyan, R., and Singh, S. (2015). Beneficial effects of sodium butyrate in 6-OHDA induced neurotoxicity and behavioral abnormalities: Modulation of histone deacetylase activity. *Behav. Brain Res.* 291, 306–314. doi: 10.1016/j.bbr.2015.05.052
- Shin, J., Ming, G. L., and Song, H. (2014). Decoding neural transcriptomes and epigenomes via high-throughput sequencing. *Nat. Neurosci.* 17, 1463–1475. doi: 10.1038/nn.3814
- Song, C. X., Szulwach, K. E., Fu, Y., Dai, Q., Yi, C., Li, X., et al. (2011). Selective chemical labeling reveals the genome-wide distribution of 5-hydroxymethylcytosine. *Nat. Biotechnol.* 29, 68–72. doi: 10.1038/nbt.1732
- Steffan, J. S., Bodai, L., Pallos, J., Poelman, M., McCampbell, A., Apostol, B. L., et al. (2001). Histone deacetylase inhibitors arrest polyglutamine-dependent neurodegeneration in Drosophila. *Nature* 413, 739–743. doi: 10.1038/35099568
- Steffan, J. S., Kazantsev, A., Spasic-Boskovic, O., Greenwald, M., Zhu, Y. Z., Gohler, H., et al. (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. doi: 10.1073/pnas.100110097
- Sterner, D. E., and Berger, S. L. (2000). Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 435–459. doi: 10.1128/MMBR.64.2.435-459.2000
- Sultan, F. A., and Day, J. J. (2011). Epigenetic mechanisms in memory and synaptic function. *Epigenomics* 3, 157–181. doi: 10.2217/epi.11.6
- Sweatt, J. D. (2013). The emerging field of neuroepigenetics. *Neuron* 80, 624–632. doi: 10.1016/j.neuron.2013.10.023
- Sweatt, J. D. (2016). Neural plasticity & behavior—sixty years of conceptual advances. *J. Neurochem.* 139, 179–199. doi: 10.1111/jnc.13580
- Szulwach, K. E., Li, X., Li, Y., Song, C. X., Wu, H., Dai, Q., et al. (2011). 5-hmC-mediated epigenetic dynamics during postnatal neurodevelopment and aging. *Nat. Neurosci.* 14, 1607–1616. doi: 10.1038/nn.2959
- Thakurela, S., Sahu, S. K., Garding, A., and Tiwari, V. K. (2015). Dynamics and function of distal regulatory elements during neurogenesis and neuroplasticity. *Genome Res.* 25, 1309–1324. doi: 10.1101/gr.190926.115
- Thomas, B., Matson, S., Chopra, V., Sun, L., Sharma, S., Hersch, S., et al. (2013). A novel method for detecting 7-methyl guanine reveals aberrant methylation levels in Huntington disease. *Anal. Biochem.* 436, 112–120. doi: 10.1016/j.ab.2013.01.035
- Thomas, E. A., Coppola, G., Desplats, P. A., Tang, B., Soragni, E., Burnett, R., et al. (2008). The HDAC inhibitor 4b ameliorates the disease phenotype and transcriptional abnormalities in Huntington's disease transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 15564–15569. doi: 10.1073/pnas.0804249105
- Tie, F., Banerjee, R., Saiakhova, A. R., Howard, B., Monteith, K. E., Scacheri, P. C., et al. (2014). Trithorax monomethylates histone H3K4 and interacts directly with CBP to promote H3K27 acetylation and antagonize Polycomb silencing. *Development* 141, 1129–1139. doi: 10.1242/dev.102392
- Tsai, C. L., Li, H. P., Lu, Y. J., Hsueh, C., Liang, Y., Chen, C. L., et al. (2006). Activation of DNA methyltransferase 1 by EBV LMP1 involves c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase signaling. *Cancer Res.* 66, 11668–11676. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-2194
- Tsompana, M., and Buck, M. J. (2014). Chromatin accessibility: a window into the genome. *Epigenetics Chromatin* 7:33. doi: 10.1186/1756-8935-7-33
- Urduinguo, R. G., Sanchez-Mut, J. V., and Esteller, M. (2009). Epigenetic mechanisms in neurological diseases: genes, syndromes, and therapies. *Lancet Neurol.* 8, 1056–1072. doi: 10.1016/S1474-4422(09)70262-5
- Valor, L. M. (2015a). Epigenetic-based therapies in the preclinical and clinical treatment of Huntington's disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 67, 45–48. doi: 10.1016/j.biocel.2015.04.009
- Valor, L. M. (2015b). Transcription, epigenetics and ameliorative strategies in Huntington's Disease: a genome-wide perspective. *Mol. Neurobiol.* 51, 406–423. doi: 10.1007/s12035-014-8715-8
- Valor, L. M., and Guiretti, D. (2014). What's wrong with epigenetics in Huntington's disease? *Neuropharmacology* 80, 103–114. doi: 10.1016/j.neuropharm.2013.10.025
- Valor, L. M., Guiretti, D., Lopez-Atalaya, J. P., and Barco, A. (2013). Genomic landscape of transcriptional and epigenetic dysregulation in early onset polyglutamine disease. *J. Neurosci.* 33, 10471–10482. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0670-13.2013
- Vashishtha, M., Ng, C. W., Yildirim, F., Gipson, T. A., Kratter, I. H., Bodai, L., et al. (2013). Targeting H3K4 trimethylation in Huntington disease.

- Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, E3027–E3036. doi: 10.1073/pnas.1311323110
- von Schimmelmann M., Feinberg, P. A., Sullivan, J. M., Ku, S. M., Badimon, A., Duff, M. K., et al. (2016). Polycomb repressive complex 2 (PRC2) silences genes responsible for neurodegeneration. *Nat. Neurosci.* 19, 1321–1330. doi: 10.1038/nn.4360
- Wang, F., Fischhaber, P. L., Guo, C., and Tang, T. S. (2014). Epigenetic modifications as novel therapeutic targets for Huntington's disease. *Epigenomics* 6, 287–297. doi: 10.2217/epi.14.19
- Wang, F., Yang, Y., Lin, X., Wang, J. Q., Wu, Y. S., Xie, W., et al. (2013). Genome-wide loss of 5-hmC is a novel epigenetic feature of Huntington's disease. *Hum. Mol. Genet.* 22, 3641–3653. doi: 10.1093/hmg/ddt214
- Wang, X., and Jin, H. (2010). The epigenetic basis of the Warburg effect. *Epigenetics* 5, 566–568. doi: 10.4161/epi.5.7.12662
- West, A. E., and Greenberg, M. E. (2011). Neuronal activity-regulated gene transcription in synapse development and cognitive function. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3:a005744. doi: 10.1101/cshperspect.a005744
- Westerberg, G., Chiesa, J. A., Andersen, C. A., Diamanti, D., Magnoni, L., Pollio, G., et al. (2015). Safety, pharmacokinetics, pharmacogenomics and QT concentration-effect modelling of the SirT1 inhibitor selisistat in healthy volunteers. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 79, 477–491. doi: 10.1111/bcp.12513
- Xu, K., Dai, X. L., Huang, H. C., and Jiang, Z. F. (2011). Targeting HDACs: a promising therapy for Alzheimer's disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2011, 143269. doi: 10.1155/2011/143269
- Xu, Y. M., Du, J. Y., and Lau, A. T. (2014). Posttranslational modifications of human histone H3: an update. *Proteomics* 14, 2047–2060. doi: 10.1002/pmic.201300435
- Zeng, J., Libien, J., Shaik, F., Wolk, J., and Hernandez, A. I. (2016). Nucleolar PARP-1 expression is decreased in alzheimer's disease: consequences for epigenetic regulation of RDNA and cognition. *Neural Plast.* 2016:8987928. doi: 10.1155/2016/8987928
- Zovkic, I. B., Guzman-Karlsson, M. C., and Sweatt, J. D. (2013). Epigenetic regulation of memory formation and maintenance. *Learn. Mem.* 20, 61–74. doi: 10.1101/lm.026575.112
- Zuccato, C., Valenza, M., and Cattaneo, E. (2010). Molecular mechanisms and potential therapeutic targets in Huntington's disease. *Physiol. Rev.* 90, 905–981. doi: 10.1152/physrev.00041.2009
- Zucker, B., Luthi-Carter, R., Kama, J. A., Dunah, A. W., Stern, E. A., Fox, J. H., et al. (2005). Transcriptional dysregulation in striatal projection- and interneurons in a mouse model of Huntington's disease: neuronal selectivity and potential neuroprotective role of HAP1. *Hum. Mol. Genet.* 14, 179–189. doi: 10.1093/hmg/ddi014

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2017 Francelle, Lotz, Outeiro, Brouillet and Merienne. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



**Annexe 11 : Article collaboratif**

*« Altered enhancer transcription underlies Huntington's disease striatal transcriptional signature »*

*Le Gras S., Keime C., Anthony A., Lotz C., De Longprez L., Brouillet E., Cassel J-C.,  
Boutillier A-L., Merienne K.*



# SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

## Altered enhancer transcription underlies Huntington's disease striatal transcriptional signature

Stéphanie Le Gras<sup>1,\*</sup>, Céline Keime<sup>1,\*</sup>, Anne Anthony<sup>2,3,\*</sup>, Caroline Lotz<sup>2,3</sup>, Lucie De Longprez<sup>4,5</sup>, Emmanuel Brouillet<sup>4,5</sup>, Jean-Christophe Cassel<sup>2,3</sup>, Anne-Laurence Boutillier<sup>2,3</sup> & Karine Merienne<sup>2,3</sup>

Received: 02 August 2016

Accepted: 16 January 2017

Published: 22 February 2017

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

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

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

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

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



type-specific identity genes, and this event correlated with decreased expression of super-enhancer target genes<sup>2</sup>. This suggests that altered super-enhancer activity contributes to repression of neuronal genes in HD mouse striatum and to the establishment of HD “neuronal” transcriptional signature.

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

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

## Results

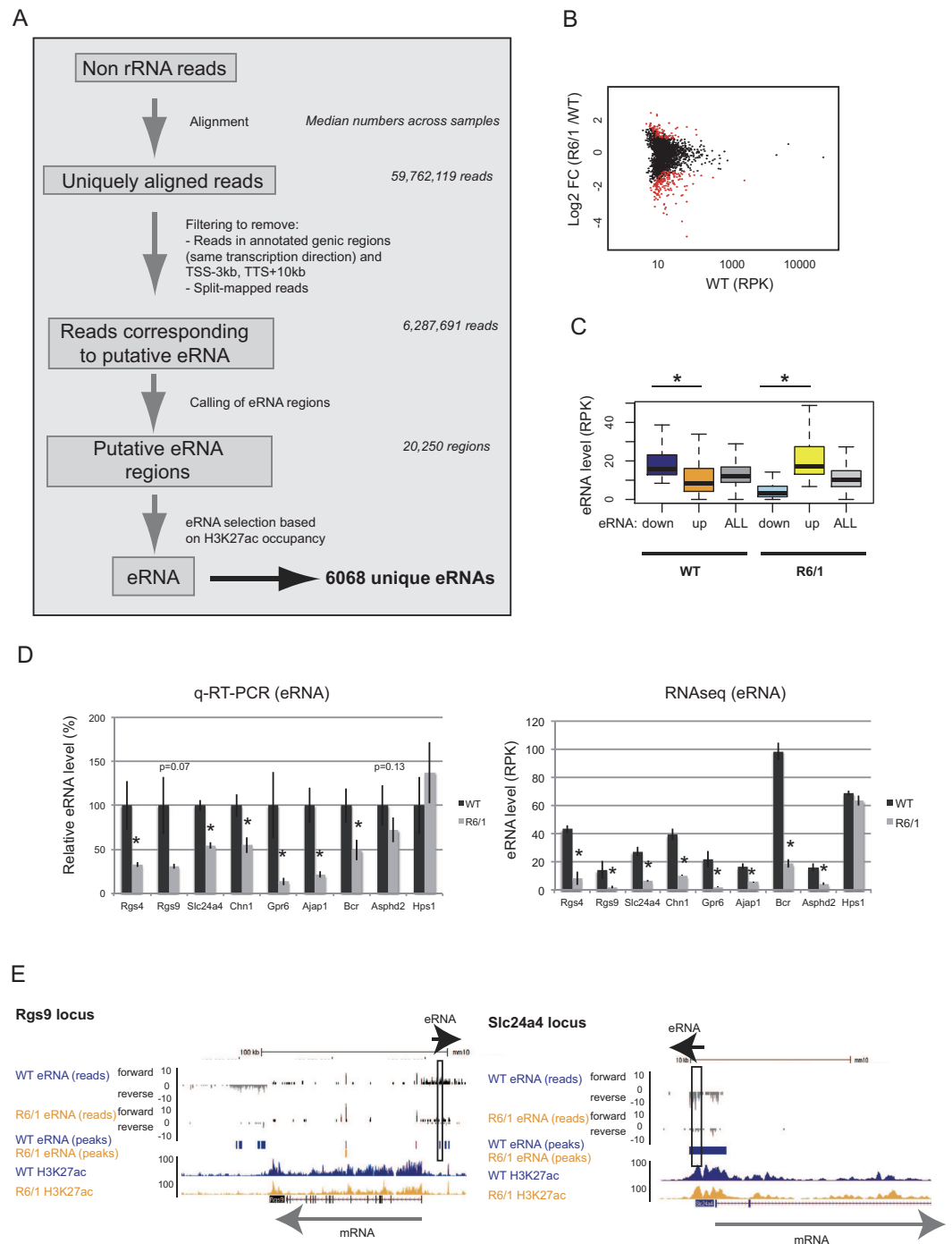
**Differential expression of eRNAs in the striatum of HD R6/1 mice.** To explore the hypothesis that alteration of eRNA transcription might be a component of HD pathogenesis, we assessed eRNAs at genome-wide scale, analyzing non-coding RNAs from RNA sequencing (RNAseq) data previously generated in the striatum of control and HD R6/1 transgenic mice<sup>2</sup>. A strand-specific total RNA sequencing protocol was used to generate sequencing reads, thereby allowing analysis of long non-coding RNAs (see Methods). To identify eRNAs, *i.e.* non-coding RNAs synthesized from enhancers, we first excluded signals within genic regions, defined as the interval starting 3 kb upstream of the transcription start site and ending 10 kb downstream of the transcription termination site, since they might result from polymerase read-through of genic transcripts (ref. 19 and Methods). Second, we filtered RNA signals resulting from enhancer regions using H3K27ac ChIP-seq data, generated from the striatum of control (WT) and HD R6/1 mice<sup>2</sup>. As a result, a total of 6068 eRNAs were selected based on H3K27ac occupancy (Fig. 1A). Analysis of differentially expressed eRNAs between R6/1 and WT striata was performed, as well as eRNA annotation, which provided gene-eRNA associations (see Methods). 677 and 335 eRNAs were found decreased and increased, respectively (Fig. 1B and Table S1). Noticeably, down-regulated eRNAs were globally expressed at higher levels than up-regulated eRNAs in WT mice (Fig. 1C). Decreased expression of selective eRNAs, including eRNAs in neighborhood of *Rgs4*, *Rgs9*, *Slc24a4*, *Chn1*, *Gpr6*, *Ajap1*, *Bcr* and *Asphd2* genes, was confirmed by q-RT-PCR (Fig. 1D,E and S1A). Expression of *Hps1*-associated eRNA, which was unchanged between R6/1 and WT, was used as a negative control (Fig. 1D,E and S1A). mRNAs transcribed from *Rgs4*, *Rgs9*, *Slc24a4*, *Chn1*, *Gpr6*, *Ajap1*, *Bcr* and *Asphd2* were also decreased, in contrast to *Hps1* mRNA (Fig. S1B), suggesting a link between eRNA and mRNA deregulation in R6/1 mouse striatum. To evaluate the degree of conservation of the mechanism, we analyzed another HD mouse model widely used in the field, the Q140 knockin model, expressing full-length mutant Htt. These mice display progressive transcriptional dysregulation, particularly in the striatum<sup>10</sup>. *Rgs4*, *Rgs9*, *Slc24a4*, *Chn1*, *Gpr6*, *Ajap1*, *Bcr* and *Asphd2* mRNAs were also decreased in the striatum of 12 month-old Q140 mice (ref. 10 and S1B). eRNAs associated with these genes were significantly decreased or showed a tendency to the decrease, except *Slc24a4*-associated eRNA (Fig. S1C), suggesting that eRNA dysregulation in HD striatum is a general mechanism.

### Target genes of decreased eRNAs in R6/1 striatum are enriched in neuronal function genes.

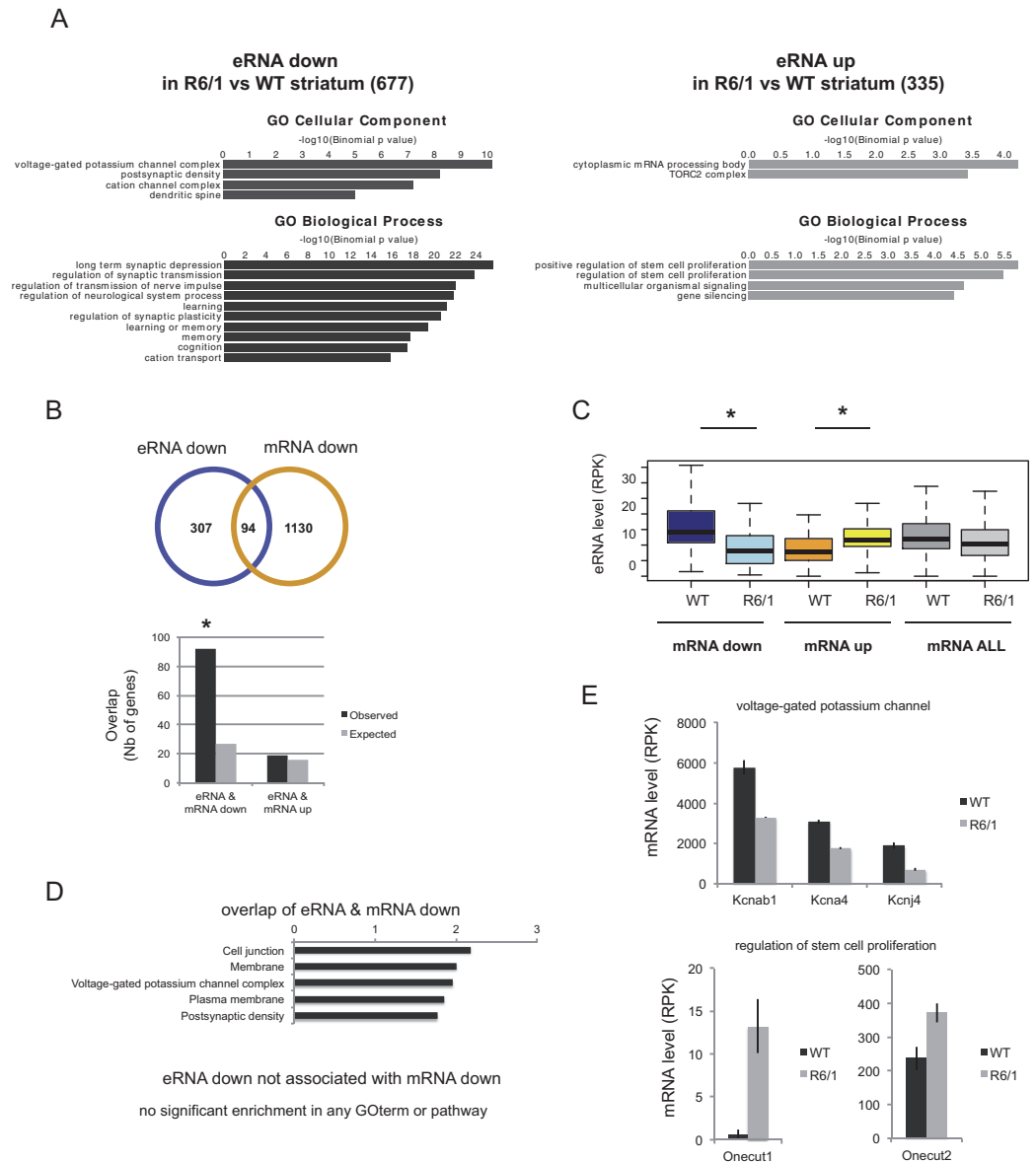
We investigated whether down-regulated eRNAs in R6/1 striatum were enriched in genes implicated in specific functions. Gene ontology analysis (GO) using GREAT<sup>22</sup> showed that enhancer regions involved in decreased eRNAs in R6/1 striatum were strongly associated with genes enriched in biological processes linked to neuronal activity, including neuronal transmission, synaptic plasticity and learning and memory (Fig. 2A). In contrast, regions involved in increased eRNAs were close to genes enriched in biological processes related to stem cell proliferation (Fig. 2A). Thus, down- and up-regulated eRNAs in R6/1 striatum associate with genes that display neuronal and developmental signatures, respectively.

### Target genes of decreased eRNAs in R6/1 striatum are enriched in down-regulated genes.

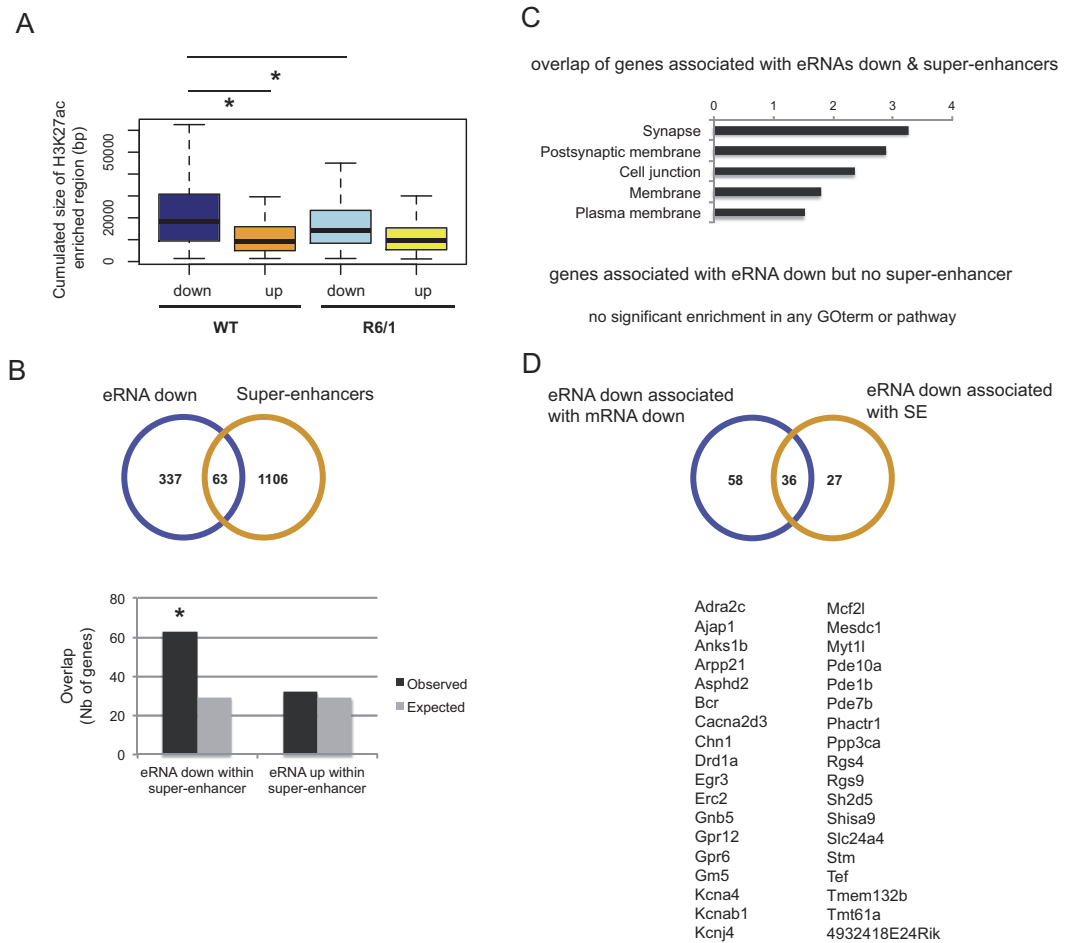
Down-regulated genes in R6/1 striatum also present a strong neuronal signature<sup>2</sup>. Since eRNAs positively regulate their target genes, this suggests that decreased eRNAs might modulate expression of genes down-regulated in R6/1 striatum. Integrated analysis showed that target genes of enhancers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



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



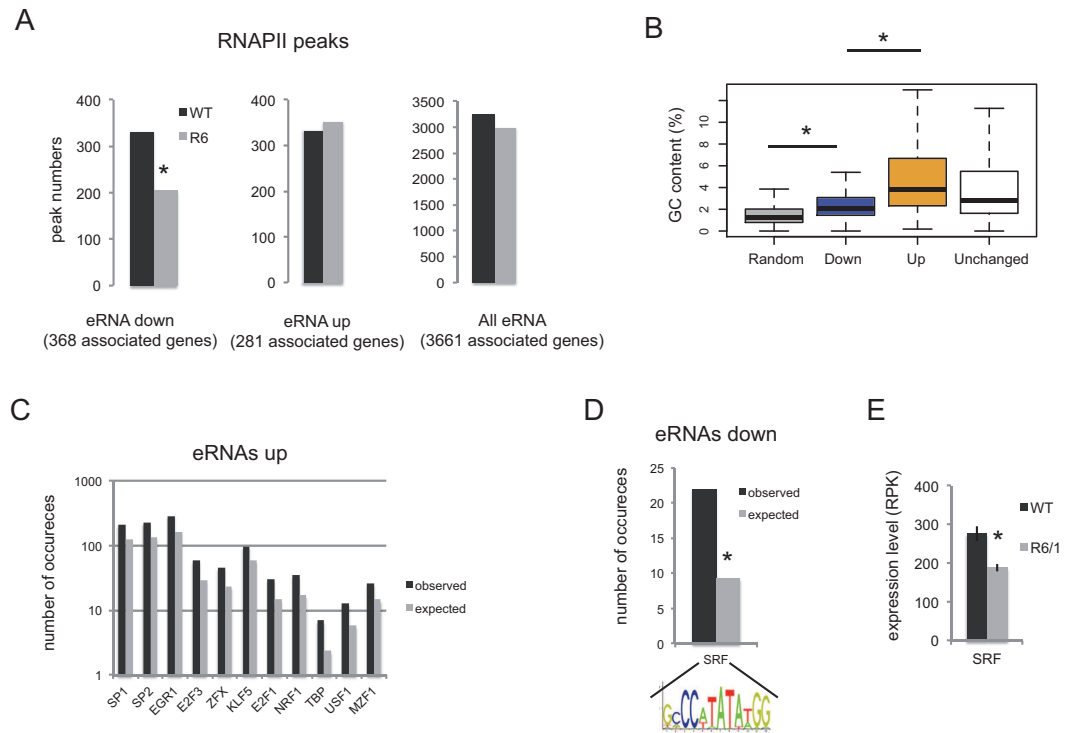
**Figure 2. Target genes of decreased eRNAs in R6/1 striatum are involved in neuronal activity and are enriched in down-regulated genes.** (A) Functional enrichment analysis of down- and up-regulated eRNAs in R6/1 vs WT striatum showing that down-regulated eRNAs (i.e. 677 down eRNAs) are strongly enriched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



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

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

**Altered transcribed enhancers in R6/1 striatum are enriched in super-enhancers.** Target genes of super-enhancers, a category of broad enhancers regulating cell type-specific identity genes, are preferentially down-regulated in R6/1 striatum<sup>2</sup>. We therefore hypothesized that decreased eRNAs in R6/1 striatum were transcribed from super-enhancers. Integrated analysis of eRNA and H3K27ac ChIP-seq data on R6/1 and WT striatum supported this hypothesis, since H3K27ac-enriched regions associated with decreased eRNAs were broader in comparison with those associated with increased eRNAs (Fig. 3A). Consistently, enhancers associated with down-regulated eRNAs in R6/1 striatum were enriched in super-enhancers, in contrast to up-regulated eRNAs (Fig. 3B). In addition, decreased eRNAs produced from super-enhancers displayed a strong neuronal signature, whereas those produced from typical enhancers did not present any specific functional signature (Fig. 3C). This shows that neuronal signature of down-regulated eRNAs is essentially contributed by transcribed super-enhancers. We also crossed the list of decreased eRNA-associated genes regulated by a super-enhancer with the list of decreased eRNA-associated genes down-regulated in R6/1 striatum. Both lists were largely overlapping (Fig. 3D), showing that most down-regulated target genes associating with reduced eRNAs in R6/1 vs WT striatum are under the control of a super-enhancer. Genes within the resulting sub-list (36 genes) contained striatal markers (e.g. *Drd1*, *Rgs9*), including striatal voltage-gated potassium channels (e.g. *Kcnj4/Kir2.3*, ref. 24) (Fig. 3D). Finally, the size of H3K27ac enriched regions at enhancers associated with decreased eRNAs in R6/1 striatum were reduced in R6/1 when compared to WT mice (Fig. 3A), suggesting a link between reduction of H3K27ac-enriched regions and eRNA transcription in R6/1 striatum. Together, these data indicate that altered super-enhancer transcription in HD mouse striatum contributes to down-regulation of striatal identity genes.



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

#### RNAPII binding sites are lost at enhancers associated with decreased eRNAs in R6/1 striatum.

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

#### Enhancers associated with deregulated eRNAs in R6/1 striatum are enriched in selective DNA motifs.

We then asked whether deregulated eRNAs in R6/1 striatum were enriched in binding sites for transcriptional regulators. Remarkably, transcribed enhancer sequences, whether they led to deregulated eRNAs or not, were enriched in GC content (Fig. 4B). This was particularly true for up-regulated eRNAs (Fig. 4B), which were also enriched in GC-rich DNA motifs (Fig. 4C and S1D). Within the list of DNA binding sites enriched in up-regulated eRNAs, none were recognized by transcriptional activators substantially up-regulated or transcriptional repressors down-regulated in the striatum of R6/1 mice<sup>2</sup>. However, *Klf5* and *Usf1* were slightly but significantly up-regulated in R6/1 striatum (adjusted p-value is 0.03 in both cases, ref. 2). *Usf1* acts as a chromatin insulator element, promoting gene activation through inhibition of polycomb complex activity<sup>26</sup>, whereas *Klf5* is a developmental transcription factor involved in maintenance of embryonic stem cells undifferentiated state<sup>27,28</sup>.

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

In contrast to increased eRNAs in R6/1 striatum, decreased eRNAs were exclusively enriched in a DNA motif recognized by SRF (Fig. 4D), a transcription factor that recruits RNAPII to transcription sites. Additionally, *Srf* expression, which is substantial in mouse striatum, is significantly decreased in HD mouse striatum (Fig. 4E). Since SRF is a key player of neuronal plasticity<sup>29</sup>, reduced *Srf* expression in HD striatum might contribute to decreased transcription at striatal enhancers, through impaired recruitment of RNAPII, which might in turn lead to down-regulation of striatal enhancer target genes.

## Discussion

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

Down-regulated genes in HD mouse striatum are preferentially regulated by super-enhancers<sup>2</sup>. As a result, they display a strong neuronal signature<sup>2,4,9,10</sup>. In this study, we showed that transcription at substantial numbers of super-enhancers was decreased in R6/1 striatum (Fig. 3). Target genes of super-enhancers showing decreased eRNAs were down-regulated in R6/1 striatum (Fig. 2). Since enhancer transcription is a marker of enhancer activity<sup>16</sup> and eRNAs positively regulate transcription of their target genes<sup>18</sup>, our results uncover that altered super-enhancer activity broadly contributes to down-regulation of markers of striatal identity in HD mice.

In contrast, increased (super-) enhancer activity had no broad impact on gene up-regulation in HD striatum, since up-regulated eRNAs in R6/1 striatum poorly overlapped with super-enhancers and their target genes were not enriched in up-regulated genes (Fig. 2B). However, our results showed that up-regulation of the developmental genes *Onecut1* and *Onecut2*, expressed in neural stem cells<sup>23</sup>, correlated with augmented transcription of associated eRNAs (Fig. 2E). This suggests that selected increased eRNAs contribute to striatal neuron dedifferentiation. Thus, increased and decreased transcription at enhancers might both participate to loss of differentiated state of striatal neurons in response to the HD mutation, through re-activation of genes expressed in immature neurons and repression of genes defining striatal neuron identity, respectively.

Using a cellular model of inflammation, Hah *et al.* reported extensive transcription within super-enhancers<sup>19</sup>. They also showed that super-enhancer transcription was required for the regulation of target genes involved in innate immunity. Our results showed that neuronal super-enhancer transcription was also extensive, which suggests that super-enhancer transcription is a general mechanism critical to the regulation of genes that determine cell type-specific identity and function.

We analyzed eRNA transcription in basal conditions – as opposed to stimulus-induced conditions – and found that many eRNAs (6068) were transcribed from mouse striatal enhancers. This result is consistent with previous study, which identified 8990 and 7779 eRNAs in mouse cortex and cerebellum, respectively<sup>30</sup>. Thus, many enhancers are constitutively active in a mouse brain tissue and our results indicate that repression of neuronal genes in HD striatum predominantly results from altered activity of constitutively active enhancers.

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

The transcription factor FOS was enriched at neuronal stimulus-responsive enhancers<sup>17</sup>. However, it is not likely to be the case for constitutively active enhancers, since basal expression of *Fos* is low in neurons. Remarkably, enhancers that associated with reduced eRNA transcription in HD mouse striatum were enriched in a DNA motif recognized by another transcription factor, SRF (Fig. 4D). SRF is a key regulator of synaptic plasticity and this function of SRF includes mechanisms that modulate constitutively expressed genes<sup>31</sup>. Particularly, basal gene expression changes resulting from inactivation of the *Srf* gene in the adult forebrain accounted for altered synaptic plasticity, specifically long term depression (LTD)<sup>31</sup>. Noticeably, it has been reported that synaptic plasticity, including LTD, is impaired in HD mice<sup>32</sup>. Moreover, *Srf* transcription is reduced in R6/1 striatum (Fig. 4E). Whether altered SRF regulation in HD mouse striatum affects constitutively active enhancers, including super-enhancers, thereby contributing to altered expression of synaptic plasticity genes, is an intriguing hypothesis. This possibility would be consistent with functional enrichment analysis showing that down-regulated eRNAs in R6/1 striatum were enriched in GO terms such as “regulation of synaptic plasticity”, “long term depression” (LTD) and “learning” (Fig. 2A).

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

preferential vulnerability of striatal medium spiny neurons in HD<sup>24</sup>. Our data showing that altered transcribed enhancers in HD mouse striatum display a voltage-gated potassium channel signature might indicate that eRNA dysregulation underlies increased striatal vulnerability in HD.

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

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

## Materials and Methods

**Animals.** Hemizygous R6/1 ( $\approx 150$  CAGs)<sup>37</sup> and Q140 knockin mice from the Jackson Laboratory were maintained on mixed CBAxC57BL/6 and C57BL/6 genetic backgrounds, respectively. The experimental protocol followed the European directive (Directive 2010/63/UE) and received French governmental authorizations. Mice were housed in a temperature-controlled room maintained on a 12 hours light/dark cycle. Food and water were available ad libitum. All animal studies were conducted according to the French regulation (EU Directive 2010/63/EU – French Act Rural Code R 214-87 to 131). The animal facility was approved by veterinarian inspectors: authorizations n° E67-482-13 for Laboratory of Cognitive and Adaptive Neurosciences (i.e. LNCA) and n° A 92-032-02 for Commissariat à l’Energie Atomique (i.e. CEA) and complies with Standards for Humane Care and Use of Laboratory Animals of the Office of Laboratory Animal Welfare (OLAW). All procedures received approval from French Ministry of Higher Education and Research (authorizations n° 2015042011568820v3/APAFIS#504 for R6/1 line/LNCA and n° 2015060417243726v1/APAFIS#770 for Q140 line/CEA). People involved in animal care, killing and tissue preparation have official expertise. R6/1 and Q140 mice were killed at 30 weeks and 12 months, respectively, and their striata were rapidly dissected, snap frozen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . The methods regarding animal use were carried out in accordance with the relevant guidelines and regulations.

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

**ChIP-seq.** ChIP-seq data was previously generated<sup>2</sup>: ChIP-seq reads were aligned to the mouse reference genome (GRCm38/mm10) using Bowtie v0.12.8 using the following parameters -m 1 -strata -best. Only uniquely aligned reads have been retained for further analyses. Peak calling was performed using either MACS v1.4.2 or SICER v1.1<sup>38</sup>. MACS was used to detect peaks into RNAPII data using default parameters except for -g mm. SICER was used to detect islands into H3K27ac data using the script SICER.sh with the following parameters: Species: mm10, Threshold for redundancy allowed for chip reads: 1, Threshold for redundancy allowed for control reads: 1, Window size: 200 bps, Effective genome size as a fraction of the reference genome of mm10: 0.77, Gap size: 600 bps, Evaluate for identification of candidate islands that exhibit clustering: 1000, False discovery rate controlling significance:  $10^{-2}$ . Fragment size was set according to the value assessed by Homer v4.7.2 makeTagDirectory. Peaks/Islands were annotated using Homer v4.7.2 with annotations extracted from Ensembl v78.

**RNAseq.** RNA-seq data was previously generated<sup>2</sup>: RNAseq reads were aligned onto mouse rRNA sequences using bowtie<sup>39</sup> release 0.12.7. Reads that do not map to rRNA sequences were mapped onto the mouse reference genome (GRCm38/mm10) using Tophat2 release 2.0.10<sup>40</sup>. Only uniquely aligned reads have been retained for further analyses.

Gene expression was quantified using HTSeq<sup>41</sup> release 0.5.4p3 and gene annotations from Ensembl release 78. Read counts were normalized across libraries with the method proposed by Anders *et al.*<sup>42</sup>. Comparison between R6/1 and WT samples was performed using the method proposed by Love *et al.*<sup>43</sup>, implemented in the DESeq2 Bioconductor library (release 1.0.19). Adjustment for multiple testing was performed using a method previously described<sup>44</sup>.

**eRNA identification.** In order to identify reads from putative eRNA, we removed split-mapped reads and reads that overlap ( $\geq 1$  bp on the opposite strand) genes annotated by Ensembl (release 78) as: IG\_C\_gene, IGD\_gene, IG\_J\_gene, IG\_LV\_gene, IG\_V\_pseudogene, Mt\_rRNA, Mt\_tRNA, polymorphic\_pseudogene, protein\_coding, pseudogene, rRNA, TR\_V\_gene and TR\_V\_pseudogene. We extended the region corresponding to those genes to 3 kb upstream of the transcription start site and 10 kb downstream of the transcript end site, in order to minimize signal from polymerase read-through from genic transcripts (as previously described ref. 19). IntersectBed from BEDTools release 2.21.0 was used for this purpose<sup>45</sup>. This overlap was performed on the

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

On those filtered RNAseq reads, we then detected the location of putative eRNA as genomic regions enriched in RNAseq reads. We thus used a method used for CHIP-seq peak detection: we used MACS v1.4.2<sup>46</sup> with the following parameters `-keep-dup = all -nomodel -nolambda -p 1e-4 -g mm`. The parameter `-shiftsize` was set according to the value assessed by Homer v4.7.2<sup>47</sup> `makeTagDirectory`.

**Motif analysis.** Motifs searching of known motifs (Jaspar 2014 motif database) was made using FIMO<sup>48</sup> within sequences of up and down eRNA. FIMO results were then processed by a custom Perl script that computed the number of occurrence of each motif. To assess the enrichment of motifs within the regions of interest, the same analysis was done *n* times (*n* = 100) on randomly selected eRNA regions. We chose to use randomly selected eRNA regions as controls to compute an expected distribution of motif occurrence and to correct for the nucleotide composition bias that could occur specifically in eRNA sequences. Region size distribution of the randomly selected eRNA was the same as for the up and down eRNA of interest. The significance of the motif occurrence was estimated through the computation of a Z-score.

The Z-score was computed this way:

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

where:

– *x* is the observed value (number of motif occurrence)

–  $\mu$  is the mean of the number of occurrences (computed on randomly selected data)

–  $\sigma$  is the standard deviation of the number of occurrences of motifs (computed on randomly selected data)

From the Z-scores, P values for each motif were computed. The P values were corrected for multi-testing using a method previously described<sup>44</sup>. Statistical analysis was done with custom R scripts.

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

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

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

## References

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



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

## Acknowledgements

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

## Author Contributions

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

### Additional Information

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

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

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

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



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

© The Author(s) 2017



# BIBLIOGRAPHIE

---



## -A-

- Abada YSK, Nguyen HP, Ellenbroek B, Schreiber R (2013) Reversal learning and associative memory impairments in a BACHD rat model for huntington disease. *PLoS One* 8.
- Abd-elrahman KS, Hamilton A, Hutchinson SR, Liu F, Russell RC, Ferguson SSG (2017) mGluR5 antagonism increases autophagy and prevents disease progression in the zQ175 mouse model of Huntington's disease. *Sci Signal* 10:1–12.
- Achour M, Gras S Le, Keime C, Parmentier F, Lejeune FX, Boutillier AL, Néri C, Davidson I, Merienne K (2015) Neuronal identity genes regulated by super-enhancers are preferentially down-regulated in the striatum of Huntington's disease mice. *Hum Mol Genet* 24:3481–3496.
- Agustín-pavón C, Mielcarek M, Garriga-canut M, Isalan M (2016) Deimmunization for gene therapy : host matching of synthetic zinc finger constructs enables long-term mutant Huntingtin repression in mice. *Mol Neurodegener* 11:1–16.
- Aidt F, Nielsen S, Kanters J, Pesta D, Nørremølle A, Hasholt L, Christiansen M, Hagen CM (2013) Dysfunctional mitochondrial respiration in the striatum of the Huntington's disease transgenic R6/2 mouse model. *PLoS Curr Huntingt Dis*:1–16.
- Alarcon JM, Malleret G, Touzani K, Vronskaya S, Ishii S, Kandel ER, Barco A (2004) Chromatin Acetylation , Memory , and LTP Are Impaired in CBP+/- Mice : A Model for the Cognitive Deficit in Rubinstein-Taybi Syndrome and Its Amelioration. *Neuron* 42:947–959.
- Albin RL, Dure LS, Penney JB, Young AB, Reiner A, Anderson KD, Handelin B, Balfour R, Whetsell WO, Penney JB, Young AB (1992) Preferential loss of striato-external pallidal projection neurons in presymptomatic Huntington's disease. *Ann Neurol* 31:425–430.
- Alexander G (1986) Parallel Organization of Functionally Segregated Circuits Linking Basal Ganglia and Cortex. *Annu Rev Neurosci* 9:357–381.
- Alexander GE, Crutcher MD (1990) Functional architectures of basal ganglia circuits. *Trends Neurosci* 13:266–271.
- Allis CD, Jenuwein T (2016) The molecular hallmarks of epigenetic control. *Nat Rev Genet* 17:487–500 Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nrg.2016.59>.
- Altar CA, Cai N, Bliven T, Juhasz M, Conner JM, Acheson AL, Lindsay RM, Wiegand SJ (1997) Anterograde transport of brain-derived neurotrophic factor and its role in the brain. *Nature* 389:856–860.
- An MC, O'Brien RN, Zhang N, Patra BN, De La Cruz M, Ray A, Ellerby LM (2014) Polyglutamine Disease Modeling: Epitope Based Screen for Homologous Recombination using CRISPR/Cas9 System. *PLoS Curr* 15.
- An MC, Zhang N, Scott G, Montoro D, Wittkop T, Mooney S, Melov S, Ellerby LM (2012) Genetic Correction of Huntington's Disease Phenotypes in Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell* 11:253–263.
- Anders P, Pyl P, Huber W (2015) HTSeq-a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* 31:166–169.
- André VM, Fisher YE, Levine MS (2011) Altered Balance of Activity in the Striatal Direct and Indirect Pathways in Mouse Models of Huntington's Disease. *Front Syst Neurosci* 5:1–11.
- Andrew SE, Goldberg YP, Kremer B, Telenius H, Theilmann J, Adam S, Starr E, Squitieri F, Lin B, Kalchman MA, Graham RK, Hayden MR (1993) The relationship between trinucleotide (CAG) repeat length and clinical features of Huntington's disease. *Nat Genet* 4:398–403.
- Andrews SC, Dominguez JF, Mercieca EC, Georgiou-Karistianis N, Stout JC (2015) Cognitive interventions to enhance neural compensation in Huntington's disease. *Neurodegener Dis Manag* 5.
- Aoyama T, Okamoto T, Fukiage K, Otsuka S, Furu M, Ito K, Jin Y, Ueda M, Nagayama S, Nakayama T, Nakamura T, Toguchida J (2010) Histone modifiers, YY1 and p300, regulate the expression of cartilage-specific gene,

chondromodulin-I, in mesenchymal stem cells. *J Biol Chem* 285:29842–29850.

- Arner E et al. (2015) Transcribed enhancers lead waves of coordinated transcription in transitioning mammalian cells. *Science* (80- ) 347:1010–1014.
- Arrasate M, Mitra S, Schweitzer ES, Segal MR, Finkbeiner S (2004) Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death. *Nature* 431:805–810.
- Arteaga-bracho EE, Gulinello M, Winchester ML, Pichamoorthy N, Petronglo JR, Zambrano AD, Inocencio J, Jesus CD De, Louie JO, Gokhan S, Mehler MF, Molero AE (2016) Postnatal and adult consequences of loss of huntingtin during development: Implications for Huntington's disease. *Neurobiol Dis* 96:144–155.
- Ashburner M, Ball C, Blake J, Botstein D, Butler H, Cherry J, Davies A, Dolinski K, Dwight S, Eppig J, et al (2000) Gene ontology : tool for the unification of biology. *Nat Genet* 25:25–29.
- Atadja P (2009) Development of the pan-DAC inhibitor panobinostat (LBH589): Successes and challenges. *Cancer Lett* 280:233–241 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2009.02.019>.
- Atwal RS, Xia J, Pinchev D, Taylor J, Epand RM, Truant R (2007) Huntingtin has a membrane association signal that can modulate huntingtin aggregation, nuclear entry and toxicity. *Hum Mol Genet* 16:2600–2615.
- Aubry L, Bugi A, Lefort N, Rousseau F, Peschanski M, Perrier AL (2008) Striatal progenitors derived from human ES cells mature into DARPP32 neurons in vitro and in quinolinic acid-lesioned rats. *PNAS* 105:16707–16712.
- Aylward E, Mills J, Liu D, Nopoulos P, Ross CA, Pierson R, Paulsen JS (2011) Association between Age and Striatal Volume Stratified by CAG Repeat Length in Prodromal Huntington Disease. *PLoS Curr* 3.

## -B-

- Bachoud-Lévi AC (2009) Neural grafts in Huntington's disease : viability after 10 years. *Lancet Neurol* 8:979–981.
- Bachoud-Lévi AC, Perrier AL (2014) Regenerative medicine in Huntington's disease : Current status on fetal grafts and prospects for the use of pluripotent stem cell. *Rev Neurol (Paris)* 170:749–762.
- Bachoud Lévi AC, Gaura V, Brugières P, Lefaucheur J, Boissé M, Maison P, Baudic S, Ribeiro M, Bourdet C, Remy P, Cesaro P, Hantraye P, Peschanski M (2006) Effect of fetal neural transplants in patients with Huntington's disease 6 years after surgery : a long-term follow-up study. *Lancet Neurol* 5:303–309.
- Bai G, Cheung I, Shulha HP, Coelho JE, Li P, Dong X, Jakovcevski M, Wang Y, Grigorenko A, Jiang Y, Hoss A, Patel K, Zheng M, Rogaev E, Myers RH, Weng Z, Akbarian S, Chen JF (2015) Epigenetic dysregulation of hairy and enhancer of split 4 (HES4) is associated with striatal degeneration in postmortem Huntington brains. *Hum Mol Genet* 24:1441–1456.
- Balasubramanyam K, Swaminathan V, Ranganathan A, Kundu TK (2003) Small molecule modulators of histone acetyltransferase p300. *J Biol Chem* 278:19134–19140.
- Balleine BW, O'Doherty JP (2010) Human and rodent homologies in action control: Corticostriatal determinants of goal-directed and habitual action. *Neuropsychopharmacology* 35:48–69.
- Bañez-Coronel M, Ayhan F, Tarabochia AD, Zu T, Perez BA, Tusi SK, Pletnikova O, Borchelt DR, Ross CA, Margolis RL, Yachnis AT, Troncoso JC, Ranum LPW (2015) RAN translation in Huntington Disease. *Neuron* 88:667–677.
- Bañez-Coronel M, Porta S, Kagerbauer B, Mateu-Huertas E, Pantano L, Ferrer I, Guzmán M, Estivill X, Martí E (2012) A pathogenic mechanism in huntington's disease involves small CAG-repeated RNAs with neurotoxic activity. *PLoS Genet* 8:1–15.
- Bannister AJ, Kouzarides T (2011) Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res* 21:381–395 Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/cr.2011.22>.

- Baquet ZC, Gorski JA, Jones KR (2004) Early Striatal Dendrite Deficits followed by Neuron Loss with Advanced Age in the Absence of Anterograde Cortical Brain-Derived Neurotrophic Factor. *J Neurosci* 24:4250–4258.
- Barnat M, Friec J Le, Benstaali C, Humbert S (2017) Huntingtin-Mediated Multipolar-Bipolar Transition of Newborn Cortical Neurons Is Critical for Their Postnatal Neuronal Morphology. *Neuron* 93:99–114.
- Barrett RM, Malvaez M, Kramar E, Matheos DP, Arrizon A, Cabrera SM, Lynch G, Greene RW, Wood MA (2011) Hippocampal Focal Knockout of CBP Affects Specific Histone Modifications, Long-Term Potentiation, and Long-Term Memory. *Neuropsychopharmacology* 36:1545–1556.
- Barry J, Akopian G, Cepeda C, Levine MS (2018) Striatal Direct and Indirect Pathway Output Structures Are Differentially Altered in Mouse Models of Huntington's Disease. *J Neurosci* 38:4678–4694.
- Bashir H, Jankovic J (2018) Treatment options for chorea. *Expert Rev Neurother* 18:51–63.
- Bates EA, Victor M, Jones AK, Shi Y, Hart AC (2006) Differential Contributions of *Caenorhabditis elegans* Histone Deacetylases to Huntingtin Polyglutamine Toxicity. *J Neurosci* 26:2830–2838.
- Bates GP, Dorsey R, Gusella JF, Hayden MR, Kay C, Leavitt BR, Nance M, Ross C a., Scahill RI, Wetzel R, Wild EJ, Tabrizi SJ (2015) Huntington disease. *Nat Rev Dis Prim* 1:1–21.
- Bayram-weston Z, Jones L, Dunnett SB, Brooks SP (2012) Light and electron microscopic characterization of the evolution of cellular pathology in the R6/1 Huntington's disease transgenic mice. *Brain Res Bull* 88:104–112.
- Beal MF (1992) Does Impairment of Energy Metabolism Result in Excitotoxic Neuronal Death in Neurodegenerative Illnesses? *Neurol Prog* 31:119–130.
- Beal MF, Brouillet E, Jenkins B, Henshaw R, Rosen B, Hyman BT (1993) Age-Dependent Striatal Excitotoxic Lesions Produced by the Endogenous Mitochondrial Inhibitor Malonate. *J Neurochem* 61:1147–1150.
- Beal MF, Kowall NW, Ellison DW, Mazurek MF, Swartz KJ, Martin JB (1986) Replication of the neurochemical characteristics of Huntington's disease by quinolinic acid. *Nature* 321:5–8.
- Benchoua A, Trioulier Y, Zala D, Gaillard M, Lefort N, Dufour N, Saudou F, Elalouf J, Hirsch E, Hantraye P, Déglon N, Brouillet E (2006) Involvement of Mitochondrial Complex II Defects in Neuronal Death Produced by N-Terminus Fragment of Mutated Huntingtin. *Mol Biol Cell* 17:1652–1663.
- Benito E, Urbanke H, Ramachandran B, Barth J, Halder R, Awasthi A, Jain G, Capece V, Burkhardt S, Navarro-Sala M, Nagarajan S, Schötz AL, Johnsen SA, Bonn S, Löhrmann R, Dean C, Fischer A (2015) HDAC inhibitor-dependent transcriptome and memory reinstatement in cognitive decline models. *J Clin Invest* 125:3572–3584.
- Björkhem I, Meaney S, Fogelman AM (2004) Brain Cholesterol: Long Secret Life behind a Barrier. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:806–815.
- Bolivar VJ, Manley K, Messer A (2004) Early exploratory behavior abnormalities in R6/1 Huntington's disease transgenic mice. *Brain Res* 1005:29–35.
- Bonvento G, Valette J, Flament J, Mochel F, Brouillet E (2017) Imaging and spectroscopic approaches to probe brain energy metabolism dysregulation in neurodegenerative diseases. *J Cereb Blood Flow Metab* 37:1927–1943.
- Bousiges O, Neidl R, Majchrzak M, Muller MA, Barbelivien A, Pereira de Vasconcelos A, Schneider A, Loeffler JP, Cassel JC, Boutillier AL (2013) Detection of Histone Acetylation Levels in the Dorsal Hippocampus Reveals Early Tagging on Specific Residues of H2B and H4 Histones in Response to Learning. *PLoS One* 8:1–8.
- Bousiges O, Pereira de Vasconcelos A, Neidl R, Cosquer B, Herbeaux K, Panteleeva I, Loeffler J, Cassel J, Boutillier A (2010) Spatial Memory Consolidation is Associated with Induction of Several Lysine-Acetyltransferase (Histone Acetyltransferase) Expression Levels and H2B / H4 Acetylation-Dependent Transcriptional Events in the Rat Hippocampus. *Neuropsychopharmacology* 35:2521–2537 Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/npp.2010.117>.



- Boussicault L, Alves S, Lamazière A, Planques A, Heck N, Moumné L, Despres G, Bolte S, Hu A, Pagès C, Galvan L, Piguet F, Aubourg P, Cartier N, Caboche J, Betuing S (2016) CYP46A1, the rate-limiting enzyme for cholesterol degradation, is neuroprotective in Huntington's disease. *Brain* 139:953–970.
- Boussicault L, Kacher R, Lamazière A, Vanhoutte P, Caboche J, Betuing S, Potier MC (2018) CYP46A1 protects against NMDA-mediated excitotoxicity in Huntington's disease: Analysis of lipid raft content. *Biochimie* 153:70–79.
- Boutell JM, Thomas P, Neal JW, Weston VJ, Duce J, Harper PS, Jones AL (1999) Aberrant interactions of transcriptional repressor proteins with the Huntington's disease gene product, huntingtin. *Hum Mol Genet* 8:1647–1655.
- Boutillier A-LL, Trinh E, Loeffler JP (2003) Selective E2F-dependent gene transcription is controlled by histone deacetylase activity during neuronal apoptosis. *J Neurochem* 84:814–828.
- Brennan WA, Bird ED, Aprille JR (1985) Regional Mitochondrial Respiratory Activity in Huntington's Disease Brain. *J Neurochem* 44:1948–1950.
- Bridi MS, Hawk JD, Chatterjee S, Safe S, Abel T (2017) Pharmacological Activators of the NR4A Nuclear Receptors Enhance LTP in a CREB / CBP-Dependent Manner. *Neuropsychopharmacology* 42:1243–1253 Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/npp.2016.253>.
- Brimblecombe KR, Cragg SJ (2017) The Striosome and Matrix Compartments of the Striatum: A Path through the Labyrinth from Neurochemistry toward Function. *ACS Chem Neurosci* 8:235–242.
- Broadbent NJ, Squire LR, Clark RE (2007) Rats depend on habit memory for discrimination learning and retention. *Learn Mem* 14:145–151.
- Brooks SP, Dunnett SB (2009) Tests to assess motor phenotype in mice: A user's guide. *Nat Rev Neurosci* 10:519–529 Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nrn2652>.
- Brooks SP, Janghra N, Workman VL, Bayram-Weston Z, Jones L, Dunnett SB (2012) Longitudinal analysis of the behavioural phenotype in R6/1 (C57BL/6J) Huntington's disease transgenic mice. *Brain Res Bull* 88:94–103 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainresbull.2011.01.010>.
- Brouillet E, Jenkins BG, Hyman BT, Ferrante RJ, Kowall NW, Srivastava R, Roy DS, Rosen BR, Beal MF (1993) Age-Dependent Vulnerability of the Striatum to the Mitochondria1 Toxin 3-Nitropropionic Acid. *J Neurochem* 60:356–359.
- Browne SE, Bowling AC, Macgarvey U, Baik MJ, Berger SC, Muqit MMK, Bird ED, Beal MF (1997) Oxidative Damage and Metabolic Dysfunction in Huntington's Disease : Selective Vulnerability of the Basal Ganglia. *Metab Defects HD* 41:646–653.
- Brustovetsky N (2016) Mutant Huntingtin and Elusive Defects in Oxidative Metabolism and Mitochondrial Calcium Handling. *Mol Neurobiol* 53:2944–2953.
- Burton AC, Nakamura K, Roesch MR (2015) From ventral-medial to dorsal-lateral striatum: Neural correlates of reward-guided decision-making. *Neurobiol Learn Mem* 0:51–59.
- Butterworth J, Yates CM, Reynolds GP (1985) Distribution of Phosphate-Activated Glutaminase , Succinic Dehydrogenase , Pyruvate Dehydrogenase and Glutamyl Transpeptidase in Post-mortem Brain from Huntington's Disease and Agonal Cases. *J Neurol Sci* 67:161–171.

-C-

- Cai L, Sutter BM, Li B, Tu BP (2011) Acetyl-CoA Induces Cell Growth and Proliferation by Promoting the Acetylation of Histones at Growth Genes. *Mol Cell* 42:426–437.

- Campbell RR, Wood MA (2019) How the epigenome integrates information and reshapes the synapse. *Nat Rev Neurosci* 20:133–147.
- Canals JM, Pineda JR, Torres-Paraza JF, Bosch M, Martin-Ibanez R, Munoz MT, Mengod G, Ernfors P, Alberch J (2004) Brain-Derived Neurotrophic Factor Regulates the Onset and Severity of Motor Dysfunction Associated with Enkephalinergic Neuronal Degeneration in Huntington's Disease. *J Neurosci* 24:7727–7739.
- Cao C, Temel Y, Blokland A, Ozen H, Steinbusch HWM, Vlamings R, Nguyen HP, von Hörsten S, Schmitz C, Visser-Vandewalle V (2006) Progressive deterioration of reaction time performance and choreiform symptoms in a new Huntington's disease transgenic rat model. *Behav Brain Res* 170:257–261.
- Carnemolla A, Fossale E, Agostoni E, Michelazzi S, Calligaris R, De Maso L, Del Sal G, MacDonald ME, Persichetti F (2009) Rrs1 is involved in endoplasmic reticulum stress response in Huntington disease. *J Biol Chem* 284:18167–18173.
- Caron NS, Dorsey ER, Hayden MR (2018) Therapeutic approaches to Huntington disease : from the bench to the clinic. *Nat Rev* 17:729–750.
- Carri AD, Onorati M, Lelos MJ, Castiglioni V, Faedo A, Menon R, Camnasio S, Vuono R, Spaiardi P, Talpo F, Toselli M, Martino G, Barker RA, Dunnett SB, Biella G, Cattaneo E (2013) Developmentally coordinated extrinsic signals drive human pluripotent stem cell differentiation toward authentic DARPP-32 + medium-sized spiny neurons. *Dev Stem cells* 140:301–312.
- Carter RJ, Lione LA, Humby T, Mangiarini L, Mahal A, Bates GP, Dunnett SB, Morton AJ (1999) Characterization of Progressive Motor Deficits in Mice Transgenic for the Human Huntington's Disease Mutation. *J Neurosci* 19:3248–3257.
- Cassel R, Kelche C, Lecourtier L, Cassel JC (2012) The match/mismatch of visuo-spatial cues between acquisition and retrieval contexts influences the expression of response vs. place memory in rats. *Behav Brain Res* 230:333–342 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2012.02.021>.
- Castañé A, Theobald DEH, Robbins TW (2010) Selective lesions of the dorsomedial striatum impair serial spatial reversal learning in rats. *Behav Brain Res* 210:74–83.
- Castro DC, Bruchas MR (2019) A Motivational and Neuropeptidergic Hub: Anatomical and Functional Diversity within the Nucleus Accumbens Shell. *Neuron* 102:529–552 Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.03.003>.
- Cayzac S, Delcasso S, Paz V, Jeantet Y, Cho YH (2011) Changes in striatal procedural memory coding correlate with learning deficits in a mouse model of Huntington disease. *Proc Natl Acad Sci* 108:9280–9285.
- Chang DTW, Rintoul GL, Pandipati S, Reynolds IJ (2006) Mutant huntingtin aggregates impair mitochondrial movement and trafficking in cortical neurons. *Neurobiol Dis* 22:388–400.
- Chang R, Liu X, Li S, Li X-J (2015) Transgenic animal models for study of the pathogenesis of Huntington's disease and therapy. *Drug Des Devel Ther*:2179–2188.
- Chatterjee S et al. (2018) Reinstating plasticity and memory in a tauopathy mouse model with an acetyltransferase activator. *EMBO Mol Med* 10:1–20.
- Chatterjee S, Mizar P, Cassel R, Neidl R, Selvi BR, Mohankrishna D V., Vedamurthy BM, Schneider A, Bousiges O, Mathis C, Cassel J-C, Eswaramoorthy M, Kundu TK, Boutillier A-L (2013) A Novel Activator of CBP/p300 Acetyltransferases Promotes Neurogenesis and Extends Memory Duration in Adult Mice. *J Neurosci* 33:10698–10712.
- Chen G, Zou X, Watanabe H, Deursen JM Van, Shen J (2010) CREB Binding Protein Is Required for Both Short-Term and Long-Term Memory Formation. *J Neurosci* 30:13066–13077.
- Chen JY, Wang E, Galvan L, Huynh M, Joshi P, Cepeda C, Levine M (2013) Effects of the Pimelic Diphenylamide Histone Deacetylase Inhibitor HDACi 4b on the R6/2 and N171-82Q Mouse Models of Huntington's Disease. *PLoS Curr Huntingt Dis*:1–39.

- Cheng L, Zhang S, MacLennan G, Williamson S, Davidson D, Wang M, Jones T, Lopez-Beltran A, Montironi R (2013a) Laser-assisted microdissection in translational research: theory, technical considerations, and future applications. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 21:31–47.
- Cheng PH, Li CL, Chang YF, Tsai SJ, Lai YY, Chan AWS, Chen CM, Yang SH (2013b) MiR-196a ameliorates phenotypes of huntington disease in cell, transgenic mouse, and induced pluripotent stem cell models. *Am J Hum Genet* 93:306–312.
- Cheng Y, Peng Q, Hou Z, Aggarwal M, Zhang J, Mori S, Ross CA, Duan W (2011) Structural MRI detects progressive regional brain atrophy and neuroprotective effects in N171-82Q Huntington's disease mouse model. *Neuroimage* 56:1027–1034.
- Chiu C, Liu G, Leeds P, Chuang D (2011) Combined Treatment with the Mood Stabilizers Lithium and Valproate Produces Multiple Beneficial Effects in Transgenic Mouse Models of Huntington's Disease. *Neuropsychopharmacology* 36:2406–2421.
- Cho KJ, Lee BI, Cheon SY, Kim HW, Kim HJ, Kim GW (2009) Inhibition of apoptosis signal-regulating kinase 1 reduces endoplasmic reticulum stress and nuclear huntingtin fragments in a mouse model of Huntington disease. *Neuroscience* 163:1128–1134 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.07.048>.
- Chopra V, Fox JH, Lieberman G, Dorsey K, Matson W, Waldmeier P, Housman DE, Kazantsev A, Young AB, Hersch S (2007) A small-molecule therapeutic lead for Huntington's disease: Preclinical pharmacology and efficacy of C2-8 in the R6/2 transgenic mouse. *Proc Natl Acad Sci* 104:16685–16689.
- Chopra V, Quinti L, Khanna P, Paganetti P, Kuhn R, Young AB, Kazantsev AG, Hersch S (2016) LBH589 , A Hydroxamic Acid-Derived HDAC Inhibitor, is Neuroprotective in Mouse Models of Huntington's Disease. *J Huntingtons Dis* 5:347–355.
- Chrétien B, Bourguine J, Sénécal LH, Bretaudeau-deguigne M, Boels D, Lelong-Boulouard V, Le Boisselier R (2018) Treatment of Behavioral Disinhibition in Huntington's Disease With Valproic Acid. *J Clin Psychopharmacol* 38:96–98.
- Ciamei A, Jennifer Morton A (2009) Progressive imbalance in the interaction between spatial and procedural memory systems in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. *Neurobiol Learn Mem* 92:417–428.
- Colin E, Zala D, Liot G, Rangone H, Borrell-Pagès M, Li XJ, Saudou F, Humbert S (2008) Huntingtin phosphorylation acts as a molecular switch for anterograde/retrograde transport in neurons. *EMBO J* 27:2124–2134.
- Cong SY, Pepers BA, Evert BO, Rubinsztein DC, Roos RACC, Van Ommen GJB, Dorsman JC (2005) Mutant huntingtin represses CBP , but not p300 , by binding and protein degradation. *Mol Cell Neurosci* 30:12–23.
- Coppedè F (2014) The potential of epigenetic therapies in neurodegenerative diseases. *Front Genet* 5:1–8.
- Corbit LH, Muir JL, Balleine BW (2001) The role of the nucleus accumbens in instrumental conditioning: Evidence of a functional dissociation between accumbens core and shell. *J Neurosci* 21:3251–3260.
- Coyle JT, Schwarcz R (1976) Lesion of striatal neurones with kainic acid provides a model for Huntington's chorea. *Nature* 263:244–246.
- Crittenden JR, Tillberg PW, Riad MH, Shima Y, Gerfen CR, Curry J, Housman DE, Nelson SB, Boyden ES, Graybiel AM (2016) Striosome–dendron bouquets highlight a unique striatonigral circuit targeting dopamine-containing neurons. *Proc Natl Acad Sci* 113:11318–11323.
- Cubo E, Shannon KM, Tracy D, Jaglin JA, Bernard BA, Wu J, Leurgans SE (2006) Effect of donepezil on motor and cognitive function in Huntington's disease. *Neurology* 67:1268–1271.
- Cui L, Jeong H, Borovecki F, Parkhurst CN, Tanese N, Krainc D (2006) Transcriptional Repression of PGC-1  $\alpha$  by Mutant Huntingtin Leads to Mitochondrial Dysfunction and Neurodegeneration. *Cell* 127:59–69.
- Cummings DM, Alaghband Y, Hickey MA, Joshi PR, Hong SC, Zhu C, Ando TK, André VM, Cepeda C, Watson JB, Levine MS (2012) A critical window of CAG repeat-length correlates with phenotype severity in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. *J Neurophysiol* 107:677–691.

-D-

- Dal Piaz F, Tosco A, Eletto D, Piccinelli AL, Moltedo O, Franceschelli S, Sbardella G, Remondelli P, Rastrelli L, Vesci L, Pisano C, De Tommasi N (2010) The Identification of a Novel Natural Activator of p300 Histone Acetyltransferase Provides New Insights into the Modulation Mechanism of this Enzyme. *ChemoBioChem* 11:818–827.
- Dalton GL, Phillips AG, Floresco SB (2014) Preferential involvement by nucleus accumbens shell in mediating probabilistic learning and reversal shifts. *J Neurosci* 34:4618–4626.
- Damiano M, Diguët E, Malgorn C, Aurelio MD, Galvan L, Petit F, Benhaim L, Guillemier M, Houitte D, Dufour N, Hantraye P, Canals JM, Alberch J, Delzescaux T, Deglon N, Beal MF, Brouillet E (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.
- Damiano M, Galvan L, Déglon N, Brouillet E (2010) Mitochondria in Huntington's disease. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* 1802:52–61 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2009.07.012>.
- Davies S w, Turmaine M, Cozens BA, DiFiglia M, Sharp AH, Ross CA, Scherzinger E, Wanker EE, Mangiarini L, Bates GP (1997) Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. *Cell* 90:537–548.
- Daw ND, O'Doherty JP, Dayan P, Seymour B, Dolan RJ (2006) Cortical substrates for exploratory decisions in humans. *Nature* 441:876–879.
- De Souza RAG, Islam SA, McEwen LM, Mathelier A, Hill A, Mah SM, Wasserman WW, Kobor MS, Leavitt BR (2016) DNA methylation profiling in human Huntington's disease brain. *Hum Mol Genet* 25:2013–2030.
- Deaton AM, Bird A (2011) CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev* 25:1010–1022.
- Del Toro D, Xifró X, Pol A, Humbert S, Saudou F, Canals JM, Alberch J (2010) Altered cholesterol homeostasis contributes to enhanced excitotoxicity in Huntington's disease. *J Neurochem* 115:153–167.
- Deng Y-P, Wong T, Wan JY, Reiner A (2014) Differential loss of thalamostriatal and corticostriatal input to striatal projection neuron types prior to overt motor symptoms in the Q140 knock-in mouse model of Huntington's disease. *Front Syst Neurosci* 8:1–15.
- Deng YP, Albin RL, Penney JB, Young AB, Anderson KD, Reiner A (2004) Differential loss of striatal projection systems in Huntington's disease: A quantitative immunohistochemical study. *J Chem Neuroanat* 27:143–164.
- Desplats PA, Kass KE, Gilmartin T, Stanwood GD, Woodward EL, Head SR, Sutcliffe JG, Thomas EA (2006) Selective deficits in the expression of striatal-enriched mRNAs in Huntington's disease. *J Neurochem* 96:743–757.
- Devan BD, Hong NS, McDonald RJ (2011) Parallel associative processing in the dorsal striatum: Segregation of stimulus-response and cognitive control subregions. *Neurobiol Learn Mem* 96:95–120.
- Di Pardo A, Maglione V, Alpaugh M, Horkey M, Atwal RS, Sassone J, Ciammola A, Steffan JS, Fouad K, Truant R, Sipione S (2012) Ganglioside GM1 induces phosphorylation of mutant huntingtin and restores normal motor behavior in Huntington disease mice. *PNAS* 109:3528–3533.
- Dickey AS et al. (2016) PPAR $\delta$  repression in Huntington's disease and its essential role in CNS translate into a potent agonist therapy. *Nat Med* 22:37–45.
- Dickinson A (1994) Instrumental conditioning (Mackintosh NJ, ed)., 2nd ed.
- Dickinson A, Balleine B, Watt A, Gonzalez F, Boakes RA (1995) Motivational control after extended instrumental training. *Anim Learn Behav* 23:197–206.
- Dietschy JM, Turley SD (2004) Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal. *J Lipid Res* 45:1375–1397.

- Dietz KC, Casaccia P (2010) HDAC inhibitors and neurodegeneration: at the edge between protection and damage. *Pharmacol Res* 62:11–17.
- Difiglia M, Sapp E, Chase KO, Davies SW, Bates GP, Vonsattel JP, Aronin N (1997) Aggregation of Huntingtin in Neuronal Intranuclear Inclusions and Dystrophic Neurites in Brain. *Science* (80- ) 277:1990–1993.
- Ding WX, Yin XM (2008) Sorting, recognition and activation of the misfolded protein degradation pathways through macroautophagy and the proteasome. *Autophagy* 4:141–150.
- Djousse L et al. (2003) Interaction of normal and expanded CAG repeat sizes influences age at onset of Huntington disease. *Am J Med Genet* 119 A:279–282.
- Dompierre JP, Godin JD, Charrin BC, Cordelieres FP, King SJ, Humbert S, Saudou F (2007) Histone Deacetylase 6 Inhibition Compensates for the Transport Deficit in Huntington's Disease by Increasing Tubulin Acetylation. *J Neurosci* 27:3571–3583.
- Dougherty JD (2017) The expanding toolkit of translating ribosome affinity purification. *J Neurosci* 37:12079–12087.
- Dragatsis I, Goldowitz D, Del Mar N, Deng YP, Meade CA, Liu L, Sun Z, Dietrich P, Yue J, Reiner A (2009) CAG repeat lengths >335 attenuate the phenotype in the R6/2 Huntington's disease transgenic mouse. *Neurobiol Dis* 33:315–330.
- Dragatsis I, Levine MS, Zeitlin S (2000) Inactivation of Hdh in the brain and testis results in progressive neurodegeneration and sterility in mice. *Nat Genet* 26:300–306.
- Duennwald ML, Lindquist S (2008) Impaired ERAD and ER stress are early and specific events in polyglutamine toxicity. *Genes Dev* 22:3308–3319.
- Duke CG, Kennedy AJ, Gavin CF, Day JJ, Sweatt JD (2017) Experience-dependent epigenomic reorganization in the hippocampus. *Learn Mem* 24:278–288.
- Duyao M et al. (1993) Trinucleotide repeat length instability and age of onset in Huntington's disease. *Nat Genet* 4:387–392.
- Duyao MP, Ryan A, Persichetti F, Barnes GT, McNeil SM, Gusella JF, MacDonald ME, Auerbach AB, Joyner AL, Ge P, Vonsattel J-P, Gusella JF, Joyner AL, MacDonald ME (1995) Inactivation of the mouse huntington's disease gene homolog Hdh. *Science* (80- ) 269:407–410.

## -E-

- Eckschlager T, Plch J, Stiborova M, Hrabeta J (2017) Histone Deacetylase Inhibitors as Anticancer Drugs. *Int J Mol Sci* 18:1–25.
- El-Daher M-T, Hangen E, Bruyere J, Poizat G, Al-Ramahi I, Pardo R, Bourg N, Souquere S, Mayet C, Pierron G, Leveque-Fort S, Botas J, Humbert S, Saudou F (2015) Huntingtin proteolysis releases non-polyQ fragments that cause toxicity through dynamin 1 dysregulation. *EMBO J* 34:2255–2271.
- Ennaceur A, Delacour J (1988) A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav Brain Res* 31:47–59.
- Estrada-sánchez AM, Rebec G V (2013) Role of cerebral cortex in the neuropathology of Huntington's disease. *Front Neural Circuits* 7:1–9.
- Estrada-Sánchez AM, Rebec G V (2012) Corticostriatal dysfunction and glutamate transporter 1 (GLT1) in Huntington's disease: interactions between neurons and astrocytes. *Basal Ganglia* 2:57–66.
- Evers MM, Pepers BA, Deutekom JCT Van, Mulders SAM, Den JT, Aartsma-rus A, Ommen GB Van, Roon-mom WMC Van (2011) Targeting Several CAG Expansion Diseases by a Single Antisense Oligonucleotide. *PLoS One* 6:1–11.

-F-

- Faideau M, Kim J, Cormier K, Gilmore R, Welch M, Auregan G, Dufour N, Guillemier M, Brouillet E, Hantraye P, Déglon N, Ferrante RJ, Bonvento G (2010) In vivo expression of polyglutamine-expanded huntingtin by mouse striatal astrocytes impairs glutamate transport: A correlation with Huntington's disease subjects. *Hum Mol Genet* 19:3053–3067.
- Farrar AM, Murphy CA, Paterson NE, Oakeshott S, He D, Alosio W, McConnell K, Menalled LB, Ramboz S, Park LC, Howland D, Brunner D (2014) Cognitive Deficits in Transgenic and Knock-in HTT Mice Parallel those in Huntington's Disease. *J Huntingtons Dis* 3:145–158.
- Feng J et al. (2015) Role of Tet1 and 5-hydroxymethylcytosine in cocaine action. *Nat Neurosci* 18:536–544.
- Ferbinteanu J (2016) Contributions of hippocampus and striatum to memory-guided behavior depend on past experience. *J Neurosci* 36:6459–6470.
- Fernandez-Albert J, Lipinski M, Lopez-Cascales MT, Rowley MJ, Martin-Gonzalez AM, del Blanco B, Corces VG, Barco A (2019) Immediate and deferred epigenomic signatures of in vivo neuronal activation in mouse hippocampus. *Nat Neurosci* 22:1718–1730.
- Ferrante RJ, Kowall NW, Beal MF, Richardson EP, Bird ED, Martin JB (1985) Selective sparing of a class of striatal neurons in Huntington's disease. *Science* (80- ) 230:561–563.
- Ferrante RJ, Kowall NW, Cipolloni PB, Storey E, Beal MF (1993) Excitotoxin Lesions in Primates as a Model for Huntington's Disease : Histopathologic and Neurochemical Characterization. *Exp Neurol* 119:46–71.
- Ferrante RJ, Kubilus JK, Lee J, Ryu H, Beesen A, Zucker B, Smith K, Kowall NW, Ratan RR, Luthi-carter R, Hersch SM (2003) Histone Deacetylase Inhibition by Sodium Butyrate Chemotherapy Ameliorates the Neurodegenerative Phenotype in Huntington's Disease Mice. *J Neurosci* 23:9418–9427.
- Fischer A (2014) Targeting histone-modifications in Alzheimer's disease. What is the evidence that this is a promising therapeutic avenue? *Neuropharmacology* 80:95–102.
- Flavell SW, Greenberg ME (2008) Signaling Mechanisms Linking NEuronal Activity to Gene Expression and Plasticity of the Nervous System. *Annu Rev Neurosci* 31:563–590.
- Floresco SB (2007) Dopaminergic regulation of limbic-striatal interplay. *J Psychiatry Neurosci* 32:400–411.
- Floresco SB (2015) The Nucleus Accumbens: An Interface Between Cognition, Emotion, and Action. *Annu Rev Psychol* 66:25–52.
- Francelle L, Galvan L, Brouillet E (2014) Possible involvement of self-defense mechanisms in the preferential vulnerability of the striatum in Huntington's disease. *Front Cell Neurosci* 8:1–13.
- Francelle L, Lotz C, Outeiro T, Brouillet E, Merienne K (2017) Contribution of Neuroepigenetics to Huntington's Disease. *Front Hum Neurosci* 11:1–15.
- Frank PG, Cheung MWC, Pavlides S, Llaverias G, Park DS, Lisanti MP (2006) Caveolin-1 and regulation of cellular cholesterol homeostasis. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol* 291:H677–H686.
- Fukui H, Moraes CT (2007) Extended polyglutamine repeats trigger a feedback loop involving the mitochondrial complex III , the proteasome and huntingtin aggregates. *Hum Mol Genet* 16:783–797.
- Futter M, Diekmann H, Schoenmakers E, Sadiq O, Chatterjee K, Rubinsztein DC (2009) Wild-type but not mutant huntingtin modulates the transcriptional activity of liver X receptors. *J Med Genet* 46:438–446.

- Galvan L et al. (2018) The striatal kinase DCLK3 produces neuroprotection against mutant huntingtin. *Brain* 141:1434–1454.
- Ganai SA, Banday S, Farooq Z, Altaf M (2016) Modulating epigenetic HAT activity for reinstating acetylation homeostasis: A promising therapeutic strategy for neurological disorders. *Pharmacol Ther* 166:106–122.
- Gao X, Lin SH, Ren F, Li JT, Chen JJ, Yao CB, Yang H Bin, Jiang SX, Yan GQ, Wang D, Wang Y, Liu Y, Cai Z, Xu YY, Chen J, Yu W, Yang PY, Lei QY (2016) Acetate functions as an epigenetic metabolite to promote lipid synthesis under hypoxia. *Nat Commun*:1–14.
- Gardian G, Browne SE, Choi D, Klivenyi P, Gregorio J, Kubilus JK, Ryu H, Langley B, Ratan RR, Ferrante RJ, Beal MF (2005) Neuroprotective Effects of Phenylbutyrate in the N171-82Q Transgenic Mouse Model of Huntington's Disease. *J Biol Chem* 280:556–563.
- Garnock-Jones KP (2015) Panobinostat : First Global Approval. *Drugs* 75:695–704.
- Garriga-canut M, Agustín-pavón C, Herrmann F, Sánchez A, Dierssen M, Fillat C, Isalan M (2012) Synthetic zinc finger repressors reduce mutant huntingtin expression in the brain of R6/2 mice. *PNAS* 109:3136–3145.
- Gauthier LR, Charrin C, Dompierre JP, Borrell-page M, Cordelie FP, Mey J De, Macdonald ME, Leßmann V, Humbert S, Saudou F (2004) Huntingtin Controls Neurotrophic Support and Survival of Neurons by Enhancing BDNF Vesicular Transport along Microtubules. *Cell* 118:127–138.
- Geater C, Hernandez S, Thompson L, Mattis VB (2018) Cellular Models: HD Patient-Derived Pluripotent Stem Cells.
- GeMHD (2015) Identification of Genetic Factors that Modify Clinical Onset of Huntington's Disease. *Cell* 162:516–526.
- Gerfen CR (1992) The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization. *Trends Neurosci* 15:133–139.
- Gerfen CR, Baimbridge KG, Thibault J (1987) The neostriatal mosaic: III. Biochemical and developmental dissociation of patch-matrix mesostriatal systems. *J Neurosci* 7:3935–3944.
- Ghosh R, Tabrizi SJ (2018) Clinical Features of Huntington's Disease. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*.
- Giralt A, Puigdemívol M, Carretón O, Paoletti P, Valero J, Parra-damas A, Saura CA, Alberch J, Ginés S, Puigdemívol M, Carretón O, Paoletti P, Valero J, Parra-damas A, Saura CA, Alberch J, Gines S (2012) Long-term memory deficits in Huntington's disease are associated with reduced CBP histone acetylase activity. *Hum Mol Genet* 21:1203–1216.
- Gläscher J, Hampton AN, O'Doherty JP (2009) Determining a role for ventromedial prefrontal cortex in encoding action-based value signals during reward-related decision making. *Cereb Cortex* 19:483–495.
- Godin JD, Poizat G, Hickey MA, Maschat F, Humbert S (2010) Mutant huntingtin-impaired degradation of  $\beta$ -catenin causes neurotoxicity in Huntington's disease. *EMBO J* 29:2433–2445 Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2010.117>.
- Gonitel R, Moffitt H, Sathasivam K, Woodman B, Detloff PJ, Faull RLM, Bates GP (2008) DNA instability in postmitotic neurons. *PNAS* 105:3467–3472.
- Gonzalez V, Cif L, Biolsi B, Garcia-Ptacek S, Seychelles A, Sanrey E, Descours I, Coubes C, Ribeiro de Moura AM, Corlobe A, James S, Roujeau T, Coubes P (2014) Deep brain stimulation for Huntington's disease: long-term results of a prospective open-label study. *J Neurosurg* 121:114–122.

- Goodliffe JW, Song H, Rubakovic A, Chang W, Medalla M, Weaver CM, Luebke JI (2018) Differential changes to D1 and D2 medium spiny neurons in the 12-month-old Q175+/- mouse model of Huntington's Disease. *PLoS One* 13:1–28 Available at: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0200626>.
- Goold R, Flower M, Moss DH, Medway C, Wood-Kaczmar A, Andre R, Farshim P, Bates GP, Holmans P, Jones L, Tabrizi SJ (2019) FAN1 modifies Huntington's disease progression by stabilizing the expanded HTT CAG repeat. *Hum Mol Genet* 28:650–661.
- Goritz C, Mauch DH, Pfrieder FW (2005) Multiple mechanisms mediate cholesterol-induced synaptogenesis in a CNS neuron. *Mol Cell Neurosci* 29:190–201.
- Goula A, Berquist BR, Wilson DM, Wheeler VC, Trottier Y, Merienne K (2009) Stoichiometry of Base Excision Repair Proteins Correlates with Increased Somatic CAG Instability in Striatum over Cerebellum in Huntington's Disease Transgenic Mice. *PLoS Genet* 5:1–15.
- Goula A, Merienne K (2013) Abnormal Base Excision Repair at Trinucleotide Repeats Associated with Diseases: A Tissue-Selective Mechanism. *Genes (Basel)* 4:375–387.
- Grahn JA, Parkinson JA, Owen AM (2008) The cognitive functions of the caudate nucleus. *Prog Neurobiol* 86:141–155 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18824075>.
- Gray M, Shirasaki DI, Cepeda C, Andre VM, Wilburn B, Lu WH, Tao J, Yamazaki I, Li SH, Sun YE, Li XJ, Levine MS, Yang XW (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.
- Graybiel AM, Aosaki T, Flaherty AW, Kimura M (1994) The basal ganglia and adaptive motor control. *Science* (80- ) 265:1826–1831.
- Graybiel AM, Ragsdale CW (1978) Histochemically distinct compartments in the striatum of human, monkey, and cat demonstrated by acetylthiocholinesterase staining. *Proc Natl Acad Sci USA* 75:5723–5726.
- Green DR, Reed JC (1998) Mitochondria and Apoptosis. *Science* (80- ) 281:1309–1313.
- Groenewegen HJ, Wright CI, Beijer AVJ, Voorn P (1999) Convergence and segregation of ventral striatal inputs and outputs. *Ann N Y Acad Sci* 877:49–63.
- Gruart A, Delgado-García JM (2007) Activity-dependent changes of the hippocampal CA3-CA1 synapse during the acquisition of associative learning in conscious mice. *Genes, Brain Behav* 6:24–31.
- Gu M, Gash M, Mann VM, Javoy-Agid F, Cooper JM, Schapira H V (1996) Mitochondrial Defect in Huntington's Disease Caudate Nucleus. *Ann Neurol* 39:385–389.
- Guidetti P, Charles V, Chen E, Reddy PH, Kordower JH, Whetsell WO, Schwarcz R, Tagle DA (2001) Early Degenerative Changes in Transgenic Mice Expressing Mutant Huntingtin Involve Dendritic Abnormalities but No Impairment of Mitochondrial Energy Production. *Exp Neurol* 169:340–350.
- Guo JU, Su Y, Zhong C, Ming G, Song H (2008) Hydroxylation of 5-methylcytosine by TET1 promotes active DNA demethylation in the adult brain. *Cell* 145:423–434.
- Gusella JF, Macdonald ME, Lee JM (2014) Genetic modifiers of Huntington's disease. *Mov Disord* 29:1359–1365.
- Gusella JF, McNeil S, Persichetti F, Srinidhi J, Novelletto A, Bird E, Faber P, Vonsattel JP, Myers RH, MacDonald ME (1996) Huntington's disease. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 6:615–626.
- Gusella JF, Wexler NS, Conneally PM, Naylor SL, Anderson MA, Tanzi RE, Watkins PC, Ottina K, Wallace MR, Sakaguchi AY, Young AB, Shoulson I, Bonilla E, Martin JB (1983) A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. *Nature* 306:234–238.
- Gut P, Verdin E (2013) The nexus of chromatin regulation and intermediary metabolism. *Nature* 502:489–498.
- Gutekunst C-A, Li S-H, Yi H, Mulroy JS, Kuemmerle S, Jones R, Rye D, Ferrante RJ, Hersch SM, Li X-J (1999) Nuclear and Neuropil Aggregates in Huntington's Disease: Relationship to Neuropathology. *J Neurosci* 19:2522–2534.



- Haber SN, Fudge JL, McFarland NR (2000) Striatonigrostriatal pathways in primates form an ascending spiral from the shell to the dorsolateral striatum. *J Neurosci* 20:2369–2382.
- Halder R et al. (2016) DNA methylation changes in plasticity genes accompany the formation and maintenance of memory. *Nat Neurosci* 19:102–110.
- Halestrap AP (2006) Calcium, mitochondria and reperfusion injury : a pore way to die. *Biochem Soc Trans* 34:232–237.
- Hansson O, Guatteo E, Mercuri NB, Bernardi G, Li X-J, Castilho RF, Brundin P (2001) Resistance to NMDA toxicity correlates with appearance of nuclear inclusions, behavioural deficits and changes in calcium homeostasis in mice transgenic for exon 1 of the huntington gene. *Eur J Neurosci* 14:1492–1504.
- Hardingham G, Fukunaga Y, Bading H (2002) Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nat Neurosci* 5:405–415.
- Harrison DJ, Busse M, Openshaw R, Rosser AE, Dunnett SB, Brooks SP (2013) Exercise attenuates neuropathology and has greater benefit on cognitive than motor deficits in the R6/1 Huntington’s disease mouse model. *Exp Neurol* 248:457–469.
- Heath CJ, O’Callaghan C, Mason SL, Phillips BU, Saksida LM, Robbins TW, Barker RA, Bussey TJ, Sahakian BJ (2019) A Touchscreen Motivation Assessment Evaluated in Huntington’s Disease Patients and R6/1 Model Mice. *Front Neurol* 10:1–11.
- Hedreen JC, Folstein SE (1995) Early loss of neostriatal striosome neurons in Huntington’s disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 54:105–120.
- Heinz S, Benner C, Spann N, Bertolino E, Lin Y, Laslo P, Cheng J, Murre C, Singh H, Glass CK (2010) Simple combinations of lineage-determining transcription factors prime cis-regulatory elements required for macrophage and B cell identities. *Mol Cell* 38:576–589 Available at: <http://genesdev.cshlp.org/cgi/doi/10.1101/gad.2037511%5Cnhttp://www.nature.com/doi/10.1038/75556%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20147307%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2844991%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.g>
- Heng MY, Detloff PJ, Paulson HL, Albin RL (2010) Early alterations of autophagy in Huntington disease-like mice. *Autophagy* 6:1206–1208.
- Hernandez IH, Torres-Peraea J, Santos-Galindo M, Ramos-Moron E, Fernandez-Fernandez MR, Perez-Alvarez MJ, Miranda-Vizuet A, Lucas JJ (2017) The neuroprotective transcription factor ATF5 is decreased and sequestered into polyglutamine inclusions in Huntington’s disease. *Acta Neuropathol* 134:839–850.
- Hersch S, Claassen D, Edmondson M, Wild E, Guercioli R, Panzara M (2017) Multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled phase 1b/2a studies of WVE-120101 and WVE-120102 in patients with Huntington’s disease. *Neurology* 88.
- Hervás-Corpión I, Guiretti D, Alcaraz-Iborra M, Olivares R, Campos-Caro A, Barco Á, Valor LM (2018) Early alteration of epigenetic-related transcription in Huntington’s disease mouse models. *Sci Rep* 8:1–14.
- Hetz C, Papa FR (2018) The Unfolded Protein Response and Cell Fate Control. *Mol Cell* 69:169–181.
- Hickey MA, Gallant K, Gross GG, Levine MS, Chesselet MF (2005) Early behavioral deficits in R6/2 mice suitable for use in preclinical drug testing. *Neurobiol Dis* 20:1–11.
- Hickey MA, Kosmalska A, Enayati J, Cohen R, Zeitlin S, Levine MS, Chesselet M (2008) Extensive early motor and non-motor behavioral deficits are followed by striatal neuronal loss in Knock-in Huntington’s disease mice. *Neuroscience* 157:280–295.

- Hockly E, Richon VM, Woodman B, Smith DL, Zhou XB, Rosa E, Sathasivam K, Ghazi-Noori S, Mahal A, Lowden PAS, Steffan JS, Marsh JL, Thompson LM, Lewis CM, Marks PA, Bates GP (2003) Suberoylanilide hydroxamic acid, a histone deacetylase inhibitor, ameliorates motor deficits in a mouse model of Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:2041–2046.
- Hodges A et al. (2006) Regional and cellular gene expression changes in human Huntington's disease brain. *Hum Mol Genet* 15:965–977.
- Hodges A, Hughes G, Brooks S, Elliston L, Holmans P, Dunnett SB, Jones L (2008) Brain gene expression correlates with changes in behavior in the R6/1 mouse model of Huntington's disease. *Genes, Brain Behav* 7:288–299.
- Hodgson JG, Agopyan N, Gutekunst C, Leavitt BR, Lepiane F, Singaraja R, Smith DJ, Bissada N, Mccutcheon K, Nasir J, Jamot L, Li X, Stevens ME, Rosemond E, Roder JC, Phillips AG, Rubin EM, Hersch SM, Hayden MR (1999) A YAC Mouse Model for Huntington's Disease with Full-Length Mutant Huntingtin, Cytoplasmic Toxicity, and Selective Striatal Neurodegeneration. *Neuron* 23:181–192.
- Hofer M, Pagliusi SR, Hohn A, Leibrock J, Barde Y (1990) Regional distribution of brain (derived neurotrophic factor) mRNA in the adult mouse brain. *EMBO J* 9:2459–2464.
- Holbert S, D Nghien I, Kiechle T, Rosenblatt A, Wellington C, Hayden MR, Margolis RL, Ross CA, Dausset J, Ferrante RJ, Neri C (2001) The Gln-Ala repeat transcriptional activator CA150 interacts with huntingtin: Neuropathologic and genetic evidence for a role in Huntington's disease pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci* 98:1811–1816.
- Holmberg CI, Staniszewski KE, Mensah KN, Matouschek A, Morimoto RI (2004) Inefficient degradation of truncated polyglutamine proteins by the proteasome. *EMBO J* 23:4307–4318.
- Holt DJ, Graybiel AN, Saper CB (1997) Neurochemical Architecture of the Human Striatum. *J Comp Neurol* 25:1–25.
- Horvath S, Langfelder P, Kwak S, Aaronson J, Rosinski J, Vogt TF, Eszes M, Faull RLM, Curtis MA, Waldvogel HJ, Choi O-W, Tung S, Vinters H V, Coppola G, Yang XW (2016) Huntington's disease accelerates epigenetic aging of human brain and disrupts DNA methylation levels. *Aging (Albany NY)* 8:1485–1512.
- Hoss AG, Kartha VK, Dong X, Latourelle JC, Dumitriu A, Hadzi TC, Macdonald ME, Gusella JF, Akbarian S, Chen J, Weng Z, Myers RH (2014) MicroRNAs Located in the Hox Gene Clusters Are Implicated in Huntington's Disease Pathogenesis. *PLoS Genet* 10:1–14.
- Hrvatin S, Hochbaum DR, Nagy MA, Cicconet M, Robertson K, Cheadle L, Zilionis R, Ratner A, Borges-Monroy R, Klein AM, Sabatini BL, Greenberg ME (2018) Single-cell analysis of experience-dependent transcriptomic states in the mouse visual cortex. *Nat Neurosci* 21:1–35.
- Huang D, Sherman B, Lempicki R (2009a) Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* 4:44–57.
- Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA (2009b) Bioinformatics enrichment tools: Paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res* 37:1–13.
- Huntington G (2003) On Chorea. *J Neuropsychiatr* 15:109–112.
- Huntington Study Group (2016) Effect of Deutetrabenazine on Chorea Among Patients With Huntington Disease. *JAMA* 316:40–50.
- Huntington Study Group I (2006) Tetrabenazine as antichorea therapy in Huntington's disease. *Neurology* 66:366–372.
- Hussain G, Wang J, Rasul A, Anwar H, Imran A, Qasim M, Zafar S, Kamran SKS, Razzaq A, Aziz N, Ahmad W, Shabbir A, Iqbal J, Baig SM, Sun T (2019) Role of cholesterol and sphingolipids in brain development and neurological diseases. *Lipids Health Dis* 18:1–12.
- Hutvagner G, Simard MJ (2008) Argonaute proteins : key players in RNA silencing. *Nature* 9:22–32.

Hyrskyluoto A, Bruelle C, Lundh SH, Do HT, Kivinen J, Rappou E, Reijonen S, Waltimo T, Petersén Å, Lindholm D, Korhonen L (2014) Ubiquitin-specific protease-14 reduces cellular aggregates and protects against mutant huntingtin-induced cell degeneration: Involvement of the proteasome and ER stress-activated kinase IRE1 $\alpha$ . *Hum Mol Genet* 23:5928–5939.

## -I-

Iannicola C, Moreno S, Oliverio S, Nardacci R, Ciofi-Luzzatto A, Piacentini M (2000) Early alterations in gene expression and cell morphology in a mouse model of Huntington's disease. *J Neurochem* 75:830–839.

Ito R, Robbins TW, Everitt BJ (2004) Differential control over cocaine-seeking behavior by nucleus accumbens core and shell. *Nat Neurosci* 7:389–397.

Ito S, Alessio ACD, Taranova O V, Hong K, Lawrence C, Yi Z (2010) Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES cell self-renewal, and ICM specification. *Nature* 466:1129–1133.

## -J-

Jacquard C, Trioulier Y, Cosker F, Escartin C, Bizat N, Hantraye P, Cancela JM, Bonvento G, Brouillet E (2006) Brain mitochondrial defects amplify intracellular [Ca<sup>2+</sup>] rise and neurodegeneration but not Ca<sup>2+</sup> entry during NMDA receptor activation. *FASEB J* 20:1022–1040.

Jaeger BN, Linker SB, Parylak SL, Barron JJ, Gallina IS, Saavedra CD, Fitzpatrick C, Lim CK, Schafer ST, Lacar B, Jessberger S, Gage FH (2018) A novel environment-evoked transcriptional signature predicts reactivity in single dentate granule neurons. *Nat Commun* 9:1–15.

Jenuwein T, Allis CD (2001) Translating the Histone Code. *Science* (80- ) 293:1074–1081.

Jeong H, Then F, Mella TJ, Mazzulli JR, Cui L, Savas JN, Voisine C, Paganetti P, Tanese N, Hart AC, Yamamoto A, Krainc D (2009) Acetylation Targets Mutant Huntingtin to Autophagosomes for Degradation. *Cell* 137:60–72.

Jia H, Kast RJ, Steffan JS, Thomas EA (2012a) Selective histone deacetylase (HDAC) inhibition imparts beneficial effects in Huntington's disease mice: Implications for the ubiquitin-proteasomal and autophagy systems. *Hum Mol Genet* 21:5280–5293.

Jia H, Pallos J, Jacques V, Lau A, Tang B, Cooper A, Syed A, Purcell J, Chen Y, Sharma S, Sangrey GR, Darnell SB, Plasterer H, Sadri-vakili G, Gottesfeld JM, Thompson LM, Rusche JR, Marsh JL, Thomas EA (2012b) Histone deacetylase (HDAC) inhibitors targeting HDAC3 and HDAC1 ameliorate polyglutamine-elicited phenotypes in model systems of Huntington's disease. *Neurobiol Dis* 46:351–361.

Jia H, Wang Y, Morris CD, Jacques V, Gottesfeld JM, Rusche JR, Thomas EA (2016) The Effects of Pharmacological Inhibition of Histone Deacetylase 3 (HDAC3) in Huntington's Disease Mice. *PLoS One* 11:1–14.

Jiang H, Poirier MA, Liang Y, Pei Z, Weiskittel CE, Smith WW, Defranco DB, Ross CA (2006) Depletion of CBP is directly linked with cellular toxicity caused by mutant huntingtin. *Neurobiol Dis* 23:543–551.

## -K-

Kacher R, Lamazière A, Heck N, Kappes V, Mounier C, Despres G, Dembitskaya Y, Perrin E, Christaller W, Sasidharan Nair S, Messent V, Cartier N, Vanhoutte P, Venance L, Saudou F, Néri C, Caboche J, Betuing S (2019) CYP46A1 gene therapy deciphers the role of brain cholesterol metabolism in Huntington's disease. *Brain* 142:2432–2450.

- Kanehisa M, Goto S (2000) KEGG : kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res* 28:27–30.
- Kanehisa M, Sato Y, Furumichi M, Morishima K, Tanabe M (2019) New approach for understanding genome variations in KEGG. *Nucleic Acids Res* 47:D590–D595.
- Kassubek J, Juengling FD, Ecker D, Landwehrmeyer GB (2005) Thalamic Atrophy in Huntington ' s Disease Co-varies with Cognitive Performance : A Morphometric MRI Analysis. *Cereb Cortex* 15:846–853.
- Kawaguchi Y, Wilson CJ, Augood SJ, Emson PC (1995) Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. *Trends Neurosci* 18:527–535.
- Kazantsev A, Preisinger E, Dranovsky A, Goldgaber D, Housman D (1999) Insoluble detergent-resistant aggregates form between pathological and nonpathological lengths of polyglutamine in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:11404–11409.
- Kennedy L, Shelbourne PF (2000) Dramatic mutation instability in HD mouse striatum : does polyglutamine load contribute to cell-specific vulnerability in Huntington's disease ? *Hum Mol Genet* 9:2539–2544.
- Kerschbamer E, Biagioli M (2016) Huntington's Disease as Neurodevelopmental Disorder : Altered Chromatin Regulation, Coding, and Non-Coding RNA Transcription. *Front Neurosci* 9:1–5.
- Kesner (2007) Behavioral functions of the CA3 subregion of the hippocampus. *Learn Mem* 14:771–781.
- Kim D, Pertea G, Trapnell C, Pimentel H, Kelley R, Salzberg S (2013) TopHat2 : accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol* 14:R36.
- Kim K et al. (2010) Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells K. *Nature* 467:285–290.
- Kim M, Lee H-S, LaForet G, McIntyre C, Martin EJ, Chang P, Kim TW, Williams M, Reddy PH, Tagle D, Boyce FM, Won L, Heller A, Aronin N, DiFiglia M (1999) Mutant Huntingtin Expression in Clonal Striatal Cells: Dissociation of Inclusion Formation and Neuronal Survival by Caspase Inhibition. *J Neurosci* 19:964–973.
- Kirch RD, Meyer PT, Geisler S, Braun F, Gehrig S, Langen KJ, von Hörsten S, Nikkhah G, Cassel JC, Döbrössy MD (2013) Early deficits in declarative and procedural memory dependent behavioral function in a transgenic rat model of Huntington's disease. *Behav Brain Res* 239:15–26.
- Klevytska AM, Tebbenkamp ATN, Savonenko A V, Borchelt DR (2010) Partial Depletion of CREB-Binding Protein Reduces Life Expectancy in a Mouse Model of Huntington Disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 69:396–404.
- Klug A (2010) The Discovery of Zinc Fingers and Their Applications in Gene Regulation and Genome Manipulation. *Annu Rev Biochem* 79:213–231.
- Ko M, Huang Y, Jankowska AM, Pape UJ, Tahiliani M, Bandukwala HS, An J (2010) Impaired hydroxylation of 5-methylcytosine in myeloid cancers with mutant TET2. *Nature* 468:839–843.
- Kordasiewicz HB, Stanek LM, Wancewicz E V, Mazur C, Mcalonis MM, Pytel KA, Artates JW, Weiss A, Cheng SH, Shihabuddin LS, Hung G, Bennett CF, Cleveland DW (2012) Sustained Therapeutic Reversal of Huntington's Disease by Transient Repression of Huntingtin Synthesis. *Neuron* 74:1031–1044.
- Korzus E (2010) Manipulating the brain with epigenetics. *Nat Neurosci* 13:405–406.
- Korzus E (2017) Rubinstein-Taybi Syndrome and Epigenetic Alterations. *Adv Exp Med Biol* 978:39–62.
- Korzus E, Rosenfeld MG, Mayford M (2004) CBP Histone Acetyltransferase Activity Is a Critical Component of Memory Consolidation. *Neuron* 42:961–972.
- Kourkouta E, Weij R, Van J, Datson NA, Gonza A, Giessen D, Mulders S, Kontkanen O, Heikkinen T, Lehtima K, Deutekom JCT Van (2017) The expanded CAG repeat in the huntingtin gene as target for therapeutic RNA modulation throughout the HD mouse brain. *PLoS One* 12:1–24.
- Kratter IH, Zahed H, Lau A, Tsvetkov AS, Daub AC, Weiberth KF, Gu X, Saudou F, Humbert S, Yang XW, Osmand A, Steffan JS, Masliah E, Finkbeiner S (2016) Serine 421 regulates mutant huntingtin toxicity and clearance in mice. *J Clin Invest* 126:3585–3597.

- Kreilau F, Spiro AS, McLean CA, Garner B, Jenner AM (2016) Evidence for altered cholesterol metabolism in Huntington's disease post mortem brain tissue. *Neuropathol Appl Neurobiol* 42:535–546.
- Krieger C, Duchon MR (2002) Mitochondria , Ca<sup>2+</sup> and neurodegenerative disease. *Eur J Pharmacol* 447:177–188.
- Kubo I, Ochi M, Vieira PC, Komatsu S (1993) Antitumor Agents from the Cashew (*Anacardium occidentale*) Apple Juice. *J Agric Food Chem* 41:1012–1015.
- Kuhn A et al. (2007) Mutant huntingtin's effects on striatal gene expression in mice recapitulate changes observed in human Huntington's disease brain and do not differ with mutant huntingtin length or wild-type huntingtin dosage. *Hum Mol Genet* 16:1845–1861.
- Kumar A, Ratan RR (2016) Oxidative Stress and Huntington's Disease: The Good, The Bad, and The Ugly. *J Huntingtons Dis* 5:217–237.

-L-

- Labadorf A, Hoss AG, Lagomarsino V, Latourelle JC, Hadzi TC, Bregu J, MacDonald ME, Gusella JF, Chen JF, Akbarian S, Weng Z, Myers RH (2016) RNA sequence analysis of human huntington disease brain reveals an extensive increase in inflammatory and developmental gene expression. *PLoS One* 11:1–21.
- Labbadia J, Novoselov SS, Bett JS, Weiss A, Paganetti P, Bates GP, Cheetham ME (2012) Suppression of protein aggregation by chaperone modification of high molecular weight complexes. *Brain* 135:1180–1196.
- Landgrave-gómez J, Mercado-gómez O, Guevara-guzmán R (2015) Epigenetic mechanisms in neurological and neurodegenerative diseases. *Front Cell Neurosci* 9:1–11.
- Landles C, Sathasivam K, Weiss A, Woodman B, Moffitt H, Finkbeiner S, Sun B, Gafni J, Ellerby LM, Trottier Y, Richards WG, Osmand A, Paganetti P, Bates GP (2010) Proteolysis of Mutant Huntingtin Produces an Exon 1 Fragment That Accumulates as an Aggregated Protein in Neuronal Nuclei in Huntington Disease. *J Biol Chem* 285:8808–8823.
- Langbehn DR, Hayden M, Paulsen JS, Group P-HI of the HS (2010) CAG-Repeat Length and the Age of Onset in Huntington Disease (HD) : A Review and Validation Study of Statistical Approaches. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet* 153B:397–408.
- Langfelder P et al. (2016) Integrated genomics and proteomics define huntingtin CAG length-dependent networks in mice. *Nat Neurosci* 19:623–633.
- Langfelder P, Gao F, Wang N, Howland D, Kwak S, Vogt F, Aaronson JS, Rosinski J, Coppola G, Horvath S, Yang XW (2018) MicroRNA signatures of endogenous Huntingtin CAG repeat expansion in mice. *PLoS One* 13:1–20.
- Larrouy B, Blonski C, Boiziau C, Shireb D, Toulmt J, Stuer M, Moreau S, Shire D, Toulmé JJ (1992) RNase H-mediated inhibition of translation by antisense oligodeoxyribo- nucleotides : use of backbone modification to improve specificity. *Gene* 121:189–194.
- Lawhorn C, Smith DM, Brown LL (2008) Striosome-matrix pathology and motor deficits in the YAC128 mouse model of Huntington's disease. *Neurobiol Dis* 32:471–478 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2008.08.006>.
- Lawrence AD, Hodges JR, Rosser AE, Kershaw A, Rubinsztein DC, Robbins TW, Sahakian BJ, Neurosciences PET (1998) Evidence for specific cognitive deficits in preclinical Huntington ' s disease. :1329–1341.
- Lawrence AD, Sahakian BJ, Rogers RD, Hodges JR, Robbins TW (1999) Discrimination, reversal, and shift learning in Huntington's disease : mechanisms of impaired response selection. *Neuropsychologie* 37:1359–1374.
- Le Gras S, Keime C, Anthony A, Lotz C, De Longprez L, Brouillet E, Cassel JC, Boutillier AL, Merienne K (2017) Altered enhancer transcription underlies Huntington's disease striatal transcriptional signature. *Sci Rep* 7:1–11.

- Lee H, Noh JY, Oh Y, Kim Y, Chang JW, Chung CW, Lee ST, Kim M, Ryu H, Jung YK (2012a) IRE1 plays an essential role in ER stress-mediated aggregation of mutant huntingtin via the inhibition of autophagy flux. *Hum Mol Genet* 21:101–114.
- Lee J et al. (2012b) CAG repeat expansion in Huntington disease determines age at onset in a fully dominant fashion. *Neurology* 78:690–695.
- Lee JM, Chao MJ, Harold D, Elneel KA, Gillis T, Holmans P, Jones L, Orth M, Myers RH, Kwak S, Wheeler VC, MacDonald ME, Gusella JF (2017) A modifier of Huntington's disease onset at the MLH1 locus. *Hum Mol Genet* 26:3859–3867.
- Lee ST, Chu K, Im WS, Yoon HJ, Im JY, Park JE, Park KH, Jung KH, Lee SK, Kim M, Roh JK (2011) Altered microRNA regulation in Huntington's disease models. *Exp Neurol* 227:172–179.
- Leitman J, Ulrich Hartl F, Lederkremer GZ (2013) Soluble forms of polyQ-expanded huntingtin rather than large aggregates cause endoplasmic reticulum stress. *Nat Commun* 4:1–10 Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms3753>.
- Leoni V, Caccia C (2015) The impairment of cholesterol metabolism in Huntington disease. *Biochim Biophys Acta* 1851:1095–1105 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2014.12.018>.
- Lewerenz J, Maher P (2015) Chronic glutamate toxicity in neurodegenerative diseases-What is the evidence? *Front Neurosci* 9:1–20.
- Li Q, Li G, Wu D, Lu H, Hou Z, Ross CA, Yang Y, Zhang J, Duan W (2017) Resting-state functional MRI reveals altered brain connectivity and its correlation with motor dysfunction in a mouse model of Huntington's disease. *Sci Rep* 7:1–9 Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-17026-5>.
- Li S-H, Cheng AL, Zhou H, Lam S, Rao M, Li H, Li X-J (2002) Interaction of Huntington Disease Protein with Transcriptional Activator Sp1. *Mol Cell Biol* 22:1277–1287.
- Lin C, Tallaksen-greene S, Chien W, Cearley JA, Jackson WS, Crouse AB, Ren S, Li X, Albin RL, Detloff PJ (2001) Neurological abnormalities in a knock-in mouse model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet* 10:137–144.
- Lione LA, Carter RJ, Hunt MJ, Bates GP, Morton AJ, Dunnett SB (1999) Selective Discrimination Learning Impairments in Mice Expressing the Human Huntington's Disease Mutation. *J Neurosci* 19:10428–10437.
- Liot G, Valette J, Pépin J, Flament J, Brouillet E (2017) Biochemical and Biophysical Research Communications Energy defects in Huntington ' s disease : Why “ in vivo ” evidence matters. *Biochem Biophys Res Commun* 483:1084–1095.
- Liot G, Zala D, Pla P, Mottet G, Piel M, Saudou F (2013) Mutant Huntingtin Alters Retrograde Transport of TrkB Receptors in Striatal Dendrites. *J Neurosci* 33:6298–6309.
- Liu L, Huang J, Han C, Zhang G, Xu X, Shen Y, Li J, Jiang H, Lin Z, Xiong N, Wang T (2016) Induced Pluripotent Stem Cells in Huntington's Disease: Disease Modeling and the Potential for Cell-Based Therapy. *Mol Neurobiol* 53:6698–6708.
- Lonze BE, Ginty DD (2002) Function and Regulation of CREB Family Transcription Factors in the Nervous System. *Neuron* 35:605–623.
- Lopez-Atalaya JP, Barco A (2014) Can changes in histone acetylation contribute to memory formation? *Trends Genet* 30:529–539.
- Love M, Huber W, Anders S (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 15.
- Lu Q, Yang Y, Chen C, Davis M, Byrd JC, Etherton MR, Umar A, Chen C (2004) Zn<sup>2+</sup>-Chelating Motif-Tethered Short-Chain Fatty Acids as a Novel Class of Histone Deacetylase Inhibitors. *J Med Chem* 47:467–474.

- Lunkes A, Lindenberg KS, Ben-Haem L, Weber C, Devys D, Mandel J-L, Trottier Y (2002) Proteases acting on mutant huntingtin generate cleaved products that differentially build up cytoplasmic and nuclear inclusions. *Mol Cell* 10:259–269.
- Luthi-Carter R, Apostol BL, Dunah AW, DeJohn MM, Farrell LA, Bates GP, Young AB, Standaert DG, Thompson LM, Cha JHJ (2003) Complex alteration of NMDA receptors in transgenic Huntington's disease mouse brain: Analysis of mRNA and protein expression, plasma membrane association, interacting proteins, and phosphorylation. *Neurobiol Dis* 14:624–636.
- Luthi-Carter R, Hanson S a, Strand AD, Bergstrom D a, Chun W, Peters NL, Woods AM, Chan EY, Kooperberg C, Krainc D, Young AB, Tapscott SJ, Olson JM (2002) Dysregulation of gene expression in the R6/2 model of polyglutamine disease: parallel changes in muscle and brain. *Hum Mol Genet* 11:1911–1926.
- Luthi-Carter R, Strand A, Peters NL, Solano SM, Hollingsworth ZR, Menon AS, Frey AS, Spektor BS, Penney EB, Schilling G, Ross CA, Borchelt DR, Tapscott SJ, Young AB, Cha JHJ, Olson JM (2000) Decreased expression of striatal signaling genes in a mouse model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet* 9:1259–1271.
- Lyons MR, West AE (2011) Mechanisms of specificity in neuronal activity-regulated gene transcription. *Prog Neurobiol* 94:259–295.

## -M-

- Ma L, Hu B, Liu Y, Vermilyea SC, Liu H, Gao L, Sun Y, Zhang X, Zhang SC (2012) Human Embryonic Stem Cell-derived GABA Neurons Correct Locomotion Deficits in Quinolinic Acid-Lesioned Mice. *Cell Stem Cell* 10:455–464.
- Maiuri T, Woloshansky T, Xia J, Truant R (2013) The huntingtin N17 domain is a multifunctional CRM1 and ran-dependent nuclear and cilial export signal. *Hum Mol Genet* 22:1383–1394.
- Majerova V, Kalincik T, Laczó J, Vyhnaek M, Hort J, Bojar M, Ruzickaka E, Roth J (2012) Disturbance of real space navigation in moderately advanced but not in early Huntington's disease. *J Neurol Sci* 312:86–91.
- Mangiarini L, Sathasivam K, Mahatl A, Mott R, Seller M, Bates GP (1997) Instability of highly expanded CAG repeats in mice transgenic for the Huntington's disease mutation. *Nat Genet* 15:197–200.
- Mangiarini L, Sathasivam K, Seller M, Cozens B, Harper A, Hetherington C, Lawton M, Trottier Y, Lehrach H, Davies SW, Bates GP (1996) Exon I of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell* 87:493–506.
- Mardinly AR, Spiegel I, Patrizi A, Centofante E, Bazinet JE, Tzeng CP, Mandel-Brehm C, Harmin DA, Adesnik H, Fagiolini M, Greenberg ME (2016) Sensory experience regulates cortical inhibition by inducing IGF1 in VIP neurons. *Nature* 531:371–375.
- Martin DDO, Ladha S, Ehrnhoefer DE, Hayden MR (2015) Autophagy in Huntington disease and huntingtin in autophagy. *Trends Neurosci* 38:26–35 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tins.2014.09.003>.
- Martinez-Vicente M, Tallozy Z, Wong E, Tang G, Koga H, Kaushik S, Arias E, Harris S, Sulzer D, Cuervo a M (2010) Cargo Recognition Failure is responsible for Inefficient Autophagy in Huntington's Disease. *Nat Neurosci* 13:567–576.
- Mccampbell A, Taye AA, Whitty L, Penney E, Steffan JS, Fischbeck KH (2001) Histone deacetylase inhibitors reduce polyglutamine toxicity. *PNAS* 98:15179–15184.
- Mccampbell A, Taylor JP, Taye AA, Robitschek J, Li M, Walcott J, Merry D, Chai Y, Paulson H, Sobue G, Fischbeck KH (2000) CREB-binding protein sequestration by expanded polyglutamine. *Hum Mol Genet* 9:2197–2202.
- McColgan P, Tabrizi SJ (2018) Huntington's disease : a clinical review. *Eur J Neurol* 25:24–34.
- Mcfarland KN, Das S, Sun TT, Leyfer D, Xia E, Sangrey GR, Kuhn A, Luthi-carter R, Clark TW, Sadri-vakili G, Cha JJ (2012) Genome-Wide Histone Acetylation Is Altered in a Transgenic Mouse Model of Huntington's Disease. *PLoS One* 7:1–16.

- McGarry A et al. (2016) A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of coenzyme Q10 in Huntington disease. *Neurology* 88:152–159.
- McGeer EG, McGeer PL (1976) Duplication of biochemical changes of Huntington's chorea by intrastriatal injections of glutamic and kainic acids. *Nature* 263:517–519.
- Mcgill JK, Beal MF (2006) PGC-1 $\alpha$ , a New Therapeutic Target in Huntington's Disease? *Cell* 127:465–468.
- Meadows JP, Guzman-karlsson MC, Phillips S, Brown JA, Strange SK, Sweatt JD, Hablitz JJ (2016) Dynamic DNA methylation regulates neuronal intrinsic membrane excitability. *Sci Signal* 9:1–15.
- Menalled L, El-Khodori BF, Patry M, Suárez-Fariñas M, Orenstein SJ, Zahasky B, Leahy C, Wheeler V, Yang XW, MacDonald M, Morton AJ, Bates G, Leeds J, Park L, Howland D, Signer E, Tobin A, Brunner D (2009) Systematic behavioral evaluation of Huntington's disease transgenic and knock-in mouse models. *Neurobiol Dis* 35:319–336.
- Menalled LB (2005) Knock-in mouse models of Huntington's disease. *NeuroRx* 2:465–470.
- Menalled LB et al. (2012) Comprehensive Behavioral and Molecular Characterization of a New Knock-In Mouse Model of Huntington's Disease: ZQ175. *PLoS One* 7.
- Menalled LB, Sison JD, Dragatsis I, Zeitlin S, Chesselet MF (2003) Time course of early motor and neuropathological anomalies in a knock-in mouse model of Huntington's disease with 140 CAG repeats. *J Comp Neurol* 465:11–26.
- Merienne N, Meunier C, Schneider A, Seguin J, Satish SN, Rocher AB, Le Gras S, Keime C, Faull R, Pellerin L, Chatton J-Y, Neri C, Merienne K, Déglon N (2019) Cell-Type-Specific Gene Expression Profiling in Adult Mouse Brain Reveals Normal and Disease-State Signatures. *Cell Rep* 26:2477–2493.
- Mews P, Donahue G, Drake AM, Luczak V, Abel T, Berger SL (2017) Acetyl-CoA synthetase regulates histone acetylation and hippocampal memory. *Nature* 546:381–386.
- Mielcarek M, Benn CL, Franklin SA, Smith DL, Woodman B, Marks PA, Bates GP (2011) SAHA Decreases HDAC 2 and 4 Levels In Vivo and Improves Molecular Phenotypes in the R6/2 Mouse Model of Huntington's Disease. *PLoS One* 6:1–10.
- Miller J, Arrasate M, Shaby BA, Mitra S, Masliah E, Finkbeiner S (2010) Quantitative relationships between huntingtin levels, polyglutamine length, inclusion body formation, and neuronal death provide novel insight into Huntington's disease molecular pathogenesis. *J Neurosci* 30:10541–10550.
- Milnerwood AJ, Gladding CM, Pouladi MA, Kaufman AM, Hines RM, Boyd JD, Ko RWY, Vasuta OC, Graham RK, Hayden MR, Murphy TH, Raymond LA (2010) Early Increase in Extrasynaptic NMDA Receptor Signaling and Expression Contributes to Phenotype Onset in Huntington's Disease Mice. *Neuron* 65:178–190.
- Minatohara K, Akiyoshi M, Okuno H (2016) Role of Immediate-Early Genes in Synaptic Plasticity and Neuronal Ensembles Underlying the Memory Trace. *Front Mol Neurosci* 8:1–11.
- Mitra S, Tsvetkov AS, Finkbeiner S (2009) Single neuron ubiquitin-proteasome dynamics accompanying inclusion body formation in Huntington disease. *J Biol Chem* 284:4398–4403.
- Mogenson GJ, Brudzynski SM, Wu M, Yang CR, Yim CCY (1993) From motivation to action: a review of dopaminergic regulation of limbic, nucleus accumbens, ventral pallidum, pedunculo-pontine nucleus circuitries involved in limbic-motor integration. In: *Limbic motor circuits and neuropsychiatry* (Kalivas P, Barnes C, eds), pp 193–236. CRC Press, Inc, Boca Raton, FL.
- Mogenson GJ, Jones DL, Yim CY (1980) From motivation to action: Functional interface between the limbic system and the motor system. *Prog Neurobiol* 14:69–97.
- Molina-Calavita M, Barnat M, Elias S, Aparicio E, Piel M, Humbert S (2014) Mutant Huntingtin Affects Cortical Progenitor Cell Division and Development of the Mouse Neocortex. *J Neurosci* 34:10034–10040.
- Monteys AM, Ebanks SA, Keiser MS, Davidson BL (2017) CRISPR/Cas9 Editing of the Mutant Huntingtin Allele In Vitro and In Vivo. *Mol Ther* 25:12–23.



- Morigaki R, Goto S (2017) Striatal vulnerability in huntington's disease: Neuroprotection versus neurotoxicity. *Brain Sci* 7:02–25.
- Morris R (1984) Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* 11:47–60.
- Moumné L, Betuing S, Caboche J (2013) Multiple Aspects of Gene Dysregulation in Huntington's Disease. *Front Neurol* 4:1–10.
- Moussaieff A, Rouleau M, Kitsberg D, Cohen M, Levy G, Barasch D, Nemirovski A, Shen-Orr S, Laevsky I, Amit M, Bomze D, Elena-Herrmann B, Scherf T, Nissim-Rafinia M, Kempa S, Itskovitz-Eldor J, Meshorer E, Aberdam D, Nahmias Y (2015) Glycolysis-mediated changes in acetyl-CoA and histone acetylation control the early differentiation of embryonic stem cells. *Cell Metab* 21:392–402.
- Mouzat K, Chudinova A, Polge A, Kantar J, Camu W, Raoul C, Lumbroso S (2019) Regulation of Brain Cholesterol: What Role Do Liver X Receptors Play in Neurodegenerative Diseases? *Int J Mol Sci* 20:1–17.

-N-

- Naia L, Cunha-oliveira T, Rodrigues J, Rosenstock TR, Oliveira A, Ribeiro M, Carmo C, Oliveira-sousa SI, Duarte AI, Hayden MR, Rego AC (2017) Histone Deacetylase Inhibitors Protect Against Pyruvate Dehydrogenase Dysfunction in Huntington's Disease. *J Neurosci* 37:2776–2794.
- Naia L, Ferreira IL, Cunha-Oliveira T, Duarte AI, Ribeiro M, Rosenstock TR, Laço MN, Ribeiro MJ, Oliveira CR, Saudou F, Humbert S, Rego C (2015) Activation of IGF-1 and Insulin Signaling Pathways Ameliorate Mitochondrial Function and Energy Metabolism in Huntington's Disease Human Lymphoblasts. *Mol Neurobiol* 51:331–348.
- Nasir J, Zeisler J, Hayden MR, Floresco SB, Phillips AG, O'Kusky JR, Diewert VM, Richman JM, Borowski A, Marth JD, Phillips AG, Hayden MR (1995) Targeted disruption of the Huntington's disease gene results in embryonic lethality and behavioral and morphological changes in heterozygotes. *Cell* 81:811–823.
- Neto JL, Lee JM, Afridi A, Gillis T, Guide JR, Dempsey S, Lager B, Alonso I, Wheeler V, Pinto RM (2017) Genetic Contributors to Intergenerational CAG Repeat Instability in Huntington's Disease Knock-in Mice. *Genetics* 205:503–516.
- Nguyen GD, Gokhan S, Molero AE, Mehler MF (2013) Selective Roles of Normal and Mutant Huntingtin in Neural Induction and Early Neurogenesis. *PLoS One* 8:1–11.
- Nguyen HP, Kobbe P, Rahne H, Wörpel T, Jäger B, Stephan M, Pabst R, Holzmann C, Riess O, Korr H, Kántor O, Petrasch-Parwez E, Wetzell R, Osmand A, von Hörsten S (2006) Behavioral abnormalities precede neuropathological markers in rats transgenic for Huntington's disease. *Hum Mol Genet* 15:3177–3194.
- Nguyen HP, Metzger S, Holzmann C, Koczan D, Thiesen HJ, von Hörsten S, Riess O, Bonin M (2008) Age-dependent gene expression profile and protein expression in a transgenic rat model of Huntington's disease. *Proteomics - Clin Appl* 2:1638–1650.
- Nicolini F, Pagano G, Fusar-Poli P, Wood A, Mrzljak L, Sampaio C, Politis M (2018) Striatal molecular alterations in HD gene carriers: A systematic review and meta-analysis of PET studies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 89:185–196.
- Nieweg K, Schaller H, Pfrieger FW (2009) Marked differences in cholesterol synthesis between neurons and glial cells from postnatal rats. *J Neurochem* 109:125–134.
- Noh JY, Lee H, Song S, Kim NS, Im W, Kim M, Seo H, Chung CW, Chang JW, Ferrante RJ, Yoo YJ, Ryu H, Jung YK (2009) SCAMP5 links endoplasmic reticulum stress to the accumulation of expanded polyglutamine protein aggregates via endocytosis inhibition. *J Biol Chem* 284:11318–11325.

Nopoulos P, Epping EA, Wassink T, Schlaggar BL, Perlmutter J (2011) Correlation of CAG repeat length between the maternal and paternal allele of the Huntingtin gene : evidence for assortative mating. *Behav Brain Funct* 7:1–4.

Nucifora Jr. FC (2001) Interference by Huntingtin and Atrophin-1 with CBP-Mediated Transcription Leading to Cellular Toxicity. *Science* (80- ) 291:2423–2428.

## -O-

O'Donnell P (2003) Dopamine gating of forebrain neural ensembles. *Eur J Neurosci* 17:429–435.

O'Kusky JR, Nasir J, Cicchetti F, Parent A, Hayden MR (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.

Okuno H (2011) Regulation and function of immediate-early genes in the brain: Beyond neuronal activity markers. *Neurosci Res* 69:175–186.

Oliveira JMA, Chen S, Almeida S, Riley R, Gonçalves J, Oliveira CR, Hayden MR, Nicholls DG, Ellerby LM, Rego AC (2006) Mitochondrial-Dependent Ca<sup>2+</sup> Handling in Huntington's Disease Striatal Cells : Effect of Histone Deacetylase Inhibitors. *J Neurosci* 26:11174–11186.

Oorschot DE (2013) The percentage of interneurons in the dorsal striatum of the rat, cat, monkey and human: A critique of the evidence. *Basal Ganglia* 3:19–24.

Orr AL, Li S, Wang C, Li H, Wang J, Rong J, Xu X, Mastroberardino PG, Greenamyre JT, Li X (2008) N-Terminal Mutant Huntingtin Associates with Mitochondria and Impairs Mitochondrial Trafficking. *Neurobiol Dis* 28:2783–2792.

Orr HT (2012) Polyglutamine Neurodegeneration : Expanded Glutamines Enhance Native Functions. *Curr Opin Genet Dev* 22:251–255.

Ortiz AN, Osterhaus GL, Lauderdale K, Manhoney L, Fowler SC, von Hörsten S, Riess O, Johnson MA (2012) Motor Function and Dopamine Release Measurements in Transgenic Huntington's Disease Model Rats. *Brain Res* 1450:148–156.

## -P-

Packard MG, Hirsh R, White NM (1989) Differential effects of fornix and caudate nucleus lesions on two radial maze tasks: Evidence for multiple memory systems. *J Neurosci* 9:1465–1472.

Palidwor GA, Shcherbinin S, Huska MR, Rasko T, Stelzl U, Arumughan A, Foulle R, Porras P, Sanchez-Pulido L, Wanker EE, Andrade-Navarro MA (2009) Detection of alpha-rod protein repeats using a neural network and application to huntingtin. *PLoS Comput Biol* 5.

Pallier PN, Drew CJG, Morton AJ (2009) The detection and measurement of locomotor deficits in a transgenic mouse model of Huntington's disease are task- and protocol-dependent: Influence of non-motor factors on locomotor function. *Brain Res Bull* 78:347–355.

Pandey UB, Nie Z, Batlevi Y, McCray BA, Ritson GP, Nedelsky NB, Schwartz SL, Diprospero NA, Knight MA, Schuldiner O, Padmanabhan R, Hild M, Berry DL, Garza D, Hubbert CC, Yao TP, Baehrecke EH, Taylor JP (2007) HDAC6 rescues neurodegeneration and provides an essential link between autophagy and the UPS. *Nature* 447:859–863.

Panov A V, Gutekunst C, Leavitt BR, Hayden MR, Burke JR, Strittmatter WJ, Greenamyre JT (2002) Early mitochondrial calcium defects in Huntington's disease are a direct effect of polyglutamines. *Nat Neurosci* 5:731–736.

- Parent A (1990) Extrinsic connedions of the basal ganglia p. Trends Neurosci:254–258.
- Park IH, Lerou PH, Zhao R, Huo H, Daley GQ (2008) Generation of human-induced pluripotent stem cells. Nat Protoc 3:1180–1186.
- Park SH, Kukushkin Y, Gupta R, Chen T, Konagai A, Hipp MS, Hayer-Hartl M, Hartl FU (2013) PolyQ proteins interfere with nuclear degradation of cytosolic proteins by sequestering the Sis1p chaperone. Cell 154:134–145.
- Parsons MP, Raymond LA (2014) Extrasynaptic NMDA receptor involvement in central nervous system disorders. Neuron 82:279–293.
- Paulsen JS (2011) Cognitive Impairment in Huntington Disease : Diagnosis and Treatment. Curr Neurol Neurosci Rep 11:474–483.
- Paulsen JS, Langbehn DR, Stout JC, Aylward E, Ross C a, Nance M, Guttman M, Johnson S, MacDonald M, Beglinger LJ, Duff K, Kayson E, Biglan K, Shoulson I, Oakes D, Hayden M (2008) Detection of Huntington’s disease decades before diagnosis: the Predict-HD study. J Neurol Neurosurg Psychiatry 79:874–880.
- Paulsen JS, Miller AC, Hayes T, Shaw E (2017) Cognitive and behavioral changes in Huntington disease before diagnosis. Handb Clin Neurol 144:69–91.
- Paulsen JS, Zimbelman JL, Hinton SC, Langbehn DR, Leveroni CL, Benjamin ML, Reynolds NC, Rao SM (2004) fMRI Biomarker of Early Neuronal Dysfunction in Presymptomatic Huntington ’ s Disease. AJNR 25:1715–1721.
- Peixoto L, Abel T (2013) The Role of Histone Acetylation in Memory Formation and Cognitive Impairments. Neuropsychopharmacology 38:62–76 Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/npp.2012.86>.
- Pérez-Navarro E, Canals JM, Ginés S, Alberch J (2006) Cellular and molecular mechanisms involved in the selective vulnerability of striatal projection neurons in Huntington’s disease. Histol Histopathol 21:1217–1232.
- Peschanski M, Cesaro P, Hantraye P (1995) Rationale for intrastriatal grafting of striatal neuroblasts in patients with Huntington’s disease. Neuroscience 68:273–285.
- Pfriefer FW, Ungerer N (2011) Cholesterol metabolism in neurons and astrocytes. Prog Lipid Res 50:357–371.
- Pietrocola F, Galluzzi L, Bravo-San Pedro JM, Madeo F, Kroemer G (2015) Acetyl coenzyme A: A central metabolite and second messenger. Cell Metab 21:805–821.
- Pinto RM, Dragileva E, Kirby A, Lloret A, Lopez E, St. Claire J, Panigrahi GB, Hou C, Holloway K, Gillis T, Guide JR, Cohen PE, Li GM, Pearson CE, Daly MJ, Wheeler VC (2013) Mismatch Repair Genes Mlh1 and Mlh3 Modify CAG Instability in Huntington’s Disease Mice: Genome-Wide and Candidate Approaches. PLoS Genet 9.
- Pla P, Orvoen S, Saudou F, David DJ, Humbert S (2014) Mood disorders in Huntington’s disease: From behavior to cellular and molecular mechanisms. Front Behav Neurosci 8:1–15.
- Plank JL, Dean A (2014) Enhancer function: Mechanistic and genome-wide insights come together. Mol Cell 55:5–14.
- Plotkin JL, Surmeier DJ (2015) Corticostriatal synaptic adaptations in Huntington’s disease. Curr Opin Neurobiol 33:53–62.
- Pol-Bodetto S, Jeltsch-David H, Lecourtier L, Rusnac N, Mam-Lam-Fook C, Cosquer B, Geiger K, Cassel JC (2011) The double-H maze test, a novel, simple, water-escape memory task: Acquisition, recall of recent and remote memory, and effects of systemic muscarinic or NMDA receptor blockade during training. Behav Brain Res 218:138–151 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2010.11.043>.
- Popiel HA, Takeuchi T, Fujita H, Yamamoto K, Ito C, Yamane H, Muramatsu S ichi, Toda T, Wada K, Nagai Y (2012) Hsp40 Gene Therapy Exerts Therapeutic Effects on Polyglutamine Disease Mice via a Non-Cell Autonomous Mechanism. PLoS One 7:7–14.
- Posse de Chaves EI, Rusinol AE, Vance DE, Campenot RB, Vance JE (1997) Role of lipoproteins in the delivery of lipids to axons during axonal regeneration. J Biol Chem 272:30766–30773.

- Possin KL, Kim H, Geschwind MD, Moskowitz T, Johnson ET, Sha SJ, Apple A, Xu D, Miller BL, Finkbeiner S, Hess CP, Kramer JH (2017) Egocentric and allocentric visuospatial working memory in premotor Huntington's disease: A double dissociation with caudate and hippocampal volumes. *Neuropsychologia* 101:57–64.
- Poudel GR, Egan GF, Churchyard A, Chua P, Stout JC, Georgiou-karistianis N (2014a) Abnormal synchrony of resting state networks in premanifest and symptomatic Huntington disease : the IMAGE-HD study. *J psychiatry Neurosci* 39:87–96.
- Poudel GR, Stout JC, D JFD, Salmon L, Churchyard A, Chua P, Georgiou-karistianis N, Egan GF (2014b) White matter connectivity reflects clinical and cognitive status in Huntington's disease. *Neurobiol Dis* 65:180–187.
- Pouladi M a, Morton a J, Hayden MR (2013) Choosing an animal model for the study of Huntington's disease. *Nat Rev Neurosci* 14:708–721.

## -Q-

- Qin L, Zhu N, Ao BX, Liu C, Shi YN, Du K, Chen JX, Zheng XL, Liao DF (2016) Caveolae and caveolin-1 integrate reverse cholesterol transport and inflammation in atherosclerosis. *Int J Mol Sci* 17:1–17.

## -R-

- Rasola A, Sciacovelli M, Pantic B, Bernardi P (2010) Signal Transduction to the Permeability Transition Pore. *FEBS Lett* 584:1989–1996.
- Ratray I, Smith E, Gale R, Matsumoto K, Bates GP, Modo M (2013a) Correlations of Behavioral Deficits with Brain Pathology Assessed through Longitudinal MRI and Histopathology in the R6/2 Mouse Model of HD. *PLoS One* 8:1–15.
- Ratray I, Smith EJ, Crum WR, Walker TA, Gale R, Bates GP, Modo M (2013b) Correlations of behavioral deficits with brain pathology assessed through longitudinal MRI and histopathology in the R6/1 mouse model of huntington's disease. *PLoS One* 8:1–24.
- Ravikumar B, Vacher C, Berger Z, Davies JE, Luo S, Oroz LG, Scaravilli F, Easton DF, Duden R, O'Kane CJ, Rubinsztein DC (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.
- Reilmann R et al. (2014) Safety and tolerability of Selisistat for the treatment of Huntington's disease : results from a randomized, double-blind, placebo-controlled phase II trial. *Neurology*.
- Reilmann R, McGarry A, Landwehrmeyer G, Kiebertz K, Grachev I, Eyal E, Savola J, Borowsky B, Papapetropoulos S, Hayden M (2017) Efficacy, safety and tolerability of Pridopidine in Huntington's disease (HD) : Results from the phase II dose-ranging study, Pride-HD. *Mov Disord* 32.
- Reiner A, Albin RL, Anderson KD, D'Amato CJ, Penney JB, Young AB (1988) Differential loss of striatal projection neurons in Huntington disease. *Proc Natl Acad Sci* 85:5733–5737.
- Reiner A, Del Mar N, Meade CA, Yang H, Dragatsis I, Zeitlin S, Goldowitz D (2001) Neurons Lacking Huntingtin Differentially Colonize Brain and Survive in Chimeric Mice. *J Neurosci* 21:7608–7619.
- Reiner A, Dragatsis I, Dietrich P (2011) Genetics and neuropathology of Huntington's disease. *Int J Neurosci* 98:325–372.
- Renna M, Jimenez-sanchez M, Sarkar S, Rubinsztein DC (2010) Chemical Inducers of Autophagy That Enhance the Clearance of Mutant Proteins in Neurodegenerative Diseases. *J Biol Chem* 285:11061–11067.
- Ribeiro EA et al. (2018) Transcriptional and physiological adaptations in nucleus accumbens somatostatin interneurons that regulate behavioral responses to cocaine. *Nat Commun* 9:1–10.

- Rice JP, Wallace DG, Hamilton DA (2015) Lesions of the hippocampus or dorsolateral striatum disrupt distinct aspects of spatial navigation strategies based on proximal and distal information in a cued variant of the Morris water task. *Behav Brain Funct* 289:105–117.
- Richfield EK, Maguire-Zeiss KA, Vonkemann HE, Voorn P (1995) Preferential Loss of Preproenkephalin Versus Preprotachykinin Striatal Neurons From Huntington's Disease Patients. *Ann Neurol* 38:852–861.
- Rigamonti D, Sipione S, Goffredo D, Zuccato C, Fossale E, Cattaneo E (2001) Huntingtin's Neuroprotective Activity Occurs via Inhibition of Procaspase-9 Processing. *J Biol Chem* 276:14545–14548.
- Ring KL, An MC, Zhang N, O'Brien RN, Ramos EM, Gao F, Atwood R, Bailus BJ, Melov S, Mooney SD, Coppola G, Ellerby LM (2015) Genomic Analysis Reveals Disruption of Striatal Neuronal Development and Therapeutic Targets in Human Huntington's Disease Neural Stem Cells. *Stem Cell Reports* 5:1023–1038.
- Rosas HD, Doros G, Gevorkina S, Malarick K, Reuter M, Coutu J, Triggs TD, Wilkens PJ, Matson W, Salat DH, Hersch SM (2014) PRECREST : A phase II prevention and biomarker trial of creatine in at-risk Huntington disease. *Neurology* 82:850–857.
- Rosas HD, Koroshetz WJ, Chen YI, Skeuse C, Vangel M, Cudkovicz ME, Caplan K, Marek K, Seidman LJ, Makris N, Jenkins BG, Goldstein JM (2003) Evidence for more widespread cerebral pathology in early HD : an MRI-based morphometric analysis. *Neurology* 60:1615–1620.
- Ross CA, Poirier MA (2005) What is the role of protein aggregation in neurodegeneration ? *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:1370–1373 Available at: [papers2://publication/uuid/2E7DD7F8-0760-479E-AD5A-4FD50D46851B](http://www.nature.com/publication/uuid/2E7DD7F8-0760-479E-AD5A-4FD50D46851B).
- Ross CA, Tabrizi SJ (2011) Huntington's disease: From molecular pathogenesis to clinical treatment. *Lancet Neurol* 10:83–98.
- Ross RA (2010) Huntington's disease: a clinical review. *Orphanet J Rare Dis* 5:1–8 Available at: <http://www.orphandis.com/content/5/1/40>.
- Roze E, Cahill E, Martin E, Bonnet C, Vanhoutte P, Betuing S, Caboche J (2011) Huntington's disease and striatal signaling. *Front Neuroanat* 5:1–16.
- Rubinsztein DC et al. (1996) Phenotypic characterization of individuals with 30-40 CAG repeats in the Huntington disease (HD) gene reveals HD cases with 36 repeats and apparently normal elderly individuals with 36-39 repeats. *Am J Hum Genet* 59:16–22.
- Ryu H, Lee J, Hagerty SW, Soh BY, Mcalpin SE, Cormier KA, Smith KM, Ferrante RJ (2006) ESET/SETDB1 gene expression and histone H3 (K9) trimethylation in Huntington's disease. *PNAS* 103:19176–19181.
- Ryu H, Lee J, Olofsson BA, Mwidau A, Dedeoglu A, Escudero M, Flemington E, Azikhan-Clifford J, Ferrante RJ, Ratan RR (2003) Histone deacetylase inhibitors prevent oxidative neuronal death independent of expanded polyglutamine repeats via an Sp1-dependent pathway. *PNAS* 100:4281–4286.

-S-

- Sadri-Vakili G, Bouzou B, Benn CL, Kim M-O, Chawla P, Overland RP, Glajch KE, Xia E, Qiu Z, Hersch SM, Clark TW, Yohrling GJ, Cha JJ (2007) Histones associated with downregulated genes are hypo-acetylated in Huntington's disease models. *Hum Mol Genet* 16:1293–1306.
- Safren N, El Ayadi A, Chang L, Terrillion CE, Gould TD, Boehning DF, Monteiro MJ (2014) Ubiquilin-1 overexpression increases the lifespan and delays accumulation of huntingtin aggregates in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. *PLoS One* 9:1–13.
- Saft C, Lauter T, Kraus PH, Przuntek H, Andrich JE (2006) Dose-dependent improvement of myoclonic hyperkinesia due to Valproic acid in eight Huntington ' s Disease patients : a case series. *BMC Neurol* 6:1–6.

- Sasakawa Y, Naoe Y, Sogo N, Inoue T, Sasakawa T, Matsuo M, Manda T, Mutoh S (2005) Marker genes to predict sensitivity to FK228, a histone deacetylase inhibitor. *Biochem Pharmacol* 69:603–616.
- Sathasivam K, Neueder A, Gipson TA, Landles C, Benjamin AC, Bondulich MK, Smith DL, Faull RLM, Roos RAC, Howland D, Detloff PJ, Housman DE, Bates GP (2013) Aberrant splicing of HTT generates the pathogenic exon 1 protein in Huntington disease. *Proc Natl Acad Sci* 110:2366–2370.
- Saudou F, Finkbeiner S, Devys D, Greenberg ME (1998) Huntingtin Acts in the Nucleus to Induce Apoptosis but Death Does Not Correlate with the Formation of Intranuclear Inclusions. *Cell* 95:55–66.
- Saudou F, Humbert S (2016) The Biology of Huntingtin. *Neuron* 89:910–926.
- Saunders BT, Robinson TE (2012) The role of dopamine in the accumbens core in the expression of Pavlovian conditioned responses. *Eur J Neurosci* 36:2521–2532.
- Savic N, Schwank G (2016) Advances in therapeutic CRISPR/Cas9 genome editing. *Transl Res*:15–21.
- Sawa A, Wiegand GW, Cooper J, Margolis RL, Sharp AH, Lawler JF, Greenamyre JT, Snyder SH, Ross CA (1999) Increased apoptosis of Huntington disease lymphoblasts associated with repeat length-dependent mitochondrial depolarization. *Nat Med* 5:1194–1198.
- Sawiak SJ, Wood NI, Morton AJ (2016) Similar progression of morphological and metabolic phenotype in R6/2 mice with different CAG repeats revealed by in vivo magnetic resonance imaging and spectroscopy. *J Huntingtons Dis* 5:271–283.
- Schaukowitch K, Joo JY, Liu X, Watts JK, Martinez C, Kim TK (2014) Enhancer RNA facilitates NELF release from immediate early genes. *Mol Cell* 56:29–42.
- Schilling G, Becher MW, Sharp AH, Jinnah HA, Duan K, Kotzuk JA, Slunt HH, Ratovitski T, Cooper JK, Jenkins NA, Copeland NG, Price DL, Ross CA, Borchelt DR (1999) Intranuclear inclusions and neuritic aggregates in transgenic mice expressing a mutant N-terminal fragment of huntingtin. *Hum Mol Genet* 8:397–407.
- Schipper-Krom S, Juenemann K, Jansen AH, Wiemhoefer A, Van Den Nieuwendijk R, Smith DL, Hink MA, Bates GP, Overkleeft H, Ovaas H, Reits E (2014) Dynamic recruitment of active proteasomes into polyglutamine initiated inclusion bodies. *FEBS Lett* 588:151–159.
- Schmidt-Kastner R, Wetmore C, Olson L (1996) Comparative study of brain-derived neurotrophic factor messenger RNA and protein at the cellular level suggests multiple roles in hippocampus, striatum and cortex. *Neuroscience* 74:161–183.
- Schmidtke K, Manner H, Kaufmann R, Schmolck H (2002) Cognitive procedural learning in patients with fronto-striatal lesions. *Learn Mem* 9:419–429.
- Schneider A, Chatterjee S, Bousiges O, Selvi BR, Swaminathan A, Cassel R, Blanc F, Kundu TK, Boutillier AL (2013) Acetyltransferases (HATs) as Targets for Neurological Therapeutics. *Neurotherapeutics* 10:568–588.
- Schratt G (2009) MicroRNAs at the synapse. *Nat Rev Neurosci* 10:842–849.
- Schwarcz R, Foster AC, French ED, Whetsell WO, Köhler C (1984) Excitotoxic models for neurodegenerative disorders. *Life Sci* 35:19–32.
- Selvi BR, Jagadeesan D, Suma BS, Nagashankar G, Arif M, Balasubramanyam K, Eswaramoorthy M, Kundu TK (2008) Intrinsically Fluorescent Carbon Nanospheres as a Nuclear Targeting Vector : Delivery of Membrane-Impermeable Molecule to Modulate Gene Expression In Vivo. *Nano Lett* 8:3182–3188.
- Seong IS, Woda JM, Song JJ, Lloret A, Abeyrathne PD, Woo CJ, Gregory G, Lee JM, Wheeler VC, Walz T, Kingston RE, Gusella JF, Conlon RA, MacDonald ME (2010) Huntingtin facilitates polycomb repressive complex 2. *Hum Mol Genet* 19:573–583.
- Seredenina T, Gokce O, Luthi-Carter R (2011) Decreased striatal RGS2 expression is neuroprotective in Huntington's disease (HD) and exemplifies a compensatory aspect of HD-induced gene regulation. *PLoS One* 6:1–10.

- Seredenina T, Luthi-Carter R (2012) What have we learned from gene expression profiles in Huntington's disease? *Neurobiol Dis* 45:83–98.
- Shaid S, Brandts CH, Serve H, Dikic I (2013) Ubiquitination and selective autophagy. *Cell Death Differ* 20:21–30.
- Shankaran M, Di Paolo E, Leoni V, Caccia C, Ferrari Bardile C, Mohammed H, Di Donato S, Kwak S, Marchionini D, Turner S, Cattaneo E, Valenza M (2017) Early and brain region-specific decrease of de novo cholesterol biosynthesis in Huntington's disease: A cross-validation study in Q175 knock-in mice. *Neurobiol Dis* 98:66–76.
- Sharma S, Taliyan R (2015) Transcriptional dysregulation in Huntington's disease: The role of histone deacetylases. *Pharmacol Res* 100:157–169.
- Sharma S, Taliyan R, Singh S (2015) Beneficial effects of sodium butyrate in 6-OHDA induced neurotoxicity and behavioral abnormalities : Modulation of histone deacetylase activity. *Behav Brain Res* 291:306–314.
- Shimazu T, Hirschey MD, Newman J, He W, Moan N Le, Grueter CA, Lim H, Saunders LR, Stevens RD, Newgard CB, Fareze Jr R V, De Cabo R, Ulrich S, Akassoglou K, Verdin E (2013) Suppression of oxidative stress by  $\beta$ -Hydroxybutyrate, an endogenous histone deacetylase inhibitor. *Science* (80- ) 339:211–214.
- Shin JW, Kim K, Chao MJ, Atwal RS, Gillis T, Macdonald ME, Gusella JF, Lee J (2016) Permanent inactivation of Huntington's disease mutation by personalized allele-specific CRISPR/Cas9. *Hum Mol Genet* 25:4566–4576.
- Shirendeb U, Reddy AP, Manczak M, Calkins MJ, Mao P, Tagle DA, Reddy PH (2011) Abnormal mitochondrial dynamics , mitochondrial loss and mutant huntingtin oligomers in Huntington's disease : implications for selective neuronal damage. *Hum Mol Genet* 20:1438–1455.
- Shirendeb UP, Calkins MJ, Manczak M, Anekonda V, Dufour B, McBride JL, Mao P, Reddy PH (2012) Mutant huntingtin's interaction with mitochondrial protein Drp1 impairs mitochondrial biogenesis and causes defective axonal transport and synaptic degeneration in Huntington's disease. *Hum Mol Genet* 21:406–420.
- Sidoli S, Trefely S, Garcia BA, Carrer A (2019) Integrated analysis of acetyl-CoA and histone modification via mass spectrometry to investigate metabolically driven acetylation. *Methods Mol Biol* 1928:125–147.
- Siebzehnürbl FA et al. (2018) Early postnatal behavioral, cellular, and molecular changes in models of Huntington disease are reversible by HDAC inhibition. *PNAS* 115:8765–8774.
- Sieradzan KA, Mechan AO, Jones L, Wanker EE, Nukina N, Mann DMA (1999) Huntington's disease intranuclear inclusions contain truncated, ubiquitinated huntingtin protein. *Exp Neurol* 156:92–99.
- Siller-Pérez C, Serafín N, Prado-Alcalá RA, Roozendaal B, Quirarte GL (2017) Glucocorticoid administration into the dorsolateral but not dorsomedial striatum accelerates the shift from a spatial toward procedural memory. *Neurobiol Learn Mem* 141:124–133.
- Simpson SA, Rae D (2012) A standard of care for Huntington's disease : who, what and why. *Neurodegener Dis Manag* 2.
- Slow EJ, van Raamsdonk J, Rogers D, Coleman SH, Graham RK, Deng Y, Oh R, Bissada N, Hossain SM, Yang YZ, Li XJ, Simpson EM, Gutekunst CA, Leavitt BR, Hayden MR (2003) Selective striatal neuronal loss in a YAC128 mouse model of Huntington disease. *Hum Mol Genet* 12:1555–1567.
- Smart EJ, Ying YS, Donzell WC, Anderson RGW (1996) A role for caveolin in transport of cholesterol from endoplasmic reticulum to plasma membrane. *J Biol Chem* 271:29427–29435.
- Smith AD, Bolam JP (1990) The neural network of the basal ganglia as revealed by the study of synaptic connections of identified neurones. *Trends Neurosci* 13:259–265.
- Smith MR et al. (2014) A potent and selective Sirtuin 1 inhibitor alleviates pathology in multiple animal and cell models of Huntington's disease. *Hum Mol Genet* 23:2995–3007.
- Smith R, Chung H, Rundquist S, Maat-schieman MLC, Colgan L, Englund E, Liu Y, Roos RAC, Faull RLM, Brundin P, Li J (2006) Cholinergic neuronal defect without cell loss in Huntington's disease. *Hum Mol Genet* 15:3119–

- Snell RG, MacMillan JC, Cheadle JP, Fenton I, Lazarou LP, Davies P, MacDonald ME, Gusella JF, Harper PS, Shaw DJ (1993) Relationship between trinucleotide repeat expansion and phenotypic variation in Huntington's disease. *Nat Genet* 4:393–397.
- Song W, Chen J, Petrilli A, Liot G, Klinglmayr E, Zhou Y, Poquiz P, Tjong J, Pouladi MA, Hayden MR, Ellisman M, Rouiller I, Schwarzenbacher R, Bossy B, Perkins G, Bossy-wetzel E (2011) Mutant Huntingtin Binds the Mitochondrial Fission GTPase DRP1 and Increases its Enzymatic Activity. *Nat Med* 17:377–382.
- Sorbi S, Bird ED, Blass JP (1983) Decreased Pyruvate Dehydrogenase Complex Activity in Huntington and Alzheimer Brain. *Ann Neurol* 13:72–78.
- Sorolla MA, Reverter-branchat G, Tamarit J, Ferrer I, Ros J, Cabisco E (2008) Proteomic and oxidative stress analysis in human brain samples of Huntington disease. *Free Radic Biol Med* 45:667–678.
- Southwell AL, Khoshnan A, Dunn DE, Bugg CW, Lo DC, Patterson PH (2008) Intrabodies Binding the Proline-Rich Domains of Mutant Huntingtin Increase Its Turnover and Reduce Neurotoxicity. *J Neurosci* 28:9013–9020.
- Souto JA, Benedetti R, Otto K, Miceli M, Alvarez R, Altucci L, De Lera AR (2010) New Anacardic Acid-Inspired Benzamides : Histone Lysine acetyltransferase activators. *ChemMedChem* 5:1530–1540.
- Spargo E, Everall IP, Lantos PL (1993) Neuronal loss in the hippocampus in Huntington ' s disease : a comparison with HIV infection. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 56:487–491.
- Stanek LM, Yang W, Angus S, Sardi PS, Hayden MR, Hung GH, Bennet CF, Cheng SH, Shihabuddin LS (2013) Antisense oligonucleotide-mediated correction of transcriptional dysregulation is correlated with behavioral benefits in the YAC128 mouse model of Huntington's disease. *J Huntingtons Dis* 2:217–228.
- Stefanko DP, Shah VD, Yamasaki WK, Petzinger GM, Jakowec MW (2017) Treadmill exercise delays the onset of non-motor behaviors and striatal pathology in the CAG 140 knock-in mouse model of Huntington's disease. *Neurobiol Dis* 105:15–32.
- Steffan JS, Bodai L, Pallos J, Poelman M, Mccampbell A, Apostol BL, Kazantsev A, Schmidt E, Zhu Y, Greenwald M, Kurokawa R, Housman DE, Jackson GR, Marsh JL, Thompson LM (2001) Histone deacetylase inhibitors arrest polyglutamine-dependent neurodegeneration in *Drosophila*. *Nature* 413:739–743.
- Steffan JS, Kazantsev A, Spasic-Boskovic O, Greenwald M, Zhu Y-ZZ, Gohler H, Wanker EE, Bates GP, Housman DE, Thompson LM (2000) The Huntington's disease protein interacts with p53 and CREB-binding protein and represses transcription. *Proc Natl Acad Sci* 97:6763–6768.
- Stopper CM, Floresco SB (2011) Contributions of the nucleus accumbens and its subregions to different aspects of risk-based decision making. *Cogn Affect Behav Neurosci* 11:97–112.
- Stout JC, Paulsen JS, Queller S, Solomon AC, Whitlock KB, Campbell JC, Cariozzi N, Duff K, Beglinger LJ, Langbehn DR, Johnson SA, Biglan KM, Aylward EH, Group P-HI and coordinators of the HS group (2011) Neurocognitive Signs in Prodromal Huntington Disease. *Neuropsychology* 25:1–14.
- Suelves N, Kirkham-McCarthy L, Lahue RS, Ginés S (2017) A selective inhibitor of histone deacetylase 3 prevents cognitive deficits and suppresses striatal CAG repeat expansions in Huntington's disease mice. *Sci Rep* 7:1–15.
- Sun Y, Savanenin A, Reddy PH, Liu YF (2001) Polyglutamine-expanded Huntingtin Promotes Sensitization of N-Methyl-D-aspartate Receptors via Post-synaptic Density 95. *J Biol Chem* 276:24713–24718.
- Süssmuth SD et al. (2014) An exploratory double-blind, randomized clinical trial with selisistat, a SirT1 inhibitor , in patients with Huntington's disease. *Br J Clin Pharmacol* 79:465–476.
- Swami M, Hendricks AE, Gillis T, Massood T, Mysore J, Myers RH, Wheeler VC (2009) Somatic expansion of the Huntington's disease CAG repeat in the brain is associated with an earlier age of disease onset. *Hum Mol Genet* 18:3039–3047.



- Tabrizi SJ, Cleeter MWJ, Xuereb J, Taanman J, Cooper JM, Schapira AH V (1999) Biochemical Abnormalities and Excitotoxicity in Huntington's Disease Brain. *Ann Neurol* 45:25–32.
- Tabrizi SJ, Langbehn DR, Leavitt BR, Roos RAC, Durr A, Craufurd D, Kennard C, Hicks SL, Fox NC, Scahill RI, Tobin AJ, Rosas HD, Johnson H, Reilmann R, Landwehrmeyer B, Stout JC (2009) Biological and clinical manifestations of Huntington's disease in the longitudinal TRACK-HD study: cross-sectional analysis of baseline data. *Lancet Neurol* 8:791–801.
- Tabrizi SJ, Scahill RI, Owen G, Durr A, Leavitt BR, Roos RA, Borowsky B, Landwehrmeyer B, Frost C, Johnson H, Craufurd D, Reilmann R, Stout JC, Langbehn DR (2013) Predictors of phenotypic progression and disease onset in premanifest and early-stage Huntington's disease in the TRACK-HD study: Analysis of 36-month observational data. *Lancet Neurol* 12:637–649 Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(13\)70088-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(13)70088-7).
- Tabrizi SJ, Workman J, Hart PE, Mangiarini L, Mahal A, Bates G, Cooper JM, Schapira AH V (2000) Mitochondrial Dysfunction and Free Radical Damage in the Huntington R6/2 Transgenic Mouse. *Ann Neurol* 47:80–86.
- Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Brudno Y, Agarwal S, Iyer LM, David R, Aravind L, Rao A (2009) Conversion of 5-Methylcytosine to 5-Hydroxymethylcytosine in Mammalian DNA by MLL Partner TET1. *Science* (80-) 324:930–935.
- Takahashi H, McCaffery JM, Irizarry RA, Boeke JD (2006) Nucleocytoplasmic Acetyl-Coenzyme A Synthetase Is Required for Histone Acetylation and Global Transcription. *Mol Cell* 23:207–217.
- Takeuchi T, Nagai Y (2017) Protein misfolding and aggregation as a therapeutic target for polyglutamine diseases. *Brain Sci* 7:1–19.
- Tanaka SC, Balleine BW, O'Doherty JP (2008) Calculating consequences : Brain systems that encode the causal effects of actions. *J Neurosci* 28:6750–6755.
- Tanaka Y, Naruse I, Hongo T, Xu M, Nakahata T, Maekawa T, Ishii S (2000) Extensive brain hemorrhage and embryonic lethality in a mouse null mutant of CREB-binding protein. *Mech Dev* 95:133–145.
- Taylor JP, Taye AA, Campbell C, Kazemi-Esfarjani P, Fischbeck KH, Min KT (2003) Aberrant histone acetylation, altered transcription, and retinal degeneration in a *Drosophila* model of polyglutamine disease are rescued by CREB-binding protein. *Genes Dev* 17:1463–1468.
- Testa CM, Jankovic J (2019) Huntington disease : A quarter century of progress since the gene discovery. *J Neurol Sci* 396:52–68.
- Thakurela S, Sahu SK, Garding A, Tiwari VK (2015) Dynamics and function of distal regulatory elements during neurogenesis and neuroplasticity. *Genome Res*:1309–1324.
- The HD iPSCs Consortium (2012) Induced Pluripotent Stem Cells from Patients with Huntington's Disease Show CAG Repeat Expansion Associated Phenotypes. *Cell Stem Cell* 11:264–278.
- Thomas B, Matson S, Chopra V, Sun L, Sharma S, Hersch S, Rosas HD, Scherzer C, Ferrante R, Matson W (2013) A novel method for detecting 7-methyl guanine reveals aberrant methylation levels in Huntington disease. *Anal Biochem* 436:112–120.
- Thomas EA (2014) Involvement of HDAC1 and HDAC3 in the Pathology of Polyglutamine Disorders : Therapeutic Implications for Selective HDAC1/HDAC3 Inhibitors. *Pharmaceuticals* 7:634–661.
- Thomas EA, Coppola G, Desplats PA, Tang B, Soragni E, Burnett R, Gao F, Fitzgerald KM, Borok JF, Herman D, Geschwind DH, Gottesfeld JM (2008) The HDAC inhibitor 4b ameliorates the disease phenotype and transcriptional abnormalities in Huntington's disease transgenic mice. *PNAS* 105:15564–15569.
- Thompson LM et al. (2009) IKK phosphorylates Huntingtin and targets it for degradation by the proteasome and lysosome. *J Cell Biol* 187:1083–1099.

- Tippett LJ, Waldvogel HJ, Thomas SJ, Hogg VM, Roon-Mom W Van, Synek BJ, Graybiel AM, Faull RLM (2007) Striosomes and mood dysfunction in Huntington's disease. *Brain* 130:206–221.
- Tong Y, Ha TJ, Liu L, Nishimoto A, Reiner A, Goldowitz D (2011) Spatial and temporal requirements for huntingtin (Htt) in neuronal migration and survival during brain development. *J Neurosci* 31:14794–14799.
- Tousley A, Kegel-Gleason KB (2016) Induced pluripotent stem cells in huntington's disease research: Progress and opportunity. *J Huntingtons Dis* 5:99–131.
- Travessa A, Rodrigues FB, Mestre T, Ferreira JJ (2017) Fifteen Years of Clinical Trials in Huntington's Disease : A Very Low Clinical Drug Development Success Rate. *J Huntingtons Dis* 6:157–163.
- Tricomi E, Balleine BW, O'Doherty JP (2009) A specific role for posterior dorsolateral striatum in human habit learning. *Eur J Neurosci* 29:2225–2232.
- Trottier Y, Devys D, Imbert G, Saudou F, An I, Lutz Y, Weber C, Agid Y, Hirsch EC, Mandel JL (1995) Cellular localization of the Huntington's disease protein and discrimination of the normal and mutated form. *Nat Genet* 10:196–201.
- Trushina E, Singh RD, Dyer RB, Cao S, Shah VH, Parton RG, Pagano RE, McMurray CT (2006) Mutant huntingtin inhibits clathrin-independent endocytosis and causes accumulation of cholesterol in vitro and in vivo. *Hum Mol Genet* 15:3578–3591.
- Turmaine M, Raza A, Mahal A, Mangiarini L, Bates GP, Davies SW (2000) Nonapoptotic neurodegeneration in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *PNAS* 97:8093–8097.
- Twelvetrees AE, Yuen EY, Arancibia-carcamo IL, MacAskill AF, Rostaing P, Lumb MJ, Humbert S, Triller A, Saudou F, Yan Z, Kittler JT (2010) Delivery of GABA<sub>A</sub>Rs to synapses is mediated by HAP1-KIF5 and disrupted by mutant huntingtin. *Neuron* 65:53–65.

## -U-

- Unschuld PG, Liu X, Shanahan M, Margolis RL, Bassett SS, Brandt J, Schretlen DJ, Redgrave GW, Hua J, Hock C, Reading SA, van Zijl PCM, Pekar JJ, Ross CA (2013) Prefrontal executive function associated coupling relates to Huntington's disease stage. *Cortex* 49:2661–2673.

## -V-

- Valenza M, Chen JY, Di Paolo E, Ruozi B, Belletti D, Ferrari Bardile C, Leoni V, Caccia C, Brilli E, Di Donato S, Boido MM, Vercelli A, Vandelli MA, Forni F, Cepeda C, Levine MS, Tosi G, Cattaneo E (2015a) Cholesterol-loaded nanoparticles ameliorate synaptic and cognitive function in Huntington's disease mice. *EMBO Mol Med* 7:1547–1564.
- Valenza M, Leoni V, Karasinska JM, Petricca L, Fan J, Carroll J, Pouladi MA, Fossale E, Nguyen HP, Riess O, MacDonald M, Wellington C, DiDonato S, Hayden M, Cattaneo E (2010) Cholesterol defect is marked across multiple rodent models of Huntington's disease and is manifest in astrocytes. *J Neurosci* 30:10844–10850.
- Valenza M, Marullo M, Di Paolo E, Cesana E, Zuccato C, Biella G, Cattaneo E (2015b) Disruption of astrocyte-neuron cholesterol cross talk affects neuronal function in Huntington's disease. *Cell Death Differ* 22:690–702.
- Valenza M, Rigamonti D, Goffredo D, Zuccato C, Fenu S, Jamot L, Strand A, Tarditi A, Woodman B, Racchi M, Mariotti C, Di Donato S, Corsini A, Bates G, Pruss R, Olson JM, Sipione S, Tartari M, Cattaneo E (2005) Dysfunction of the cholesterol biosynthetic pathway in Huntington's disease. *J Neurosci* 25:9932–9939.

- Valor LM (2014) Transcription, Epigenetics and Ameliorative Strategies in Huntington's Disease: a Genome-Wide Perspective. *Mol Neurobiol* 51:406–423.
- Valor LM (2015) Epigenetic-based therapies in the preclinical and clinical treatment of Huntington's disease. *Int J Biochem Cell Biol* 67:45–48.
- Valor LM, Guiretti D, Lopez-atalaya JP, Barco A (2013) Genomic Landscape of Transcriptional and Epigenetic Dysregulation in Early Onset Polyglutamine Disease. *Neurobiol Dis* 33:10471–10482.
- Valor LM, Pulopulos MM, Jimenez-minchan M, Olivares R, Lutz B, Barco A (2011) Ablation of CBP in Forebrain Principal Neurons Causes Modest Memory and Transcriptional Defects and a Dramatic Reduction of Histone Acetylation But Does Not Affect Cell Viability. *J Neurosci* 31:1652–1663.
- Van Raamsdonk JM, Murphy Z, Slow EJ, Leavitt BR, Hayden MR (2005a) Selective degeneration and nuclear localization of mutant huntingtin in the YAC128 mouse model of Huntington disease. *Hum Mol Genet* 14:3823–3835.
- Van Raamsdonk JM, Pearson J, Rogers DA, Bissada N, Vogl AW, Hayden MR, Leavitt BR (2005b) Loss of wild-type huntingtin influences motor dysfunction and survival in the YAC128 mouse model of Huntington disease. *Hum Mol Genet* 14:1379–1392.
- Vashishtha M et al. (2013) Targeting H3K4 trimethylation in Huntington disease. *Proc Natl Acad Sci* 110:3027–3036.
- Veyrac A, Besnard A, Caboche J, Davis S, Laroche S (2014) The transcription factor Zif268/Egr1, brain plasticity and memory. In: *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, pp 89–129.
- Vidal RL, Figueroa A, Court FA, Thielen P, Molina C, Wirth C, Caballero B, Kiffin R, Segura-Aguilar J, Cuervo AM, Glimcher LH, Hetz C (2012) Targeting the UPR transcription factor XBP1 protects against Huntington's disease through the regulation of FoxO1 and autophagy. *Hum Mol Genet* 21:2245–2262.
- Vieira PA, Korzus E (2015) CBP-dependent memory consolidation in the prefrontal cortex supports object-location learning. *Hippocampus* 25:1532–1540.
- Vierbuchen T, Ling E, Cowley CJ, Couch CH, Wang X, Harmin DA, Roberts CWM, Greenberg ME (2017) AP-1 Transcription Factors and the BAF Complex Mediate Signal-Dependent Enhancer Selection. *Mol Cell* 68:1067–1082.
- Villar-Garea A, Esteller M (2004) Histone deacetylase inhibitors : Understanding a new wave of anticancer agents. *Int J Cancer* 178:171–178.
- Voermans NC, Petersson KM, Daudey L, Weber B, Van Spaendonck KP, Kremer HPH, Fernández G (2004) Interaction between the human hippocampus and the caudate nucleus during route recognition. *Neuron* 43:427–435.
- von Hörsten S et al. (2003) Transgenic rat model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet* 12:617–624.
- Vonsattel JP, Myers RH, Stevens TJ, Ferrante RJ, Bird ED, Richardson EP (1985) Neuropathological Classification of Huntington's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 44:559–577.

## -W-

- Waelter S, Boeddrich A, Lurz R, Scherzinger E, Lueder G, Lehrach H, Wanker EE (2001) Accumulation of Mutant Huntingtin Fragments in Aggresome-like Inclusion Bodies as a Result of Insufficient Protein Degradation. *Mol Biol Cell* 12:1393–1407.
- Walker DM et al. (2018) Cocaine Self-administration Alters Transcriptome-wide Responses in the Brain's Reward Circuitry. *Biol Psychiatry* 84:867–880 Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2018.04.009>.

- Wang F, Yang Y, Lin X, Wang J, Wu Y, Xie W, Wang D, Zhu S, Liao Y, Sun Q, Yang Y, Luo H, Guo C, Han C, Tang TS (2013) Genome-wide loss of 5-hmC is a novel epigenetic feature of Huntington's disease. *Hum Mol Genet* 22:3641–3653.
- Wang L, Schuster GU, Hultenby K, Zhang Q, Andersson S, Gustafsson J-A (2002) Liver X receptors in the central nervous system: From lipid homeostasis to neuronal degeneration. *Proc Natl Acad Sci* 99:13878–13883.
- Warby SC, Doty CN, Graham RK, Carroll JB, Yang YZ, Singaraja RR, Overall CM, Hayden MR (2008) Activated caspase-6 and caspase-6-cleaved fragments of huntingtin specifically colocalize in the nucleus. *Hum Mol Genet* 17:2390–2404.
- Wei W, Coelho CM, Li X, Marek R, Yan S, Anderson S, Meyers D, Mukherjee C, Sbardella G, Castellano S, Milite C, Rotili D, Mai A, Cole PA, Sah P, Kobor MS, Bredy TW (2012) p300/CBP-Associated Factor Selectively Regulates the Extinction of Conditioned Fear. *J Neurosci* 32:11930–11941.
- Wellen KE, Hatzivassiliou G, Sachdeva UM, Bui T V, Cross JR, Thompson CB (2009) ATP-citrate lyase links cellular metabolism to histone acetylation. *Science* (80- ) 324:1076–1080.
- Wellington CL, Ellerby LM, Gutekunst C-A, Rogers D, Warby S, Graham RK, Loubser O, van Raamsdonk J, Singaraja R, Yang Y-Z, Gafni J, Bredesen D, Hersch SM, Leavitt BR, Roy S, Nicholson DW, Hayden MR (2002) Caspase Cleavage of Mutant Huntingtin Precedes Neurodegeneration in Huntington's Disease. *J Neurosci* 22:7862–7872.
- Wexler NS (2004) Venezuelan kindreds reveal that genetic and environmental factors modulate Huntington's disease. *Hum Mol Genet* 13:101–109.
- Wheeler VC, Auerbach W, White JK, Srinidhi J, Auerbach A, Ryan A, Duyao MP, Vrbancic V, Weaver M, Gusella JF, Joyner AL, MacDonald ME (1999) Length-dependent gametic CAG repeat instability in the Huntington's disease knock-in mouse. *Hum Mol Genet* 8:115–122.
- Wheeler VC, Gutekunst CA, Vrbancic V, Lebel LA, Schilling G, Hersch S, Friedlander RM, Gusella JF, Vonsattel JP, Borchelt DR, MacDonald ME (2002) Early phenotypes that presage late-onset neurodegenerative disease allow testing of modifiers in Hdh CAG knock-in mice. *Hum Mol Genet* 11:633–640.
- Wheeler VC, Persichetti F, McNeil SM, Mysore JS, Mysore SS, MacDonald ME, Myers RH, Gusella JF, Wexler NS (2007) Factors associated with HD CAG repeat instability in Huntington disease. *J Med Genet* 44:695–701.
- Wheeler VC, White JK, Gutekunst C, Vrbancic V, Weaver M, Li X, Li S, Yi H, Vonsattel J, Gusella JF, Hersch S, Auerbach W, Joyner AL, MacDonald ME (2000) Long glutamine tracts cause nuclear localization of a novel form of huntingtin in medium spiny striatal neurons in Hdh Q92 and Hdh Q111 knock-in mice. *Hum Mol Genet* 9:503–514.
- White JK, Auerbach W, Duyao MP, Vonsattel J-P, Gusella JF, Joyner AL, MacDonald ME (1997) Huntingtin is required for neurogenesis and is not impaired by the Huntington's disease CAG expansion. *Nat Genet* 17:404–410.
- Wictorin K (1992) Anatomy and connectivity of intrastriatal striatal transplants. *Prog Neurobiol* 38:611–639.
- Wild EJ, Tabrizi SJ (2017) Therapies targeting DNA and RNA in Huntington's disease. *Lancet Neurol* 16:837–847.
- Wilson H, De Micco R, Niccolini F, Politis M (2017) Molecular imaging markers to track Huntington's disease pathology. *Front Neurol* 8:1–11.
- Woldemichael BT, Mansuy IM (2016) Micro-RNAs in cognition and cognitive disorders: Potential for novel biomarkers and therapeutics. *Biochem Pharmacol* 104:1–7.
- Wong YC, Holzbaur ELF (2014) The Regulation of Autophagosome Dynamics by Huntingtin and HAP1 Is Disrupted by Expression of Mutant Huntingtin, Leading to Defective Cargo Degradation. *Neurobiol Dis* 34:1293–1305.
- Wood MA, Attner MA, Oliveira AMM, Brindle PK, Abel T (2006) A transcription factor-binding domain of the coactivator CBP is essential for long-term memory and the expression of specific target genes. *Learn Mem* 13:609–617.

## -X-

- Xu WS, Parmigiani RB, Marks PA (2007) Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. *Oncogene* 26:5541–5552.
- Xu X, Tay Y, Sim B, Yoon SI, Huang Y, Ooi J, Utami KH, Ziaei A, Ng B, Radulescu C, Low D, Ng AYJ, Loh M, Venkatesh B, Ginhoux F, Augustine GJ, Pouladi MA (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.

## -Y-

- Yablonska S, Ganesan V, Ferrando LM, Kim J, Pyzel A, Baranova O V, Khattar NK, Larkin TM, Baranov S V, Chen N, Strohle CE, Stevens DA, Wang X, Chang YF, Schurdak ME, Carlisle DL, Minden JS, Friedlander RM (2019) Mutant huntingtin disrupts mitochondrial proteostasis by interacting with TIM23. *PNAS*:1–10.
- Yang S, Chang R, Yang H, Zhao T, Hong Y, Kong HE, Sun X, Qin Z, Jin P, Li S, Li X (2017) CRISPR/Cas9-mediated gene editing ameliorates neurotoxicity in mouse model of Huntington's disease. *J Clin Invest* 127:2719–2724.
- Yano H, Baranov S V, Baranova O V, Kim J, Pan Y, Yablonska S, Carlisle DL, Ferrante RJ, Kim AH, Friedlander RM (2014) Inhibition of mitochondrial protein import by mutant huntingtin. *Nat Neurosci* 17:822–831.
- Yao T, Oh SP, Fuchs M, Zhou N, Ch'ng L, Newsome D, Bronson RT, Li E, Livingston DM, Eckner R (1998) Gene Dosage – Dependent Embryonic Development and Proliferation Defects in Mice Lacking the Transcriptional Integrator p300. *Cell* 93:361–372.
- Yao Y, Cui X, Al-Ramahi I, Sun X, Li B, Hou J, Difiglia M, Palacino J, Wu ZY, Ma L, Botas J, Lu B (2015) A striatal-enriched intronic GPCR modulates huntingtin levels and toxicity. *Elife*:1–19.
- Yap EL, Greenberg ME (2018) Activity-Regulated Transcription: Bridging the Gap between Neural Activity and Behavior. *Neuron* 100:330–348.
- Yhnell E, Dunnett SB, Brooks SP (2015) The utilisation of operant delayed matching and non-matching to position for probing cognitive flexibility and working memory in mouse models of Huntington's disease. *J Neurosci Methods*.
- Yin HH, Knowlton BJ, Balleine BW (2004) Lesions of dorsolateral striatum preserve outcome expectancy but disrupt habit formation in instrumental learning. *Eur J Neurosci* 19:181–189.
- Yin HH, Ostlund SB, Knowlton BJ, Balleine BW (2005) The role of the dorsal striatum in instrumental conditioning. *Eur J Neurosci* 22:513–523.
- Yoshidas M, Kijima M, Akita M, Beppu T (1990) Potent and Specific Inhibition of Mammalian in Vivo and in Vitro by Trichostatin A. *J Biol Chem* 265:17174–17179.
- Yu-Taeger L, Bonin M, Stricker-Shaver J, Riess O, Nguyen HHP (2017) Dysregulation of gene expression in the striatum of BACHD rats expressing full-length mutant huntingtin and associated abnormalities on molecular and protein levels. *Neuropharmacology* 117:260–272.
- Yu-Taeger L, Petrasch-Parwez E, Osmand AP, Redensek A, Metzger S, Clemens LE, Park L, Howland D, Calaminus C, Gu X, Pichler B, Yang XW, Riess O, Nguyen HP (2012) A Novel BACHD Transgenic Rat Exhibits Characteristic Neuropathological Features of Huntington Disease. *J Neurosci* 32:15426–15438.
- Yu C, Li CH, Chen S, Yoo H, Qin X, Park H (2018) Decreased BDNF Release in Decreased BDNF Release in Cortical Neurons of a Knock-in Mouse Model of Huntington's Disease. *Sci Rep* 8:1–11.
- Yu G, Wang L, Han Y, He Q (2012) ClusterProfiler: an R Package for Comparing Biological Themes Among Genes Clusters. *OMICS* 16:284–287.

Yu Z-X, Li S-H, Evans J, Pillarisetti A, Li H, Li X-J (2003) Mutant Huntingtin Causes Context-Dependent Neurodegeneration in Mice with Huntington's Disease. *J Neurosci* 23:2193–2202.

## -Z-

Zádori D, Geisz A, Vámos E, Vécsei L, Klivényi P (2009) Valproate ameliorates the survival and the motor performance in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Pharmacol Behav* 94:148–153.

Zahm D, Heimer L (1990) Two Transpallidal Pathways Originating in the Rat Nucleus Accumbens. *J Comp Neurol* 302:437–446.

Zeitler B et al. (2019) Allele-selective transcriptional repression of mutant HTT for the treatment of Huntington's disease. *Nat Med* 25:1131–1142.

Zeitlin S, Liu J, Chapman DL, Papaioannou VE, Efstratiadis A (1995) Increased apoptosis and early embryonic lethality in mice nullizygous for the Huntington's disease gene homologue. *Nat Genet* 11:155–163.

Zhang J, Liu Q (2015) Cholesterol metabolism and homeostasis in the brain. *Protein Cell* 6:254–264.

Zhang N, An MC, Montoro D, Ellerby LM (2010) Characterization of human Huntington's disease cell model from induced pluripotent stem cells. *PLoS Curr*:1–11.

Zhang Y, Leavitt BR, Van Raamsdonk JM, Dragatsis I, Goldowitz D, MacDonald ME, Hayden MR, Friedlander RM (2006) Huntingtin inhibits caspase-3 activation. *EMBO J* 25:5896–5906.

Zheng J, Winderickx J, Franssens V, Liu B (2018) A Mitochondria-Associated Oxidative Stress Perspective on Huntington's Disease. *Front Mol Neurosci* 11:1–10.

Zhou M, Parr RD, Petrescu AD, Payne HR, Atshaves BP, Kier AB, Ball JM, Schroeder F (2004) Sterol carrier protein-2 directly interacts with caveolin-1 in vitro and in vivo. *Biochemistry* 43:7288–7306.

Zourlidou A, Gidalevitz T, Kristiansen M, Landles C, Woodman B, Wells DJ, Latchman DS, Belleruche J De, Tabrizi SJ, Morimoto RI, Bates GP (2007) Hsp27 overexpression in the R6/2 mouse model of Huntington's disease : chronic neurodegeneration does not induce Hsp27 activation. *Hum Mol Genet* 16:1078–1090.

Zovkic IB, Guzman-karlsson MC, Sweatt JD (2013) Epigenetic regulation of memory formation and maintenance. *Learning*:61–74.

Zuccato C, Cattaneo E (2007) Role of brain-derived neurotrophic factor in Huntington's disease. *Prog Neurobiol* 81:294–330.

Zuccato C, Ciammola A, Rigamonti D, Leavitt BR, Goffredo D, Conti L, MacDonald ME, Friedlander RM, Silani V, Hayden MR, Timmusk T, Sipione S, Cattaneo E (2001) Loss of huntingtin-mediated BDNF gene transcription in Huntington's disease. *Science* (80- ) 293:493–498.

Zuccato C, Liber D, Ramos C, Tarditi A, Rigamonti D, Tartari M, Valenza M, Cattaneo E (2005) Progressive loss of BDNF in a mouse model of Huntington's disease and rescue by BDNF delivery. *Pharmacol Res* 52:133–139.

Zuccato C, Tartari M, Crotti A, Goffredo D, Valenza M, Conti L, Cataudella T, Leavitt BR, Hayden MR, Timmusk T, Rigamonti D, Cattaneo E (2003) Huntingtin interacts with REST/NRSF to modulate the transcription of NRSE-controlled neuronal genes. *Nat Genet* 35:76–83.







## Rôle des altérations transcriptionnelles et épigénétiques dans les déficits comportementaux de la maladie de Huntington

### Résumé

La maladie de Huntington (MH) est une maladie neurodégénérative génétique, caractérisée par des symptômes moteurs, cognitifs et psychiatriques. Ces troubles s'accompagnent de dérégulations transcriptionnelles et épigénétiques touchant préférentiellement le striatum. La relation de cause à effet qui lie ces dysfonctionnements aux déficits comportementaux est encore mal comprise et sa caractérisation constitue l'objectif de ma thèse. Nous avons observé que la mémoire procédurale dépendante du striatum, est progressivement altérée chez les souris R6/1 modèles de la MH. Ce déficit est partiellement compensé par l'utilisation d'une mémoire spatiale hippocampo-dépendante. Par ailleurs, nos données transcriptomiques montrent que le déficit de mémoire procédurale des souris R6/1 est corrélé à une altération des régulations transcriptionnelles striatales induites par l'apprentissage procédural et particulièrement de l'activation de gènes précoces immédiats essentiels aux processus de plasticité neuronale. Pour tenter de corriger ces altérations, les souris R6/1 ont été traitées pharmacologiquement avec l'activateur d'histone acétyltransférase CSP-TTK21, afin d'améliorer l'acétylation des histones et l'activation des gènes de plasticité et de mémoire du striatum. Nous avons observé une amélioration partielle de la mémoire procédurale des souris R6/1. De manière inattendue, nos analyses indiquent que ce bénéfice est associé à des changements transcriptomiques et épigénétiques affectant plus particulièrement les cellules gliales, et favorisant le métabolisme du cholestérol. Ainsi, nos analyses permettent pour la première fois de définir avec précision la relation qui lie les altérations épigénétiques, transcriptionnelles et comportementales associées à la MH.

**Mots clés :** Maladie de Huntington, mémoire procédurale, striatum, transcriptome induit par l'apprentissage, acétylation des histones, métabolisme du cholestérol

### Summary

Huntington's disease (HD) is a genetic neurodegenerative disease, characterized by motor, cognitive and psychiatric alterations. These symptoms are associated with transcriptional and epigenetic dysregulations, predominantly in the striatum. The causal relationship between those molecular dysfunctions and behavioral deficits is still poorly understood and its characterization is the objective of my thesis. We observed a progressive striatum-dependent procedural memory deficit in the R6/1 HD mouse, which is partially compensated by hippocampus-dependent spatial memory. Moreover, our transcriptomic data show that the procedural memory deficit of R6/1 mice is correlates with altered learning-induced transcriptome in the striatum. Particularly, the expression of immediate early genes involved in neuronal plasticity is impaired. To prevent these alterations, R6/1 mice were treated with the histone acetyltransferase activator CSP-TTK21, to enhance histone acetylation and the activation of memory and plasticity genes in HD striatum. We observed partial improvement of procedural memory deficit of R6/1 mice. Surprisingly, the treatment induces transcriptomics and epigenetics changes, more particularly in glial cells, and improves cholesterol metabolism. Thus, our analyzes give insights into the relationship between the epigenetic, transcriptional and behavioral alterations in HD.

**Keywords :** Huntington's disease, procedural memory, striatum, learning-induced transcriptome, histones acetylation, cholesterol metabolism