



HAL
open science

IRM multiparamétrique pour la recherche de biomarqueurs précoces des maladies par expansion de polyglutamine

Jean-Baptiste Pérot

► **To cite this version:**

Jean-Baptiste Pérot. IRM multiparamétrique pour la recherche de biomarqueurs précoces des maladies par expansion de polyglutamine. Neurosciences. Université Paris-Saclay, 2021. Français. NNT : 2021UPASL074 . tel-03483657

HAL Id: tel-03483657

<https://theses.hal.science/tel-03483657>

Submitted on 16 Dec 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.

IRM multiparamétrique pour la recherche
de biomarqueurs précoces des maladies
par expansion de polyglutamine
Multiparametric MRI for the research of early biomarkers in
polyglutamine diseases

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n° 568 :
Signalisation et Réseaux Intégratifs en Biologie (Biosigne)

Spécialité de doctorat : Recherche clinique, innovation technologique, santé
publique

Unité de recherche : Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, Laboratoire des Maladies
Neurodégénératives : mécanismes, thérapies, imagerie, 92265, Fontenay-aux-Roses

Réfèrent : Faculté de médecine

Thèse présentée et soutenue à Paris-Saclay, le 22/10/2021, par

Jean-Baptiste PEROT

Composition du Jury

Vincent LEBON

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier,
Université Paris-Saclay

Président

Sandrine BETUING

Professeure, Sorbonne Université

Rapporteuse &
Examinatrice

Laura HARSAN

Maître de Conférences des Universités – Praticien
Hospitalier, Université de Strasbourg

Rapporteuse &
Examinatrice

Fanny MOCHEL

Maître de Conférences des Universités – Praticien
Hospitalier, Sorbonne Université

Examinatrice

David BLUM

Directeur de recherche, INSERM, Université de Lille

Examineur

Emmanuel BROUILLET

Directeur de recherche, CNRS

Directeur de thèse

Julien FLAMENT

Ingénieur-chercheur, CEA

Co-encadrant

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury pour le temps qu'ils m'ont consacré. En particulier, un grand merci à Laura Harsan et Sandrine Betuing pour leur travail de rapporteuses de mon manuscrit de thèse. Je remercie également Vincent Lebon, David Blum et Fanny Mochel pour avoir accepté d'être examinateurs lors de la soutenance.

Merci également à tous les partenaires du projet TreatPolyQ, mené par Hoa Nguyen, avec qui j'ai beaucoup aimé travailler et avec qui j'ai beaucoup appris. En particulier, je souhaite remercier Yvon Trottier et Anna Niewiadomska qui ont largement contribué à la troisième étude présentée dans ce manuscrit, et dont la réflexion sur les maladies PolyQ m'a toujours beaucoup apporté. Je remercie aussi Maciej Figiel et son équipe pour la collaboration sur le modèle SCA3 et pour l'invitation à Poznan.

J'exprime également ma gratitude envers Sandrine Humbert et Luisa Ciobanu pour leur implication dans mon comité annuel de thèse, à la fin de la première et de la deuxième année. Ces dernières ont été d'excellent conseil quant à la suite de ma thèse et l'expérience a toujours été enrichissante.

Ces trois années de thèse sont passées à une vitesse folle. J'ai la sensation de m'être vraiment épanoui durant ces années, à travers mon projet et l'environnement exceptionnel dans lequel s'est déroulé cette thèse. Mon passage à MIRcen m'a permis de rencontrer des personnes formidables. Certaines sont devenues des amis durables, beaucoup m'ont permis d'apprendre énormément, toutes ont été d'une bienveillance rare, qui a permis au jeune homme timide que j'étais il y a 3 ans de prendre confiance en lui. Je ne sais pas si je peux vous remercier assez pour ces bons moments. Je vais cependant faire de mon mieux pour vous exprimer à tous et toutes mes remerciements à la hauteur de ma gratitude.

La première personne que je souhaite remercier est évidemment Julien Flament. Merci pour m'avoir donné l'opportunité d'effectuer cette thèse et pour la confiance que tu m'as accordé tout au long de celle-ci. Tu as toujours été d'une disponibilité exemplaire lorsque j'avais besoin d'aide, à l'écoute de mes suggestions et de mes idées, tout en sachant me guider. J'aurais aimé présenter nos résultats à Sydney et à Vancouver mais le sort en a décidé autrement. Malgré cela, grâce à ton encadrement j'ai la sensation d'avoir tiré le maximum de ma thèse. Je pense que nous avons formé une très bonne équipe et j'espère sincèrement avoir l'occasion de travailler avec toi à nouveau !

Je veux aussi bien entendu remercier Emmanuel Brouillet pour ta confiance et tes conseils. Cet encadrement à deux têtes a rendu cette thèse passionnante, avec les conseils de Julien en IRM et les tiens pour tout ce qui concerne la biologie de la maladie de Huntington. Ton expérience et ta passion évidente pour ta recherche font de chaque conversation avec toi un régal. Lors de la soirée de lancement du projet, tu m'as dit que nous allions faire « de grandes choses ensemble ». Cette expression (un soupçon pompeuse avouons-le) peut sembler ridicule. Après tout, ce n'est pas comme si nous avions guéri Huntington. Cependant, je pense que ce travail de thèse apporte une contribution, aussi maigre soit-elle, à la compréhension de la maladie et ainsi fait un pas vers un traitement attendu pas des milliers de patients. Alors peut-être pouvons-nous nous vanter d'avoir fait de grandes choses.

Je remercie également Julien Valette pour l'aide qu'il m'a apporté tout au long de cette thèse par ses conseils avisés lors des réunions d'équipe ou au détour d'un couloir. Je retiendrai aussi nos discussions sur la SF autour d'une bière après l'ISMRM en virtuel. Travailler dans l'équipe IRM, c'est s'intégrer dans un environnement stimulant, où chaque conversation nous apprend quelque chose. Céline Baligand y est aussi pour quelque chose. Merci pour le partage de tes connaissances, pour ta disponibilité et ton aide à la paillasse. Toujours prête à mettre la main à la pâte ! Enfin, merci pour ton humour pétillant, qui a transformé nombre de cafés en fou rires ! Au plaisir de reprendre une bière avec vous deux chez Cédric, je ne devrais pas avoir trop de mal à vous y trouver.

Un grand merci à l'équipe 2, Gilles, Karine, Géraldine, Alexis, Anselme, Maria, Marie-Claude, Gwen, pour m'avoir intégré dans vos réunions d'équipe. J'ai énormément appris lors de ces réunions et vos remarques avec un point de vue différent ont permis de tirer le meilleur de mon travail ! En particulier, merci à Géraldine et Marie-Claude pour tout le temps consacré à m'enseigner le Western Blot et la RT-qPCR. Il a dû falloir beaucoup de patience pour me montrer 10 fois la même chose et répondre à mes questions incessantes mais grâce à vous je peux me vanter aujourd'hui d'être (un petit peu) biologiste ! De même, je remercie sincèrement Fanny P., Pauline G. et Caro pour m'avoir appris l'histo, et pour s'être occupées de mes dernières immunos pendant que je rédigeais.

Il y a une personne que je ne pourrai pas assez remercier pour tout ce qu'elle a fait pour moi. Cette personne c'est Gwen. Mille mercis pour ton aide INESTIMABLE sur la gestion de la colonie de rats, de la repro aux sacrifices, le sevrage, l'identification, les injections, les soins, les commandes, tout. Sans toi je pense que je n'aurais jamais réussi cette étude. Merci pour tes conseils sur tout le reste également, et bien sûr pour toutes nos discussions lors des repas. Merci également à Martine, Mylène et Sueva pour leur aide sur les injections. Merci Julien M. pour ton aide sur les colonies et pour m'avoir montré le comportement.

Merci à Marc pour ton aide sur l'imagerie ex-vivo et sur Sammba. Merci Carole pour ta confiance et la collaboration sur les souris zQ175. Merci Karine pour tes conseils sur le comportement. Merci Luc pour ton aide à préparer les colis. Merci Nico pour ton aide sur Python. Merci Sonia pour tes conseils sur les post-docs. Merci Emilie pour ton aide sur les Western Blots. Merci Kristell, Laurent, Chrysis de vous occuper de notre sécurité au quotidien. Merci au personnel d'entretien grâce à qui j'ai travaillé dans un environnement propre tous les jours.

Si je suis extrêmement reconnaissant envers toutes les personnes citées ci-dessus, la raison principale de mon épanouissement dans ce laboratoire tient surtout dans les relations entre doctorants. Je ne peux imaginer meilleure ambiance de travail que ce joyeux bordel où pauses café, PMU, soirées, brunchs, raclettes, Among Us, et j'en passe, s'organisent avec beaucoup plus d'efficacité que les manipes. J'ai vécu mes années ici entouré d'amis, avec qui nous avons partagé des rires, des doutes, des bonnes nouvelles, des moins bonnes. Toujours à veiller les uns sur les autres, toujours prêts à fêter ce qui doit l'être. MERCI pour tous ces rires, ces discussions, ces débats, qui m'ont donné le sourire et l'envie d'aller travailler tous les matins pendant 3 ans.

Commençons par le pigeonier 110. La fine équipe de mon début de thèse : Clément, Mélissa, Suzanne, Marina, Yohann et moi. Merci Clément pour ton humour bien perché, pour m'avoir appris Sammba, pour les débats cantine. J'espère pouvoir rencontrer ton chien un de ces jours ! Mélissa, comment te remercier assez pour tout ce que tu m'as appris, mais surtout pour m'avoir motivé à m'impliquer dans l'ACTIF, à faire une mission de conseil, à faire du sport, etc. Ton implication, ton

excellence sont une source d'inspiration. Et pourtant tu sais rester simple et c'est avec plaisir que je passerai par Rennes pour reparler du bon vieux temps, des PMU et de nos chats ! Marina, ma chère Marina. Si je devais parier sur qui du labo obtiendra un prix Nobel, ce serait toi. Je suis tellement reconnaissant d'avoir pu travailler avec toi. Tu es brillante, travailleuse, énergique, toujours de bonne humeur. Et bientôt maman !! J'aurais eu peur pour n'importe qui d'autre pour la fin de sa thèse mais tu vas gérer j'en suis certain et on entendra parler de toi ! Tant que tu as du coca ... Yohann, mon compère, camarade dans la thèse. J'ai perdu patience plus d'une fois face à tes blagues douteuses, et pourtant elles me manqueront. Nos glandouilles (Julien arrête de lire ici) de fin de journées, nos repas à l'IRM, nos grands questionnements (c'est - - + ou + - - ??) aussi. Mais on se retrouvera pour les après-midi au parc (il faut que je m'améliore au jonglage !) et en soirée ! Enfin merci Suzanne pour nous avoir fait rire avec tes microcèbes, pour finir nos repas, pour ta bonne humeur en général. Merci maintenant à la nouvelle génération du bureau 110, Rodrigo, Eloïse, Sophie et Amélie. Bon courage pour la fin de votre thèse et de votre post-doc ! Merci Amélie pour ton aide sur le parcours de physique médical.

Plus on est de fous plus on rit, et j'ai vite compris au cours de ma thèse que pour m'éclater au maximum il allait falloir sortir du R+1 et s'intégrer aussi avec les biologistes (lire ça avec un ton de dédain) du R+2. Merci PA, Océ, Charlotte, Nyfa pour m'avoir presque adopté dans votre bureau. PA, mon faux frère jumeau du côté obscur, le 4^e enfant Pérot, merci pour tous tes conseils, dans la thèse mais surtout de fin psychologue, expert en relations. Merci aussi pour le nouveau record battu de soirées toutes les semaines en début d'année, c'était vraiment des bons moments. Bravo pour ton poste, j'espère que tu vas t'éclater ! De toute façon il ne se passe pas une semaine sans qu'on prenne un verre donc j'aurai des nouvelles je ne m'inquiète pas ! Fanny, merci pour tes délires qui m'ont tué de rire plus d'une fois. Merci pour tes conseils sur la rédaction et la soutenance, tu es un peu devenue ma référente rédaction ! Il faut dire que ton travail a été exemplaire. Mais surtout, un grand merci pour avoir veillé sur chacun de nous tous avec peut-être encore plus de ferveur que les autres, pour ton implication dans les vidéos de thèse, pour être toujours la petite voix qui n'oublie personne, qui empêche de blesser, qui reconforte. Je te souhaite tout le bonheur que tu mérites dans ton nouvel appartement.

Miriam, la tortilla, la touche exotique de ce laboratoire. Merci pour avoir essayé de m'apprendre 3 mots d'espagnol dans nos soirées arrosées (El que no apoya, no folla). Merci pour ton aide avec l'ACTIF, pour l'amélioration de mon niveau d'anglais grâce à nos conversations à la cantine, pour ta bonne humeur générale. Bon courage pour la fin de ta thèse !

Maintenant je remercie mais surtout je souhaite bon courage à la relève, Amélie, Sophie, Pauline, Mathilde. Mathilde, la relève de la recherche sur Huntington, merci pour ta carte postale ! J'ai été vraiment touché. J'ai hâte que tu fasses ta crémaillère, et j'espère qu'on ira visiter le Portugal l'an prochain ! En attendant bon courage pour tes manipes et désolé si tu dois lire mon manuscrit ! Pauline, je suis ravi que tu n'aies pas été renvoyée au milieu de ton stage. Cette année aurait été moins drôle et intéressante sans nos pauses à rallonge en début d'année, à manger, jouer avec Wall-E, faire un bonhomme de neige (Jack-Jack !), etc. J'ai adoré les soirées jeu à boire Koh-Lanta/B99! Bon courage pour la suite, je suis sûr que ta thèse va être incroyable ! Je me fais pas trop de soucis pour avoir de tes nouvelles...

Enfin merci à tous ceux que j'ai moins côtoyé mais qui ont participé d'une façon ou d'une autre à rendre mon séjour ici agréable, Emma, Sébastien, Thibault, Huaqian, Sarah, Audrey, Lucile ainsi que les anciens doctorants Clémence, Camille, Audrey, Anastasie, Lucie, Francesco.

Pour finir, j'aimerais exprimer ma gratitude envers tous mes proches qui m'ont toujours soutenu. Merci à tous mes amis Quentin, Martin, Pierre, Adrien, Alexis, Estelle, Jordan, Hadrien pour l'oreille attentive que vous avez su prêter et votre enthousiasme quand je parle de ma thèse. Merci à ma famille, mon frère Mathis, qui aujourd'hui débute ses études supérieures au moment où je les termine. Bon courage, tu vas voir c'est bien mais c'est long ! Eclate-toi bien à Toulouse. Lucile, ma très chère sœur, je suis vraiment heureux que tu sois venue habiter chez moi. Merci pour tous les fous rires de ces quelques mois de coloc, pour le marathon des soirées avec PA, pour tes conseils avisés en séduction. Mon vœu le plus cher est que tu retrouves une bonne santé, et que tu puisses t'éclater aux Bermudes. A mes parents, merci pour tout. Merci pour votre soutien indéfectible pendant toutes ces années, aussi bien en thèse que durant mes années à Montréal. Vous m'avez toujours fait confiance, et si j'aurais pu vous décevoir vous n'avez affiché que bienveillance et encouragements jusqu'à ce que je remonte la pente. Le succès de ma thèse est le vôtre. Vous rendre fiers est un bonheur. Je vous aime.

A mes grands-parents, je vous dédie cette thèse. Je suis reconnaissant d'avoir la chance de pouvoir profiter encore aujourd'hui de grands-parents aussi jeunes, au moins dans leur tête. Vous portez les valeurs qui me définissent. Vous avez toujours montré de l'intérêt pour mon travail. Même si je dois souvent réexpliquer la même chose, chacune de nos conversations est un bonheur. En particulier, je suis très fier du travail accompli pour rédiger les mémoires de Papy Bert. J'espère que vous pourrez assister à ma soutenance. Ensuite j'ai hâte de revenir passer des moments au calme à Cagny.

Table des matières

Abréviations	11
Introduction générale.....	13
Chapitre I : Les maladies par expansion de polyglutamine.....	17
I.1. Cause et principales maladies	17
I.2. La maladie de Huntington	18
I.2.a Transmission.....	18
I.2.b Signes cliniques.....	19
I.2.b.i. Symptômes moteurs	19
I.2.b.ii. Symptômes cognitifs	20
I.2.b.iii. Symptômes psychiatriques.....	21
I.3. L'Ataxie spinocérébelleuse de type 7.....	22
I.3.a Transmission.....	22
I.3.b Signes cliniques.....	22
Chapitre II : Stratégies de thérapies géniques des maladies à PolyQ.....	25
II.1. Oligonucléotides Antisens.....	26
II.2. Interférence par ARN.....	27
II.3. CRISPR-Cas9.....	28
Chapitre III : Pathogénèse de la MH.....	31
III.1. Anatomopathologie.....	31
III.1.a Circuits striataux.....	31
III.1.b Altérations dans la MH.....	33
III.2. Physiopathologie	34
III.2.a Perte de fonction de la HTT.....	35
III.2.a.i. Transport axonal.....	35
III.2.a.ii. Division cellulaire.....	36
III.2.a.iii. Ciliogénèse.....	36
III.2.a.iv. Autophagie	37
III.2.a.v. Transcription.....	37
III.2.a.vi. Endocytose	37
III.2.b Toxicité de la HTTm	37
III.2.b.i. Agrégation	37
III.2.b.ii. Voies de signalisations.....	38
III.2.b.iii. Atteintes métaboliques	39

III.2.c	Rôle des cellules gliales	40
III.2.c.i.	Astrocytes	41
III.2.c.ii.	Microglies	42
III.2.c.iii.	Oligodendrocytes	42
III.3.	Vulnérabilité de la matière blanche	43
III.4.	Hypothèse développementale	45
Chapitre IV	: Modèles animaux des maladies à PolyQ	47
IV.1.	Les modèles de la MH	48
IV.1.a	Modèles transgéniques de la MH.....	48
IV.1.a.i.	Le modèle souris R6/1	49
IV.1.a.ii.	Le modèle souris R6/2	49
IV.1.a.iii.	Le modèle souris N171-82Q	50
IV.1.b	Modèles knock-in de la MH.....	52
IV.1.b.i.	Le modèle souris CAG140.....	52
IV.1.b.ii.	Le modèle souris zQ175	53
IV.1.c	Modèles exprimant la Huntingtine entière par chromosome artificiel	54
IV.1.c.i.	Le modèle souris YAC128	54
IV.1.c.ii.	Le modèle rat BACHD	55
IV.2.	Le modèle SCA7 ^{140Q/5Q}	58
Chapitre V	: Imagerie par Résonance Magnétique	61
V.1.	Phénomène de résonance magnétique	61
V.1.a	Aimantation des tissus biologiques.....	61
V.1.b	Détection de l'aimantation.....	62
V.2.	Imagerie par Résonance Magnétique	64
V.2.a	Localisation du signal.....	64
V.2.b	Imageries pondérée T ₁ et T ₂	64
V.2.c	Imagerie pondérée T ₂ *	66
V.3.	Modalités d'IRM	67
V.3.a	Imagerie de diffusion.....	67
V.3.a.i.	Imagerie pondérée en diffusion.....	67
V.3.a.ii.	Imagerie du tenseur de diffusion	67
V.3.a.iii.	Paramètres mesurables en imagerie du tenseur de diffusion	68
V.3.b	Spectroscopie RMN	69
V.3.b.i.	Acquisition de spectres RMN	69
V.3.b.ii.	Métabolites mesurables en spectroscopie RMN	70

V.3.c	Imagerie CEST & MT	71
V.3.c.i.	Imagerie CEST	71
V.3.c.ii.	Imagerie MT	74
V.3.c.iii.	Molécules détectables en imagerie CEST et MT	74
V.3.d	Imagerie par résonance magnétique fonctionnelle	75
V.3.d.i.	Imagerie BOLD	75
V.3.d.ii.	Paramètres mesurables en IRMf	76
Chapitre VI : Apport de l'IRM et de la spectroscopie RMN pour l'identification de biomarqueurs dans les maladies à PolyQ		77
VI.1.	Biomarqueurs des maladies à PolyQ en clinique	77
VI.1.a	Morphométrie des structures cérébrales par IRM anatomique	77
VI.1.b	Profils métaboliques par Spectroscopie RMN ¹ H	78
VI.1.c	Cartes pondérées en macromolécules par IRM-MT.....	80
VI.1.d	Intégrité de la microstructure par Imagerie en Tenseur de Diffusion	80
VI.1.e	Connectivité fonctionnelle des structures cérébrales par rs-fMRI	82
VI.2.	Biomarqueurs des modèles animaux des maladies à PolyQ.....	83
VI.2.a	Morphométrie des structures cérébrales par IRM anatomique	83
VI.2.b	Profils métaboliques par Spectroscopie RMN ¹ H	84
VI.2.c	Cartes pondérées en glutamate par IRM-CEST	86
VI.2.d	Intégrité de la microstructure par Imagerie en Tenseur de Diffusion	87
VI.2.e	Connectivité fonctionnelle des structures cérébrales par rs-fMRI	88
VI.3.	Récapitulatif des biomarqueurs par IRM de la MH	89
Chapitre VII : Post-traitement des données IRM		93
VII.1.	Méthodologie d'expérimentation animale	93
VII.1.a	Conception des études longitudinales	93
VII.1.b	Choix de l'espèce	94
VII.1.c	Choix des modèles.....	94
VII.1.d	Élevage.....	95
VII.2.	Acquisition des données.....	95
VII.2.a	Matériel général d'acquisition	95
VII.2.b	Calibration de puissance	96
VII.3.	Traitement d'image	97
VII.3.a	Recalage et segmentation automatique des images	97
VII.3.a.i.	Fonctionnement de Sammba-MRI	98
VII.3.a.ii.	Limites rencontrées et solutions trouvées	99
VII.3.b	Traitement des images gluCEST	100

VII.3.c	Traitement des spectres métaboliques.....	102
VII.3.d	Traitement des images DTI.....	103
VII.3.d.i.	Problème rencontré	103
VII.3.d.ii.	Approche voxel-à-voxel	104
VII.3.e	Traitement des images rs-fMRI	105
VII.3.f	Cartes de variation	106
Chapitre VIII	: Étude de la pathogénèse de la MH dans le modèle souris CAG140	107
VIII.1.	Introduction.....	107
VIII.2.	Matériels et Méthodes.....	107
VIII.2.a	Souris CAG140 et témoins.....	107
VIII.2.b	Anesthésie	108
VIII.2.c	Protocole d'IRM.....	108
VIII.2.d	Traitement d'images	109
VIII.2.e	Théorie des graphes	109
VIII.2.f	Tractographie	110
VIII.3.	L'imagerie anatomique montre que le modèle CAG 140 est un modèle progressif.....	110
VIII.3.a	Résultats	110
VIII.3.b	Discussion	111
VIII.4.	Des altérations métaboliques précoces dans la matière blanche sont détectées par imagerie CEST.....	112
VIII.4.a	Résultats	112
VIII.4.b	Discussion	113
VIII.5.	Atteintes microstructurales dans le corps calleux des souris CAG140.....	115
VIII.5.a	Résultats	115
VIII.5.a.i.	Imagerie MT.....	115
VIII.5.a.ii.	Imagerie du tenseur de diffusion	115
VIII.5.b	Discussion	117
VIII.6.	Identification d'un réseau vulnérable dans le modèle CAG140.....	118
VIII.6.a	Lien avec la connectivité fonctionnelle du cerveau de la souris	119
VIII.7.	Discussion	120
Chapitre IX	: Evaluation de l'efficacité d'Oligonucléotides Antisens dans un modèle rat de la MH	
	123	
IX.1.	Introduction.....	123
IX.2.	Matériels et Méthodes.....	125
IX.2.a	Conception de l'étude	125
IX.2.a.i.	Thérapie.....	125

IX.2.a.ii.	Rats BACHD et témoins	125
IX.2.a.iii.	Étude préliminaire	125
IX.2.a.iv.	Étude longitudinale	126
IX.2.a.v.	Imagerie.....	126
IX.2.b	Protocole expérimental.....	127
IX.2.b.i.	Anesthésie	127
IX.2.b.ii.	Protocole d'IRM.....	127
IX.2.c	Traitement d'images	128
IX.2.d	Collecte des tissus cérébraux.	128
IX.2.e	Western Blot.....	129
IX.2.f	RT-qPCR	129
IX.3.	L'étude préliminaire démontre la réduction sélective de l'expression de la HTT mutée humaine dans le cerveau des rats BACHD	130
IX.3.a	Résultats	130
IX.3.b	Discussion.....	131
IX.4.	L'imagerie anatomique montre une diminution de l'atrophie cérébrale avec la thérapie génique.....	132
IX.4.a	Résultats	132
IX.4.a.i.	Discussion	134
IX.5.	Les résultats de spectroscopie RMN montrent l'importance du choix de l'anesthésie dans la conception d'une étude longitudinale	135
IX.5.a	Résultats	135
IX.5.b	Discussion	138
IX.6.	L'imagerie CEST du cerveau entier nécessite des améliorations	139
IX.6.a	Résultats	139
IX.6.b	Discussion.....	140
Chapitre X	: Évaluation de l'efficacité d'ARN interférant dans un modèle souris d'ASC7	143
X.1.	Introduction.....	143
X.2.	Matériels et Méthodes.....	144
X.2.a	Caractérisation ex vivo du modèle	144
X.2.b	Étude d'imagerie longitudinale avec essai thérapeutique	144
X.2.b.i.	Souris SCA7 ^{140Q/5Q} et témoins	144
X.2.b.ii.	Protocole d'IRM.....	144
X.2.b.iii.	Anesthésie	145
X.2.b.iv.	Test de comportement.....	146
X.3.	Caractérisation du modèle SCA7 ^{140Q/5Q}	146

X.3.a	Résultats	146
X.3.b	Discussion	147
X.4.	L'imagerie anatomique montre un effet de l'injection de vecteurs viraux sur l'atrophie cérébrale.....	147
X.4.a	Résultats	147
X.4.b	Discussion	148
X.5.	La spectroscopie RMN et l'imagerie gluCEST montrent une altération du métabolisme chez les souris SCA7 ^{140Q/5Q}	150
X.5.a	Résultats	150
X.5.a.i.	Spectroscopie RMN	150
X.5.a.ii.	Imagerie gluCEST	151
X.5.b	Discussion	152
X.6.	L'imagerie du tenseur de diffusion et l'imagerie fonctionnelle ne permettent pas de mettre en évidence d'effet significatif du traitement.....	154
X.6.a	Résultats	154
X.6.b	Discussion	155
Chapitre XI	: Discussion générale	159
XI.1.	Choix d'un modèle animal.....	160
XI.1.a	Recherche de biomarqueurs	160
XI.1.b	Essais thérapeutiques.....	162
XI.2.	Contrôle des conditions expérimentales.....	163
XI.2.a	Conditions d'hébergement.....	163
XI.2.b	Conditions expérimentales.....	164
XI.3.	Protocole d'imagerie	166
XI.3.a	Qualité d'image anatomique.....	166
XI.3.b	Autres modalités	167
XI.3.b.i.	Imagerie du tenseur de diffusion	167
XI.3.b.ii.	Imagerie CEST	168
XI.3.b.iii.	IRM fonctionnelle	168
XI.4.	Conclusion	169
Conclusion générale	173
Références bibliographiques	176

Abréviations

AD : Diffusion axiale

ADC : Coefficient de diffusion apparent

APT : Amide Proton Transfer

ASC : Ataxie SpinoCérébelleuse

ASO : Oligonucléotides Antisens

ATXN : Ataxine

BDNF : Brain-Derived Neurotrophic Factor

BOLD : Blood-Oxygen Level Dependent

CC : Corps Calleux

CEST : Chemical Exchange Saturation Transfer

Cho : Choline

CNR : Rapport contraste-sur-bruit

DL : Dictionary Learning

DTI : Imagerie du Tenseur de Diffusion

EPI : Echo-Planar Imaging

FA : Anisotropie Fractionnelle

FID : Free Induction Decay

Gln : Glutamine

Glu : Glutamate

HTT : Huntingtine

ICV : Intra-Cérébro-Ventriculaire

Ins : myo-Inositol

IRMf : Imagerie par Résonance Magnétique Fonctionnelle

Maladies à PolyQ : Maladies par expansion de polyglutamine

MD : Diffusivité moyenne

MH : Maladie de Huntington

MT : Transfert d'aimantation

MTRasym : Magnetic Transfer Ratio asymmetric

NAA : N-acetyl-aspartate

NCP : Neurones Corticaux Pyramidaux

NEM : Neurones Epineux de taille Moyenne

NOE : Nuclear Overhauser Enhancement

OF : Open-Field

ppm : partie par million

RD : Diffusivité radiale

RF : RadioFréquence

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

RSB : Rapport Signal-sur-Bruit

RT-qPCR : Réaction de polymérase en chaîne quantitative avec transcriptase inverse

shRNA : Petit ARN en épingle à cheveux

siRNA : Petit ARN interférant

TBSS : Tract-Based Spatial Statistics

WASSR : Water saturation shift referencing

Introduction générale

Les maladies neurodégénératives sont des maladies dont la progression est lente (plusieurs années à plusieurs dizaines d'années) touchant le système nerveux central, avec une fréquence qui s'accroît avec l'âge. Les maladies les plus fréquentes sont la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson. Du fait du vieillissement général de la population, le nombre de patients atteints de l'une de ces maladies augmente régulièrement depuis plusieurs décennies. Aujourd'hui plus d'un million de personnes souffrent de la maladie d'Alzheimer en France et environ 160 000 sont touchées par la maladie de Parkinson (Santé Publique France). L'épidémiologie de ces maladies est étroitement surveillée et une forte communauté scientifique est mobilisée pour mieux comprendre les mécanismes de neurodégénérescence dans l'espoir de trouver des traitements pouvant soulager les symptômes ou ralentir la progression inexorable des maladies. Cependant cet effort est ralenti par la mauvaise compréhension des causes de ces maladies et la complexité de leur progression.

L'origine génétique de la maladie de Huntington (MH), une autre maladie neurodégénérative, permet une étude plus ciblée des mécanismes de dégénérescence. Bien que cette maladie soit rare, avec environ 6000 patients en France, elle est très étudiée, à la fois dans l'espoir de trouver un traitement mais aussi pour l'opportunité qu'elle représente de pouvoir décrire les processus dégénératifs dans une maladie rappelant sous divers aspects d'autres maladies neurodégénératives, mais avec une cause génétique unique donc bien définie.

Le Laboratoire des Maladies Neurodégénératives (LMN), situé au Molecular Imaging Research Center (MIRCen) à Fontenay-aux-roses aborde des thématiques de recherche qui couvrent l'étude des mécanismes de dégénérescence, les modèles animaux des maladies neurodégénératives, et l'étude des stratégies thérapeutiques pour les maladies d'Alzheimer, de Parkinson et de Huntington. Au sein de ce laboratoire, cette thèse s'est déroulée à l'interface entre l'équipe de Gilles BONVENTO, qui s'intéresse aux interactions cellulaires dans les maladies neurodégénératives, avec notamment une expertise sur l'étude des modèles animaux, et celle de Julien VALETTE, qui développe de nouvelles méthodologies en IRM et RMN *in vivo*, en particulier pour l'étude de biomarqueurs des maladies neurodégénératives. Pour cela elle s'appuie sur une plateforme IRM comportant une IRM 11.7T dédiée au petit animal et une IRM 7T dédiée au Primate Non-Humain (PNH).

Le consortium eRare TreatPolyQ, qui a financé cette thèse, a pour objectif le développement de thérapies pour les maladies par expansion de polyglutamine (maladies à PolyQ), dont la MH fait partie,

en ciblant directement leur cause génétique commune. Le projet inclue 5 partenaires européens et 1 partenaire canadien. Il comporte trois grands volets (figure 1) :

- La conception de nouvelles thérapies par extinction de gène avec des cibles thérapeutiques pertinentes basées sur des données génétiques.
- Le développement de nouveaux biomarqueurs des maladies à PolyQ par IRM et RMN *in vivo*.
- L'évaluation des thérapies sélectionnées *in vivo* dans des modèles rongeurs des maladies à PolyQ à l'aide des biomarqueurs pertinents.

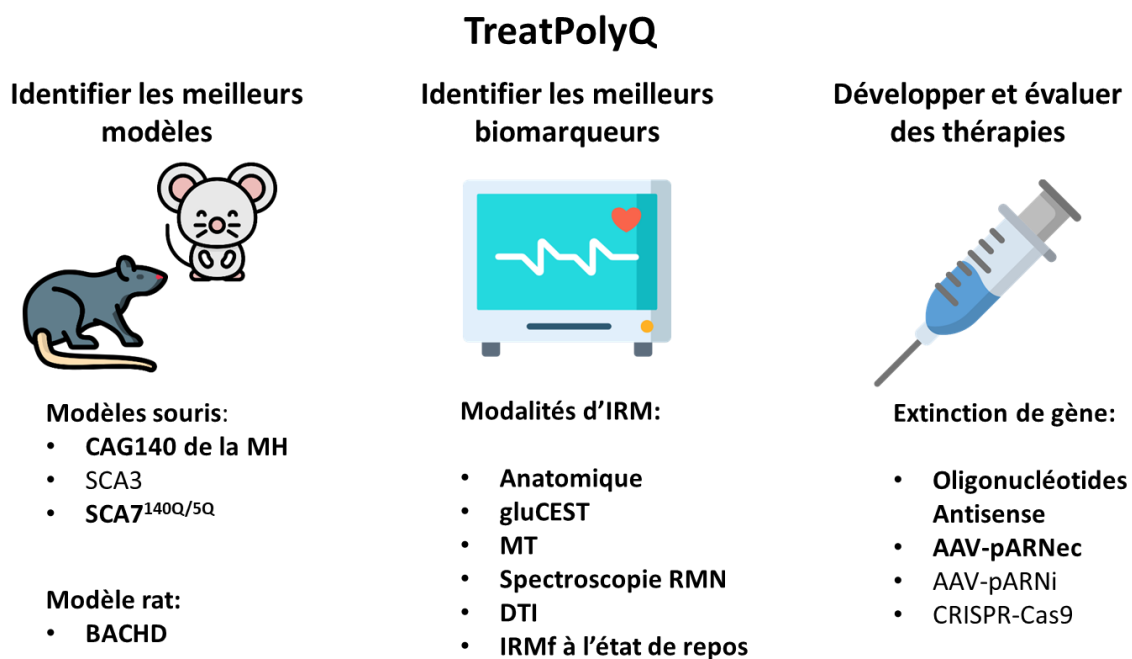


Figure 1: Objectifs du projet TreatPolyQ. Les pistes explorées au cours de cette thèse sont marquées en gras.

Dans ce cadre, le travail de thèse présenté dans ce manuscrit s'est articulé autour des biomarqueurs IRM des modèles rongeurs de maladies à PolyQ, pour le suivi de la progression des maladies, la meilleure compréhension de la pathogénèse et l'évaluation de thérapies. Il s'est en particulier intéressé à deux maladies à PolyQ, la MH et de l'Ataxie SpinoCérébelleuse de type 7 (ASC7). Le chapitre I sera consacré à la description de ces pathologies. Le travail de thèse a comporté une grande partie applicative dans la conduite de trois études d'IRM longitudinales sur des modèles animaux très progressifs de ces maladies, dans l'objectif d'en caractériser la phase présymptomatique. La première étude a visé l'évaluation de biomarqueurs et la compréhension de la pathogénèse dans un modèle souris de la MH (Chapitre VIII). Les modalités d'IRM utilisées comme l'Imagerie en Tenseur de Diffusion (DTI) ou l'imagerie gluCEST ont permis l'acquisition d'informations pertinentes sur le fonctionnement du cerveau et notamment de la matière blanche, comme la concentration de glutamate ou la

microstructure. La deuxième étude a eu pour objectif l'évaluation d'une thérapie génique dans un modèle rat de la MH (Chapitre IX). En effet il était intéressant de voir si l'injection d'agents thérapeutiques par extinction du gène *HTT* permet de réduire le phénotype de ce modèle. Enfin, la troisième étude a eu pour objectif l'évaluation d'une thérapie dans un modèle souris d'ASC7 (Chapitre X). Elle a également permis de valider dans une autre maladie les biomarqueurs déjà utilisés dans des modèles de la MH, et de mieux caractériser ce nouveau modèle très progressif d'ASC7. Cette thèse a également consisté à faire d'important développements méthodologiques. En effet certaines des modalités d'IRM utilisées lors de cette thèse n'étaient pas encore implantées au laboratoire et il a fallu maîtriser notamment le post-traitement des images précliniques pour en obtenir les biomarqueurs pertinents (Chapitre VII).

Dans un premier temps nous introduirons les maladies à PolyQ (Chapitre I) et les stratégies thérapeutiques envisagées par le consortium TreatPolyQ (Chapitre II). Ensuite nous détaillerons les mécanismes de pathogénèse de la MH, nécessaires à la compréhension des conclusions de la première étude (Chapitre III). Par la suite, les modèles animaux des deux pathologies seront présentés (Chapitre IV), avant d'introduire le fonctionnement des différentes modalités utilisées au cours de cette thèse (Chapitre V) et leur pertinence pour l'étude de la MH (Chapitre VI). Suite à cette introduction, les développements méthodologiques de post-traitements réalisés au cours de cette thèse seront décrits dans le chapitre VII, avant la présentation et discussion des résultats des trois études longitudinales réalisées (Chapitre VIII à X). Enfin, suite à l'expérience acquise lors de cette thèse, nous discuterons dans le dernier chapitre des perspectives ouvertes notamment pour la translation des modalités d'IRM utilisées vers la clinique, et nous suggérerons des recommandations pour la réalisation d'études longitudinales multiparamétriques.

Chapitre I: Les maladies par expansion de polyglutamine

Décrite pour la première fois en 1872 par Georges Huntington, la Maladie de Huntington (MH) est une maladie neurodégénérative héréditaire rare. Depuis l'identification d'une expansion de trinuécléotides CAG dans le gène impliqué dans la MH¹, plusieurs maladies avec une cause similaire ont été identifiées, formant la récente famille des maladies à PolyQ. Comme pour la MH, ces maladies sont héréditaires et dues à l'expansion du triplet CAG sur le gène en cause.

Pour le moment il n'existe aucun traitement pour retarder l'apparition des maladies à PolyQ ou ralentir leur progression. En effet, l'identification de leviers thérapeutiques est complexifiée par le caractère pléiotropique des protéines en cause, c'est-à-dire leur implication dans plusieurs fonctions cellulaires, ainsi que par la difficulté de suivre la progression de ces maladies par manque de biomarqueurs.

I.1. Cause et principales maladies

Les maladies à PolyQ sont au nombre de neuf : la MH, l'atrophie dentato-rubro-pallido-luysienne (DRPLA), l'amyotrophie spinobulbaire (SBMA) et les ataxies spinocérébelleuses de type 1 (ASC1), 2 (ASC2), 3 (ASC3), 6 (ASC6), 7 (ASC7) et 17 (ASC17)². Dans chacune de ces maladies, le gène en cause contient une répétition de triplets CAG qui correspond à une répétition de résidus Glutamine (Q) sur la protéine correspondante. Ce nombre de CAG ne doit pas dépasser un seuil critique au-dessus duquel on considère qu'il y a expansion et que la maladie sera développée. L'importance de l'expansion de cette répétition est inversement corrélée à l'âge d'apparition de la maladie et est liée à une plus grande sévérité des symptômes³.

Les protéines impliquées dans ces maladies n'ont aucun autre point commun que la répétition de triplets CAG. Bien que ces protéines soient toutes ubiquitaires, les maladies à PolyQ montrent une dégénérescence préférentielle de régions spécifiques du système nerveux. Ces régions diffèrent cependant selon la maladie. Le tableau I résume les maladies à PolyQ, les protéines qu'elles impliquent ainsi que les régions préférentiellement touchées.

Tableau I : Caractéristiques principales des maladies à expansion de polyglutamine. Tiré de Abou-Sleymane et Trottier⁴.

Maladie	Mode de Transmission	Protéine	Localisation subcellulaire	Nombre de répétitions pathologiques	Régions préférentiellement affectées
MH	Autosomique Dominant	Huntingtine	Cytoplasmique/ Nucléaire	36-121	Striatum - Cortex Cérébral
SBMA	Liée à l'X Dominant	Récepteur à l'androgène	Nucléaire	38-62	Corne antérieure - Bulbe - Ganglion spinal postérieur
DRPLA	Autosomique Dominant	Atrophine-1	Nucléaire	49-88	Cervelet - Cortex Cérébral - Noyaux gris centraux - Corps de Luys
SCA1	"	Ataxine-1	Nucléaire	40-82	Cellules de Purkinje - Noyau denté - Tronc cérébral
SCA2	"	Ataxine-2	Cytoplasmique	32-200	Cellules de Purkinje - Tronc cérébral - Lobes frontotemporaux
SCA3	"	Ataxine-3	Cytoplasmique/ Nucléaire	61-84	Noyau denté - Noyaux gris centraux - Tronc cérébral - Moelle épinière
SCA6	"	*	Membranaire	20-29	Cellules de Purkinje - Noyau denté - Noyau olivaire inférieur
SCA7	"	Ataxine-7	Nucléaire	37-306	Cervelet - Tronc cérébral - Macula - Cortex visuel
SCA17	"	Protéine de liaison à la boîte TATA	Nucléaire	47-63	Cellules de Purkinje - Noyau olivaire inférieur

I.2. La maladie de Huntington

I.2.a Transmission

La MH touche environ 1 personne sur 10 000 en Europe. Sa transmission est basée sur le mode autosomique dominant, ce qui signifie qu'il suffit qu'un des allèles porte la mutation pour que la maladie se développe. Ainsi, un enfant dont l'un des parents est porteur de la MH aura une probabilité de 50% de développer à son tour la maladie.

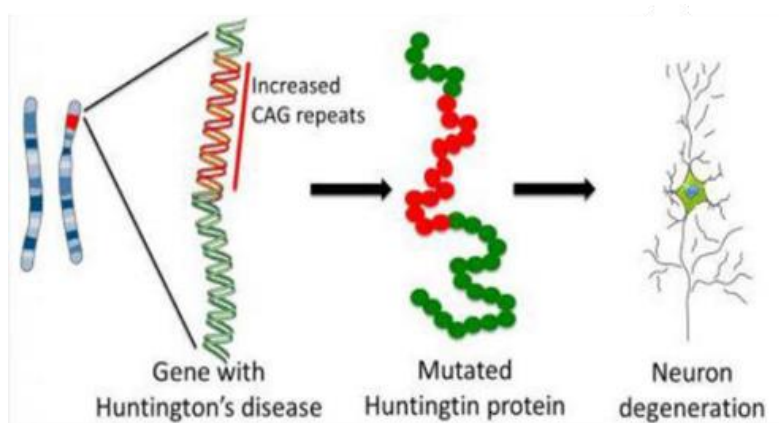


Figure 2 : Représentation du gène HTT porteur de l'expansion CAG à l'origine de la MH. Tiré de <https://www.eurostemcell.org>

Le gène *HTT* (figure 2), porteur de l'expansion de triplets CAG, a été localisé en 1984 et isolé précisément en 1993¹. Il est situé sur le bras court du chromosome 4. Il est doté d'une répétition de

triplets CAG en son extrémité 5', longue de 6 à 26 répétitions en condition non pathologique. Entre 27 et 35 répétitions, on parle de gènes mutables⁵ car ceux-ci ne sont pas pathologiques mais ont une instabilité pouvant conduire à un allèle muté chez la descendance. Le même mécanisme est à l'origine du phénomène d'anticipation observable chez les générations successives de porteurs du gène. La longueur de la répétition est instable entre deux générations, avec à la fois des expansions et des réductions du nombre de CAG. Cependant, au total, la tendance est à la hausse, en particulier lors de la transmission par le père^{3,6}. Cela induit une diminution de l'âge d'apparition des symptômes et une hausse de la sévérité des symptômes de génération en génération. Entre 36 et 39 répétitions, l'allèle est pathologique à pénétrance incomplète. Les porteurs de gènes ont alors une probabilité de 60% de développer la maladie à 65 ans⁷. Au-dessus de 40 répétitions l'allèle est pathologique à pénétrance complète, c'est-à-dire que 100% des porteurs de gène développent la maladie, avec une sévérité corrélée à la taille de l'expansion. Au-delà de 60 répétitions on parle de forme juvénile de la MH car l'apparition de la maladie survient avant 20 ans⁸. Le phénomène d'anticipation et la possibilité de tester son génotype tendent à diminuer la transmission de la maladie, cependant ceci est contrebalancé par l'apparition de cas *de novo*, que l'on estime autour de 5 à 8% des cas totaux⁹.

1.2.b Signes cliniques

1.2.b.i. Symptômes moteurs

Dans la majorité des cas, la MH se manifeste entre 35 et 45 ans. On considère alors deux phases : la phase présymptomatique, située avant l'apparition des symptômes, et la phase symptomatique qui survient après. La durée médiane de survie après l'apparition des symptômes est de 18 ans⁹. La phase présymptomatique cependant peut être elle-même classifiée entre la phase proche et la phase lointaine de l'apparition des symptômes. Cette phase est accompagnée de subtiles altérations métaboliques et cellulaires qui amorcent des symptômes moteurs qui peuvent apparaître en amont du diagnostic.

Les symptômes moteurs sont au cœur du diagnostic de la MH et définissent généralement l'avancement de la maladie. Le symptôme le plus caractéristique consiste en des mouvements involontaires anormaux visibles en particulier au début de la phase déclarée de la maladie¹⁰. Ces mouvements qualifiés de choréiques ou choréiformes perturbent la motricité fine et sont très handicapants pour les patients. Ils débutent par les extrémités des membres et le visage pour se propager au corps entier. L'activation des muscles du visage peut notamment résulter en faux-mouvements de la tête et torticolis, de même que la chorée propagée au corps entier peut entraîner un risque de chute important. À la chorée s'ajoute une déficience des mouvements volontaires plus

tard dans la progression de la MH. Lors de la phase tardive de la maladie celle-ci se traduit par une bradykinésie et une rigidité des membres.

Aujourd'hui l'évaluation de la MH se fait principalement par *Unified HD Rating Scale* (UHDRS, Echelle unifiée de classification de la MH) qui inclue des critères à la fois moteurs, cognitifs, comportementaux, émotionnels et fonctionnels ¹¹. Cette échelle contient également un score de confiance de diagnostic, s'étendant de 0 (aucun symptôme moteur évoquant la MH) à 4 (probabilité > 99% que les symptômes moteurs soient dus à la MH). L'UHDRS a également une composante dédiée au bilan des atteintes motrices, nommé UHDRS-TMS pour « Total Motor Score » (Score Moteur Total, figure 3), allant de 0 (aucun symptôme moteur) à 124. Généralement, les patients obtiennent un score de 4 en confiance de diagnostic lorsqu'ils dépassent le score de 15-20 au UHDRS-TMS ¹².

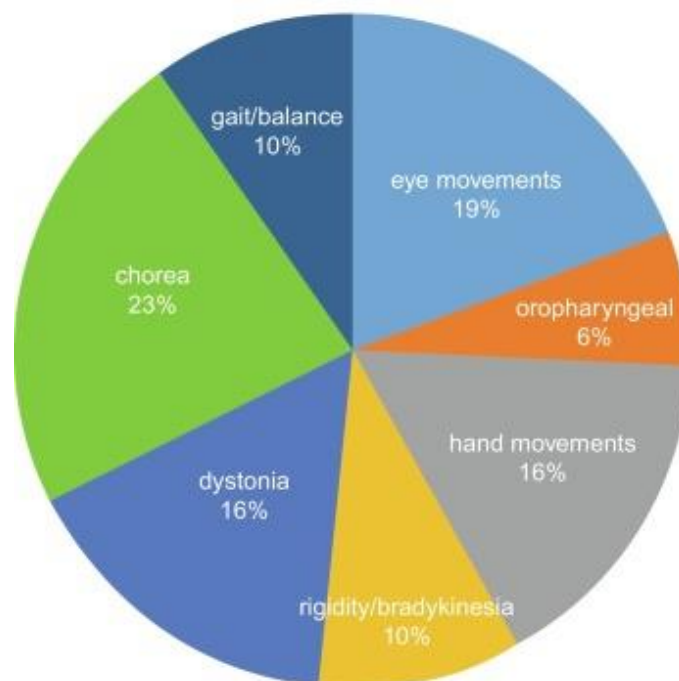


Figure 3 : Contribution des différents domaines moteurs au Score Moteur Total de l'UHDRS. Tiré de Reilmann et Schubert, 2017¹³.

I.2.b.ii. Symptômes cognitifs

Bien que le déclin cognitif soit une composante systématique de la MH, une grande variabilité interindividuelle existe dans la manifestation et la temporalité de ce déclin. Les déficiences peuvent apparaître jusqu'à 15 ans avant le diagnostic avec une progression graduelle ¹⁴. Lors de la phase présymptomatique, à moins de 10 ans du diagnostic, le déclin cognitif est détectable avec une étude longitudinale de 3 ans ¹⁵. Tandis que dans la phase manifeste, une sélection de tests cognitifs permet de visualiser un déclin significatif en 1 an. Les déficits observés comportent un ralentissement cognitif, une baisse de l'attention et de la flexibilité mentale, ainsi que des difficultés à la planification ou encore

à la reconnaissance d'émotions ^{16,17}. La figure 4 récapitule la temporalité des symptômes cognitifs et moteurs de la MH.

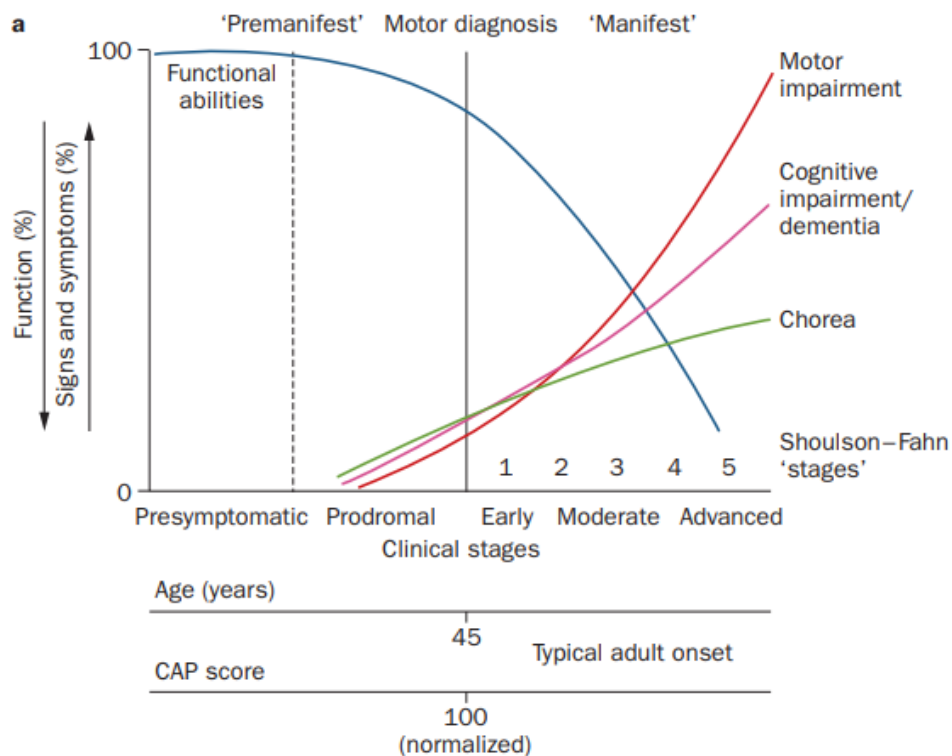


Figure 4 : Courbes schématiques de la progression des symptômes de la MH. Adapté de Ross et al., 2014 ¹².

1.2.b.iii. Symptômes psychiatriques

D'abord considérés comme une conséquence des symptômes cognitifs, les aspects psychiatriques de la MH sont de plus en plus reconnus et pris en compte. La dépression est le symptôme le plus décrit bien qu'on observe une grande variabilité dans la prévalence rapportée par les différentes études qui ont été conduites (entre 9% et 63%, pour revue voir ¹⁸). Le syndrome dépressif précède l'arrivée des symptômes moteurs et atteint un taux maximal autour du diagnostic, à la fin de la phase présymptomatique et au début de la phase symptomatique. Plus loin dans la phase manifeste, ce taux diminue en corrélation avec la baisse cognitive. La dépression est également accompagnée d'anxiété. D'une manière générale il est difficile pour les symptômes psychiatriques de séparer la part liée à l'état psychologique du patient qui voit son état se dégrader et la part due à la dégénérescence en elle-même. Cela est particulièrement vrai pour l'anxiété. En effet, à l'inverse de la dépression, il a été montré que l'avancement de la MH n'influe pas sur le niveau d'anxiété ¹⁹.

Le second symptôme psychiatrique fréquemment rencontré est l'irritabilité du patient. L'irritabilité est définie comme un état psychologique temporaire caractérisé par l'impatience, l'intolérance et une mauvaise gestion de la colère. Comme pour la dépression, la prévalence de l'irritabilité mesurée chez

les patients de la MH est très variable selon les études (entre 35% et 73%, pour revue voir ¹⁸). Elle est donc un des symptômes les plus récurrents et intervient très tôt, avant l'apparition des symptômes. C'est même le premier signe de la maladie pour nombre de patients ²⁰. D'autres symptômes peuvent également apparaître plus tard en lien avec le développement de la MH : Troubles obsessionnels, psychose, apathie, désinhibition ou encore impulsivité. Il est important de prendre en compte ces aspects pour assurer le meilleur accompagnement des patients et de leur entourage.

I.3. L'Ataxie spinocérébelleuse de type 7

I.3.a Transmission

L'ataxie spinocérébelleuse de type 7 est une ataxie cérébelleuse, à transmission autosomique dominante. Considérée comme la plus rare de ces maladies, avec une prévalence inférieure à 1 sur 100 000 ²¹, elle a été décrite pour la première fois en 1937 par Froment et collaborateurs. Cette faible fréquence est à l'origine d'une difficulté à trouver des patients pour la conduite d'études cliniques. De plus, les porteurs présentent une grande hétérogénéité dans la sévérité et l'âge de déclaration de la maladie.

Le gène responsable de ASC7 a été découvert en 1995 sur le chromosome 3 ²²⁻²⁴. Il code pour la protéine ataxine-7 (ATXN7) qui possède également une répétition de glutamines à son extrémité N-terminale ²⁵. De façon analogue à la protéine HTT dans la MH, le nombre de répétitions CAG sur le gène codant pour l'ATXN7 détermine la pénétrance de la maladie. En-dessous de 35 répétitions le gène est sain. Entre 28 et 35 répétitions on parle de gène mutable car d'une génération à l'autre une mutation peut porter ce nombre au-dessus du seuil critique. Entre 34 et 36 répétitions la maladie est à pénétrance réduite, avec des symptômes plus légers et arrivant plus tardivement. Au-delà, le nombre de répétitions est inversement corrélé à l'âge d'apparition des symptômes. La plupart des patients portent entre 36 et 55 répétitions, ce qui entraîne la forme classique de la maladie avec une dégénérescence progressive de différents types de neurones. Enfin, au-dessus de 70 répétitions CAG on parle de forme juvénile car les symptômes apparaissent avant 20 ans. Comme pour la MH on observe un phénomène d'anticipation de la maladie d'une génération à l'autre qui correspond à l'allongement de la répétition CAG. Ainsi, en moyenne, la maladie se déclare 19 ans plus tôt lors de la génération suivante ²⁶.

I.3.b Signes cliniques

Une grande disparité existe dans les signes cliniques de la maladie. En général, les premiers signes proviennent de l'ataxie cérébelleuse qui provoque un manque de coordination dans la démarche, les mouvements des membres ou encore l'élocution (dysarthrie). D'autres symptômes, bien que non

systematiques, sont souvent présents comme une altération des réflexes, une diminution de la pallesthésie (sensibilité vibratoire), de la dysphagie ou encore des problèmes oculomoteurs ²⁷.

ASC7 est également caractérisée par une dégénérescence maculaire des photorécepteurs coniques qui entraîne une baisse de l'acuité visuelle. Celle-ci progresse de façon bilatérale et symétrique vers une cécité irréversible. Dans les formes juvéniles d'ASC7, la déficience visuelle peut être visible avant l'ataxie cérébelleuse.

Enfin, les porteurs semblent présenter des symptômes cognitifs, bien que ceux-ci aient été très peu étudiés. Un déficit des fonctions exécutives frontales a été mis en évidence, en relation avec la progression de la neurodégénérescence ²⁸. Récemment, une diminution de la capacité d'apprentissage verbale a été mesurée chez des patients, en corrélation avec l'atrophie de certaines zones spécifiques du cortex associatif ²⁹.

Aujourd'hui, que ce soit pour la MH ou ASC7, la mesure d'atrophie des structures cérébrales par IRM est le biomarqueur le plus utilisé pour le suivi de la progression de la maladie ^{14,15}. Les atteintes visibles dans ces maladies par IRM anatomique, ainsi qu'avec d'autres modalités plus avancées, seront présentées en détail dans le chapitre VI. Dans le chapitre suivant, nous allons présenter les différentes stratégies de thérapies géniques qui ont été envisagées dans le cadre du projet TreatPolyQ afin de combattre les maladies à PolyQ à leur origine.

Chapitre II : Stratégies de thérapies géniques des maladies à PolyQ

Plusieurs types de thérapies ont été envisagés contre les maladies à PolyQ. Dans la MH, plusieurs types de traitements symptomatiques tendant à réduire la sévérité des chorées (riluzol, tetrabenazine, haloperidole, etc.) ont été développés. Ils restent cependant assez peu efficaces sur le long terme. D'autres agissent sur les troubles psychiatriques en particulier les neuroleptiques atypiques (risperidone, tiapine, etc.) qui permettent d'améliorer la qualité de vie des patients au début de la survenue des symptômes. Une autre stratégie, encore à l'état expérimental pour la MH, consiste à transplanter par chirurgie des cellules pouvant remplacer les neurones du striatum qui ont dégénéré, chez des patients assez avancés dans la maladie, dans le but de reconstruire la circuiterie des ganglions de la base à l'aide de transplantation. Les résultats obtenus avec les cellules humaines embryonnaires sont encourageants mais la procédure est très complexe, notamment du fait de l'origine des cellules obtenues à la suite d'interruptions volontaires de grossesse. Outre les aspects éthiques à prendre en compte, peu de cellules peuvent être transplantées. Ainsi les recherches actuelles s'orientent vers l'utilisation de cellules souches ou induites (iPSC) différenciées en progéniteurs neuronaux.

Concernant les stratégies de neuroprotection, visant à ralentir la progression des symptômes et de la neurodégénérescence, plusieurs pistes expérimentales ont été identifiées par des recherches cellulaires et précliniques dans les modèles animaux. Néanmoins, les résultats de nombreux essais cliniques menés jusqu'alors ont tous été négatifs³⁰.

Depuis quelques années on observe un changement de paradigme, avec des essais effectués sur des porteurs présymptomatiques du gène (pour revue, voir ³¹). En effet, la connaissance du gène en cause dans la MH ou ASC7 a permis la mise au point de tests diagnostiques fiables et d'identifier des gènes cibles pour la mise au point de stratégies thérapeutiques reposant sur la thérapie génique. Il est donc tout à fait imaginable de débiter un traitement durant la phase présymptomatique de la maladie, lorsque les altérations cérébrales sont encore limitées, voire réversibles.

L'inclusion de porteurs présymptomatiques dans les essais cliniques pose cependant un problème dans l'évaluation de l'efficacité des traitements. En effet, il est difficile de détecter une différence significative dans la progression de la maladie chez des personnes ne présentant pas de symptômes. Certains marqueurs comme l'UHDRS ou le volume striatal dans la MH se sont montrés assez sensibles pour différencier les sujets sains des sujets porteurs ¹⁵, cependant avec une puissance statistique plus faible qui nécessite plus de participants. En conséquence, il est devenu de première importance de

trouver de nouveaux biomarqueurs précoces des maladies à PolyQ. Ce point a été un aspect central de cette thèse et sera développé plus loin (chapitre VI).

Un autre changement qui accompagne la réduction de l'âge des participants aux études cliniques est le développement des certains essais de thérapies géniques visant à agir sur l'origine même de la maladie, à savoir l'expression du gène muté. L'objectif est d'ainsi empêcher la maladie de se développer plutôt que d'en rectifier les conséquences. Plusieurs stratégies sont explorées pour cela, avec une action qui peut se produire au niveau de l'ADN, de l'ARN pré-messager (préARNm) ou de l'ARN messager (ARNm). Ces stratégies vont être détaillées dans les sections suivantes.

II.1. Oligonucléotides Antisens

Les Oligonucléotides AntiSens (ASO) sont de petites séquences d'acides nucléiques synthétiques qui sont conçues pour s'hybrider avec l'ARN cible dont elles sont complémentaires, dans le but de promouvoir sa dégradation ou d'en modifier la traduction. Dans le premier cas, la séquence cible est située à la jonction entre un intron et un exon sur le préARNm. Une partie de l'exon est ainsi supprimée avec l'intron lors de l'épissage, ce qui permet de modifier la protéine finale pour en retirer la partie dysfonctionnelle (figure 5, approche 1). Dans le second cas, l'ASO vient s'hybrider sur un exon de l'ARNm ou pré-messager et activer sa dégradation par la RNase H. La RNase H a pour rôle de reconnaître et de couper la séquence d'ARN hybridée (ou double brin) avec l'ASO. Ce dernier est ensuite libéré et peut ainsi promouvoir la dégradation de plusieurs copies d'ARNm (figure 5, approche 2).

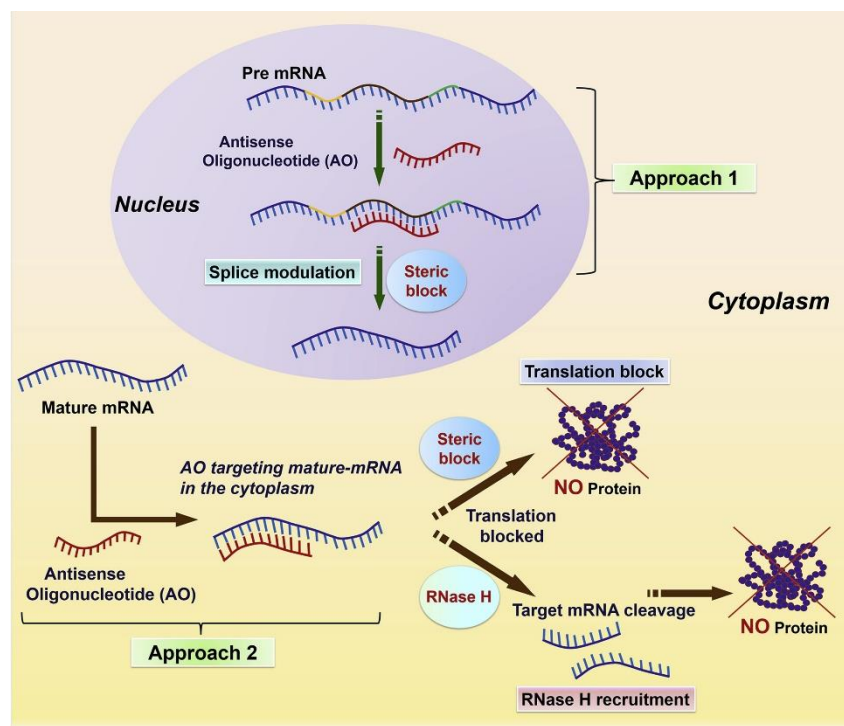


Figure 5 : Principe de fonctionnement des Oligonucléotides AntiSens. Tiré de Le et al. 2019³².

Les ASO ont récemment montré le premier succès clinique pour une thérapie génique. En effet, la *US Food and Drug Administration (FDA)* a approuvé un ASO injecté par voie intrathécale dans le cadre de l'amyotrophie spinale infantile ³³. Dans les maladies à PolyQ, un des enjeux de la thérapie génique est la notion de sélectivité allélique. En effet, les protéines impliquées dans les maladies à PolyQ ont des fonctions endogènes qui peuvent faire défaut aux cellules en cas d'extinction complète. Chez la souris, l'inactivation complète du gène codant pour la htt est létale à l'état embryonnaire ^{34,35} et mène à une neurodégénérescence et des troubles comportementaux chez la souris adulte ^{36,37}. Il est donc probable qu'une thérapie génique qui éteindrait les deux allèles ait des effets indésirables importants à long-terme.

Il est possible de concevoir la séquence d'ASO afin qu'elle ne cible que l'allèle portant la mutation PolyQ. Pour cela on utilise les Polymorphismes d'un Seul Nucléotide (PSN), qui sont des différences isolées dans la séquence du gène, où un nucléotide a été substitué par un autre sans impact lors de la traduction. La plupart des patients des maladies à PolyQ ont un ancêtre commun qui a transmis la mutation de génération en génération avec son haplotype. Ainsi, on retrouve certains PSN chez la majorité des patients de la MH, et en combinant les ASO spécifiques à trois haplotypes, on pourrait obtenir une thérapie à extinction de gène avec sélectivité allélique chez plus de 90% des patients européens ³⁸.

Les ASO ont déjà été testés dans le contexte de plusieurs maladies à PolyQ. Des ASO ciblant l'ATXN7 ont permis une amélioration des fonctions visuelles dans un modèle souris d'ASC7 ³⁹. Dans le cadre de la MH, la stratégie d'extinction de gène par ASO est la plus avancée sur le plan clinique, avec plusieurs essais cliniques de grande envergure en cours ⁴⁰. Cependant, l'arrêt du premier essai clinique de phase 3 sur des ASO non sélectifs montre qu'il reste des développements à apporter ⁴¹.

Cette approche a été testée dans le cadre de la présente thèse dans le modèle rat BACHD de la MH au cours de la deuxième étude longitudinale qui sera présentée dans le chapitre IX.

II.2. Interférence par ARN

Une autre stratégie consiste à utiliser le mécanisme endogène d'interférence par ARN (voir figure 6). Ce dernier met en jeu la protéine DICER et le complexe RISC (*RNA-induced silencing complex*, Complexe d'extinction induit par ARN) pour dégrader les ARNm issus du gène muté. Cette technique consiste à injecter chez les patients des petits ARN interférents (siRNA) double brin, qui vont être reconnus par le complexe RISC. Ce dernier clive le brin sens tandis que le brin antisens dirige le complexe vers l'ARNm cible. Le complexe RISC a besoin d'un brin guide qui va le mener vers les ARNm à dégrader. Cependant, avec cette méthode, une fois que tous les siRNA ont été dégradés, le gène muté est à nouveau exprimé.

Afin d'obtenir une extinction durable, une autre solution est d'injecter des vecteurs viraux qui expriment des petits ARN en épingle à cheveux (shRNA). Ces derniers vont être clivés par la protéine DICER en séquences double brin de 20 à 25 nucléotides de long qui vont jouer le rôle de siRNA.

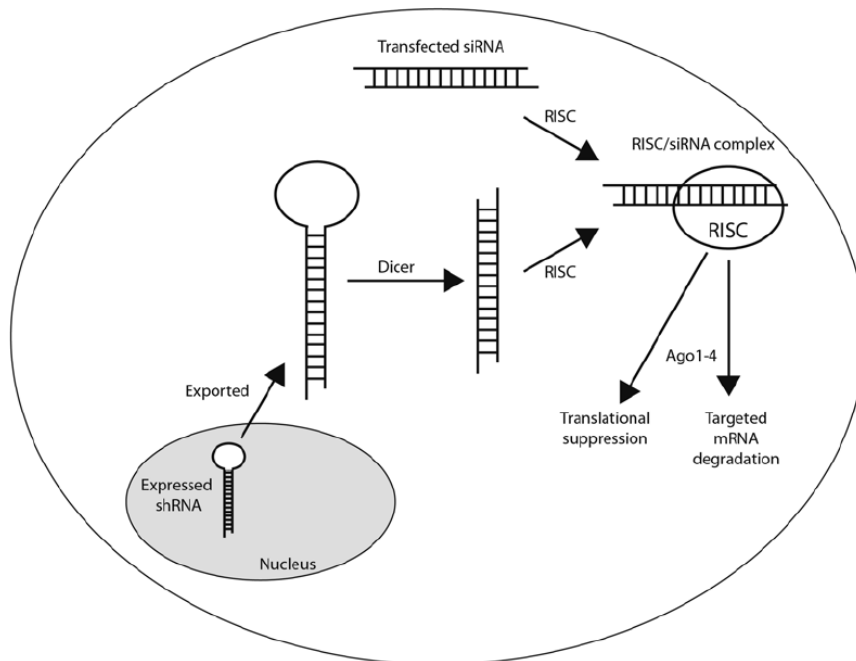


Figure 6 : Schéma explicatif du fonctionnement de l'interférence par ARN. Tiré de Fouquerel et al., 2014⁴².

Les shRNA ont été testés dans la MH et ASC7. L'injection intrastriatale de vecteurs exprimant des shRNA ciblant la HTT sans sélectivité allélique a permis la réduction de la protéine dans un modèle transgénique de la MH ⁴³ et même l'amélioration des symptômes dans un modèle induit ⁴⁴. Plus récemment, des shRNA avec spécificité allélique ont montré une diminution sélective de la HTT mutée *in vitro* ⁴⁵. Des résultats similaires ont été obtenus par des shRNA transduits dans des fibroblastes dérivés de patients atteints d'ASC7 ⁴⁶.

Cette approche a été testée dans le cadre de cette thèse sur un modèle souris d'ASC7. Cet essai fera l'objet du chapitre X.

II.3. CRISPR-Cas9

Une troisième stratégie utilisée pour l'extinction de gène est celle de la méthode CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindrome Repeats*, Courtes répétitions palindromiques groupées et régulièrement espacées) associée à la nucléase Cas9. Cette méthode, également appelée « ciseaux moléculaires », se distingue des précédentes car elle cible l'ADN plutôt que l'ARNm. Pour cela, elle fait intervenir un complexe composé d'un guide simple brin d'ARN (ARNg) et de l'endonucléase Cas9. L'ARNg fixe Cas9 jusqu'à la zone d'intérêt où cette dernière entraîne une cassure double brin de l'ADN.

Ce clivage est suivi d'une réparation non homologue, qui permet d'introduire une mutation sur la séquence d'intérêt.

La méthode CRISPR-Cas9 a montré une baisse des symptômes moteurs dans un modèle souris de la MH ⁴⁷. Cependant, dans cette étude la délétion concernait les deux allèles. Une preuve de concept de l'utilisation de cette méthode pour une délétion sélective de l'allèle muté a été réalisée *in vitro* ⁴⁸ et *in vivo* ⁴⁹ dans un autre modèle souris de la MH.

Les thérapies géniques, en particulier avec spécificité allélique, sont donc en plein développement dans la recherche contre les maladies à PolyQ. Cependant, afin de pouvoir évaluer leur efficacité chez des porteurs recrutés avant l'apparition des symptômes, il est nécessaire de trouver de nouveaux biomarqueurs de ces maladies. Les biomarqueurs d'IRM et RMN *in vivo* qui seront présentés plus loin ont vocation à mesurer l'efficacité de ces thérapies. Mais dans un premier temps, ces biomarqueurs peuvent nous aider à comprendre les mécanismes menant à la dégénérescence. Dans le chapitre suivant, nous allons présenter l'état de l'art concernant la pathogénèse de la MH, afin de donner les clés pour comprendre les conclusions de la première étude longitudinale.

Chapitre III: Pathogénèse de la MH

Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes intéressés particulièrement à la MH et en particulier à la compréhension de la pathogénèse dans un modèle souris de la MH. De par sa prévalence qui en fait l'une des maladies génétiques les plus répandues, mais également du fait des similarités de dégénérescence qu'elle partage avec les maladies d'Alzheimer ou Parkinson, la MH est au centre des préoccupations d'une forte communauté scientifique. En effet, la possibilité de mimer la cause première de la maladie, à savoir l'expression du gène muté, permet l'étude focalisée des processus dégénératifs qui découlent de la mutation. Plusieurs mécanismes par lesquels la mutation de la HTT mène à une altération des fonctions cellulaires ont été décrits. Dans ce chapitre, après avoir exposé les conséquences de la MH à une échelle plus macroscopique, nous entrerons dans le détail de ces mécanismes aujourd'hui mis en avant par la communauté. Par la suite, nous présenterons deux hypothèses récentes que nous avons explorées dans la présente thèse.

III.1. Anatomopathologie

III.1.a Circuits striataux

Deux structures sont particulièrement affectées dans la MH, le néocortex et au sein des ganglions de la base, le noyau caudé et le putamen qui forment le striatum, séparé en deux structures distinctes par la capsule interne chez les primates. Chez les rongeurs, le striatum est une structure homogène, on parlera ainsi de caudé/putamen, au sein de laquelle la capsule interne ne forme pas un faisceau de fibres unique comme chez les primates mais traverse le striatum de manière plus diffuse en de nombreux faisceaux donnant un aspect strié à la structure sur les coupes histologiques sagittales. Les ganglions de la base comprennent également le globus pallidus (GP), une des deux voies principales de sortie du striatum, composée du GP interne (GPi) et du GP externe (GPe). La substance noire réticulée (SNr) constitue l'autre voie de sortie principale du striatum. On trouve également le noyau sous thalamique, innervé par le GPe⁵⁰. La substance noire compacte (SNc), très postérieure, fait également partie des ganglions de la base. Ces structures sont le siège de circuits neuronaux assurant la coordination motrice. Ces circuits ont pour origine les neurones corticaux pyramidaux (NCP) qui représentent 80% des neurones du cortex et qui sont pour la plupart des neurones glutamatergiques excitateurs projetant vers le striatum ou vers d'autres régions corticales. Les 20% de neurones corticaux restants sont des interneurons GABAergiques inhibiteurs qui connectent localement les couches corticales entre elles.

Les projections des NCPs affèrent au niveau du striatum dorsal, où les neurones épineux de taille moyennes (NEM) GABAergiques, appelés également neurones striataux de projection, représentent 90% des neurones. Deux sous-populations de NEMs se distinguent à partir des récepteurs dopaminergiques qu'ils expriment. Les NEMs exprimant le récepteur dopaminergique D₁ (NEMds) projettent principalement sur la partie interne du GPi, formant la voie « directe »⁵¹. Par opposition, la voie indirecte est constituée des NEMs exprimant le récepteur dopaminergique D₂ (NEMis) et projette « indirectement » sur le GPe et la SNr. Le GPi et la SNr représentent la sortie du circuit des ganglions de la base et sont constitués de neurones inhibiteurs GABAergiques qui projettent vers les noyaux thalamiques. Ces derniers projettent à leur tour vers le cortex frontal avec des neurones glutamatergiques, fermant le circuit cortico-ganglion basal-thalamo-cortical. Ce circuit est illustré dans la figure 7.

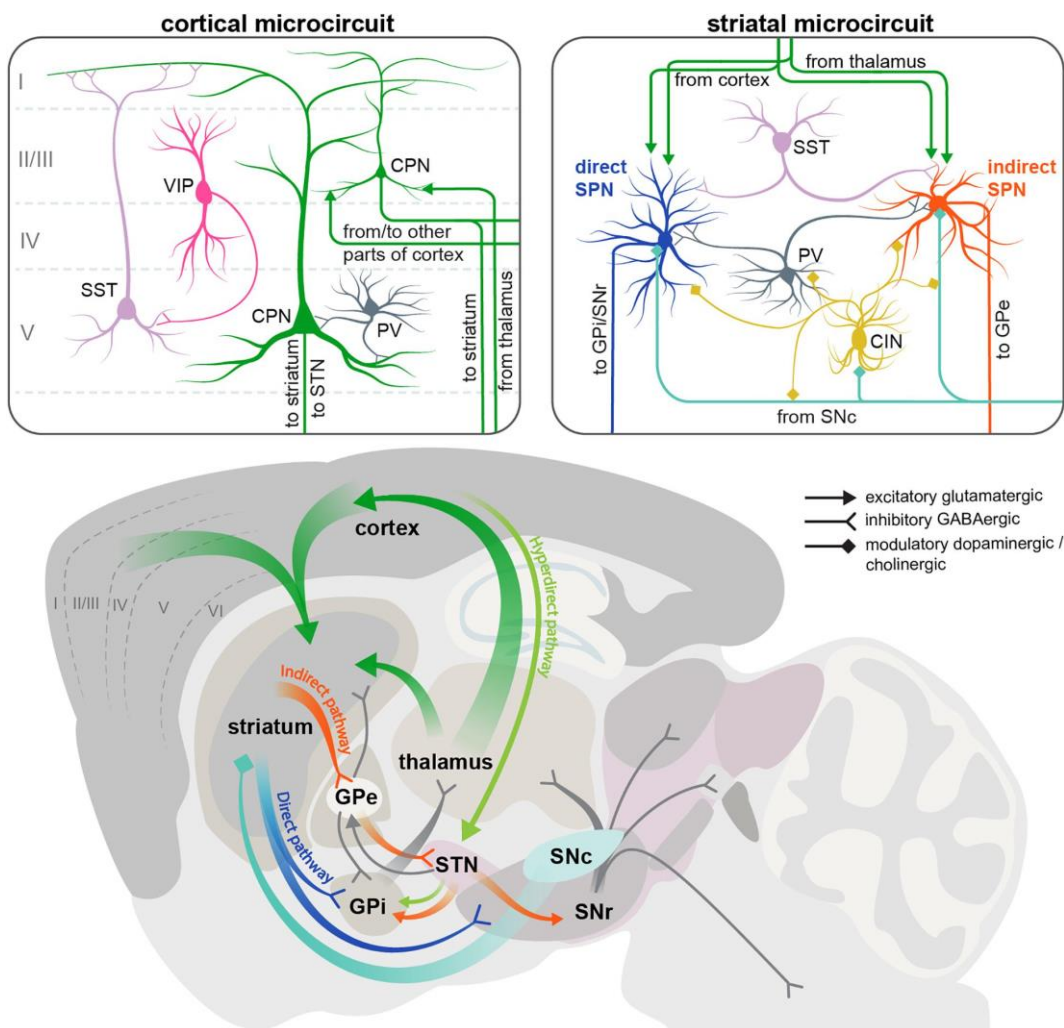


Figure 7 : Schéma explicatif des circuits corticaux et striataux impliqués dans la MH. GPi : Globus Pallidus interne, GPe : Globus Pallidus externe, STN : Noyaux sous-thalamiques, SNc : Substance noire compacte, SNr : Substance noire reticulée, CPN : Neurones corticaux pyramidaux, SPN : Neurones épineux de taille moyenne,

SST : Interneurone somatotatine, CIN : Interneurone cholinergique, PV : Interneurone parvalbumine, VIP : Interneurone à peptide vasointestinal. Adapté de Blumenstock et al., 2020 ⁵⁰.

III.1.b Altérations dans la MH

Dans la MH, les NEMs et en particulier les NEMis sont les plus vulnérables et les premiers à dégénérer ⁵². Cela se traduit par une réduction de l'inhibition envers les neurones thalamiques qui semble être à l'origine des symptômes hyperkinétiques, incluant les mouvements choréiques, qui surviennent au début de la phase symptomatique. Dans un second temps, les NEMds dégénèrent également et les symptômes de rigidité des membres et de bradykinésie apparaissent.

Cette dégénérescence des NEMs se traduit par une atrophie du striatum qui est visible avant même l'apparition des symptômes moteurs ^{53,54} (figure 8). De même, l'altération précoce des NCPs donne lieu à une atrophie du néocortex ⁵⁵. Il existe une corrélation entre la perte neuronale corticale et les signes cliniques de la maladie. Ainsi, les patients dont les NCPs du cortex moteur primaire dégénèrent montrent des symptômes moteurs sévères ⁵⁶. L'atrophie du striatum et du cortex est accompagnée d'une atrophie de la matière blanche ^{57,58}, ainsi que plus tardivement du thalamus, du cervelet et plus généralement du cerveau entier ⁵⁹.

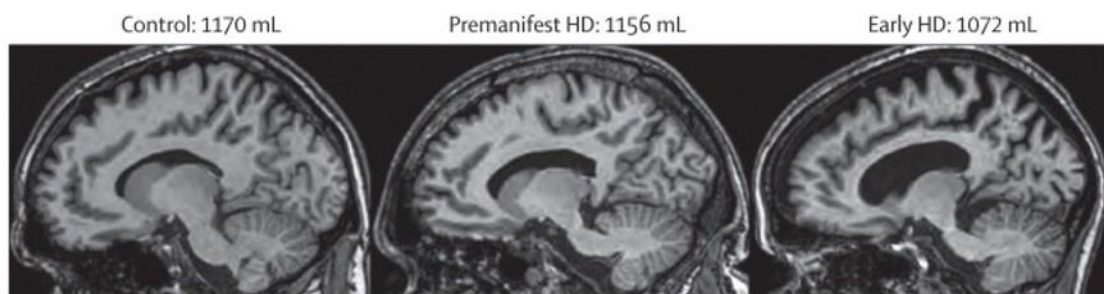


Figure 8 : Volume du striatum chez un témoin sain, un porteur du gène dans la phase présymptomatique et un patient atteint de la MH. Tiré de Tabrizi et al., 2009 ⁵⁹

L'échelle de Vonsattel, une échelle histopathologique, a été établie afin de classifier la sévérité de la maladie avec des grades allant de 0 à 4 ⁶⁰. Elle prend en compte des critères macroscopiques tels que l'atrophie du striatum définie par la courbe du noyau caudé le long du ventricule latéral et microscopiques comme la présence d'une perte neuronale, d'une astroglie et d'une microglie. Le grade 0 correspond à l'absence de marques de la maladie, tant sur le plan microscopique que macroscopique. Le grade 1 définit les patients montrant seulement des atteintes microscopiques, sans atrophie visible. Les grades suivants montrent une atrophie croissante du striatum. Ces grades sont corrélés à la progression des symptômes de la MH ⁶¹.

III.2. Physiopathologie

Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer la dégénérescence préférentielle des neurones corticaux et striataux. Pour comprendre ces mécanismes il est nécessaire de disséquer les conséquences primaires et secondaires des effets toxiques induits par la mutation du gène HTT et l'impact de cette mutation sur la protéine HTT ayant une expansion de polyglutamine.

La littérature sur le sujet montre que l'ensemble de l'homéostasie cellulaire est potentiellement perturbé par la présence de l'HTT mutée. Une simple recherche PubMed [mutant huntingtin] comprend environ 2500 références dont 700 références lorsque cette recherche est associée par exemple avec le terme « dysfonction » ou « neurodegeneration ». Nous ne pourrions présenter en détails l'ensemble des mécanismes cellulaires perturbés par l'HTTm dans cette introduction de thèse.

Pour plus d'information le lecteur pourra se référer à des revues de la littérature touchant les divers processus cellulaires, organelles, voies de signalisation, et voies métaboliques les plus étudiées pour lesquelles l'hypothèse d'un rôle dans la physiopathologie de la MH est bien étayée (tableau II). Les processus cellulaires les plus pertinents par rapports à la présente étude de neuroimagerie par IRM dans les modèles animaux de la MH seront brièvement présentés.

Tableau II : Processus cellulaires et voies de signalisation étudiées dans la MH et revues les détaillant.

Transport axonal	Saudou et Humbert 2016 ⁶² , Illarioshkin et al. 2018 ⁶³
Division cellulaire	Bates et al. 2015 ⁹ , Saudou et Humbert 2016 ⁶²
Ciliogénèse	Bates et al. 2015 ⁹ , Saudou et Humbert 2016 ⁶²
Autophagie et lysosome	Bates et al. 2015 ⁹ , Saudou et Humbert 2016 ⁶²
Dérégulation de la transcription	Cha 2000 ⁶⁴
BDNF et récepteurs	Illarioshkin et al. 2018 ⁶³
Agrégation et protéase	Arrasate et Finkbeiner 2012 ⁶⁵
Altérations épigénétiques	Francelle et al. 2017 ⁶⁶ , Bassi et al. 2017 ⁶⁷
Métabolisme énergétique et mitochondries	Browne 2008 ⁶⁸ , Dubinsky 2017 ⁶⁹
Excitotoxicité	Fan et Raymond 2007 ⁷⁰
Atteintes gliales	Wilton et Stevens 2020 ⁷¹

Vieillessement cellulaire et réparation de l'ADN	Machiela et Southwell, 2020 ⁷²
Signalisation MAP kinase	Bowles et Jones 2014 ⁷³
Signalisation du développement	Wiatr et al. 2018 ⁷⁴
Protéasome et ubiquitine	Ortega et Lucas 2014 ⁷⁵
Cholestérol et lipides	Karasinka et Hayden 2011 ⁷⁶

III.2.a Perte de fonction de la HTT

La HTT est exprimée de façon ubiquitaire et est impliquée dans de nombreux processus cellulaires. Elle est notamment indispensable au développement neuronal. En effet, l'inactivation totale de la HTT mène à la mort au stade embryonnaire ³⁵. Elle intervient également dans une diversité de fonctions, expliquée par la longue liste des modifications post-traductionnelles auxquelles la HTT peut être sujette. Celles-ci incluent phosphorylation, acétylation, palmitoylation, ubiquitylation et sumoylation ⁶². Ces modifications influent sur la fonction de la HTT par le biais de ses interactions avec des protéines. En effet, le grand nombre de partenaires de la HTT mis en évidence dans plusieurs voies de signalisation semble appuyer l'hypothèse d'un rôle d'échafaudage de la HTT ⁷⁷. Elle agirait ainsi comme un nœud qui coordonne les interactions protéines-protéines.

Une perte de fonction liée à la mutation pourrait perturber ces interactions et altérer les processus biologiques dans lesquels la HTT est impliquée. Actuellement, les recherches biochimiques ont mis en évidence plus de 270 potentiels partenaires protéiques de l'HTT sauvage et/ou mutée, soulignant le large spectre de fonctions cellulaires impliquant l'HTT. Nous ne décrivons pas toutes ces voies de signalisation en détails dans cette introduction. Le lecteur pourra néanmoins se référer à d'excellentes revues de la littérature décrivant ces voies de signalisations et processus biologiques impliquant l'HTT.

Les fonctions les plus pertinentes dans le cadre de cette thèse sont introduites ci-dessous.

III.2.a.i. Transport axonal

Ainsi, la HTT interagit avec la dynéine et la dynactine via la HAP1 (*Huntingtin Associated Protein 1*, protéine associée à la huntingtine 1) afin de former une structure contrôlant le transport vésiculaire, d'autophagosomes, d'endosomes et de lysosomes ⁷⁸. La réduction de HTT a montré une altération du transport axonal chez la drosophile ⁷⁹.

III.2.a.ii. Division cellulaire

La protéine coordonne également la division cellulaire. En effet, lors de la mitose, la HTT est exprimée au niveau des fuseaux mitotiques où elle participe au transport du complexe dynéine/dynactine/NUMA/LGN sur les microtubules astraux⁸⁰. Une perte de fonction de la HTT mène donc à un mauvais positionnement des fuseaux mitotiques dû à la perte de ce transport.

III.2.a.iii. Ciliogénèse

La HTT est indispensable à la ciliogénèse. En effet, on retrouve la protéine dans la structure de plusieurs types de cils, notamment les cils primaires neuronaux. Elle interagit avec la dynéine, la dynactine et HAP1 au niveau du centrosome afin de transporter PCM1, une protéine nécessaire à la ciliogénèse⁸¹. L'absence de HTT empêche le bon transport de cette protéine et la formation du cil primaire.

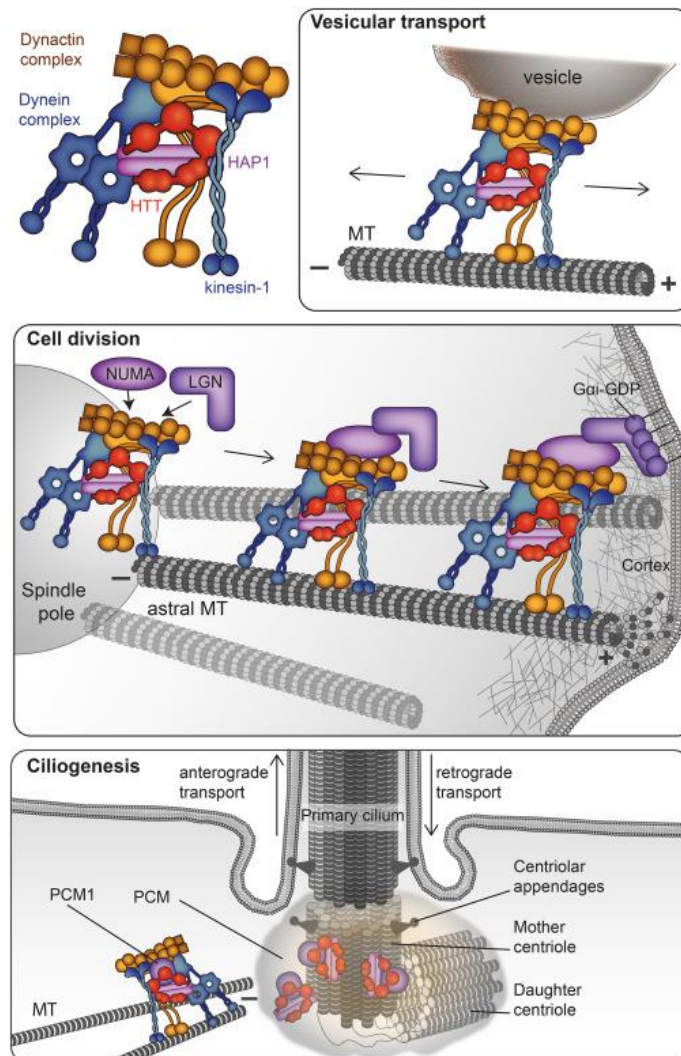


Figure 9 : Processus biologiques faisant intervenir la HTT impactés par sa perte de fonction d'échafaudage. Tiré de Saudou et Humbert, 2016⁶²

III.2.a.iv. Autophagie

A travers son interaction avec l'optineurine /Rab8, la HTT semble également réguler la balance autophagosomes/lysosomes et ainsi jouer un rôle dans l'autophagie. De plus, un site de fixation de p62 a été découvert dans la protéine. Ce dernier permet, lorsque p62 y est fixé, de reconnaître les protéines ubiquitinylées et de faciliter leur transport dans l'autophagosome ⁸².

III.2.a.v. Transcription

La HTT est présente majoritairement dans le cytoplasme des cellules, mais une petite quantité se trouve également dans le noyau, où elle semble avoir un rôle dans la transcription. En effet, l'expansion polyQ, en condition saine, est typique des facteurs de transcription. De plus, de nombreux facteurs de transcription partenaires de la HTT ont été mis en évidence. Ainsi, par son interaction avec la protéine p53, la HTT peut avoir une influence sur la transcription des gènes régulés par cette protéine, qui ont un rôle dans le contrôle du cycle cellulaire, l'apoptose ou encore la réparation de l'ADN. La Huntingtine sauvage promeut également l'expression de BDNF (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*, Facteur neurotrophique dérivé du cerveau), un facteur de croissance produit par les neurones corticaux et nécessaire à la survie des neurones striataux ⁸³. La perte de fonction de la HTT pourrait donc participer à la vulnérabilité particulière des NEMs en diminuant l'expression de BDNF.

III.2.a.vi. Endocytose

Enfin, la réduction de HTT mène à l'inactivation de la dynamine 1 et à l'inhibition de l'endocytose, suggérant une implication dans le processus d'endocytose. Par la suite, la HTT régulerait également le transport endosomal par interaction avec la protéine HAP40 qui lui permet de se fixer sur les filaments d'actine, permettant ainsi le passage de l'endosome des microtubules vers le cytosquelette d'actine ⁸⁴.

III.2.b Toxicité de la HTTm

En plus d'une perte de fonctions de l'HTT sauvage, un gain de fonctions « toxiques » induit par la présence de l'HTT mutée (HTTm) contribue à la dysfonction et la dégénérescence neuronale ⁸⁵ et à l'altération d'autres types de cellules cérébrales tels que les astrocytes, les microglies et les oligodendrocytes.

III.2.b.i. Agrégation

Depuis plusieurs décennies, les résultats expérimentaux ont montré que l'HTT est clivée naturellement par différentes protéases générant des peptides aux rôles encore mal compris. La recherche sur la MH s'est beaucoup focalisée sur la toxicité des fragments N-terminaux courts contenant le fragment polyQ, très toxiques pour les neurones. Ces fragments courts existent dans les cerveaux des patients. Ils

s'accumulent dans le noyau des neurones et provoquent en quelques jours la mort cellulaire lorsqu'ils sont surexprimés dans les modèles cellulaires. Néanmoins, des fragments C-terminaux sont également créés, bien que moins visibles, et dérèglent l'activité de la dynamine, jouant aussi un rôle toxique ⁸⁶.

La mutation provoque également une mauvaise conformation de la HTTm qui mène à l'agrégation de la protéine, formant au niveau macroscopique ce qu'on appelle des inclusions ou agrégats, observables au microscope ⁶⁵. Les inclusions sont intra-nucléaires (positives également pour l'ubiquitine). Les petits agrégats sont trouvés dans le compartiment somato-dendritique des neurones. Le rôle de ces accumulations sur la physiopathologie de la MH est débattu. Des effets potentiellement contradictoires ont été rapportés quant à ces inclusions. D'une part, certaines études ont montré une toxicité liée à l'interférence avec les fonctions cellulaires, qui mènerait à la mort de la cellule ⁸⁷. D'autre part, il a été suggéré qu'elles pourraient avoir un rôle neuroprotecteur car elles concentreraient les espèces toxiques et réduiraient ainsi leur concentration dans la cellule ⁸⁸. Ces inclusions sont d'ailleurs plus importantes dans les grades plus avancés de Vonsattel, ce qui suggère qu'elles se développent dans les neurones qui survivent le plus longtemps ⁸⁹. Par ailleurs, la conformation anormale de l'HTTm induirait des espèces agrégées de faibles poids moléculaires (invisibles au microscope) qui interagiraient anormalement avec certaines protéines, induisant des anomalies cellulaires dans divers processus.

Étonnamment, bien que le striatum soit la structure la plus affectée dans la MH, les inclusions sont plus présentes dans les neurones corticaux ⁸⁹. De même, seulement 1 à 4% des NEMs présentent des agrégats nucléaires de fragments N-terminaux selon le grade. De plus, il a été montré chez un modèle souris de la MH que la mort neuronale pouvait survenir malgré l'absence d'agrégats ⁹⁰; et qu'à l'inverse un phénotype asymptomatique pouvait montrer une importante quantité d'inclusions ⁹¹. Toutes ces espèces toxiques semblent donc contribuer à la pathogénèse mais ne permettent pas d'expliquer la vulnérabilité des NEMs.

III.2.b.ii. Voies de signalisations

Une autre piste pour comprendre cette vulnérabilité est le gain de fonction de la HTTm. A l'instar de la HTT sauvage qui a un rôle prépondérant dans la transcription, la HTTm semble pouvoir interagir avec des facteurs de transcription et déréguler l'expression de gènes importants ⁶⁴. Ainsi, Dans une étude présentant les transcriptomes obtenus par séquençage de cellule unique (*single nucleus RNA-seq*) de toutes les cellules issues du striatum de patients de la MH en comparaison avec des tissus témoins, Al-Dalahmah et al. montrent plus de 2000 gènes exprimés différemment dans la MH ⁹². En particulier, ce mécanisme pourrait être à l'origine du phénomène d'excitotoxicité qui a été largement décrit dans la MH ⁷⁰.

L'excitotoxicité définit la mort de neurones due à un neurotransmetteur excitateur, le glutamate. Un phénomène chronique d'excitotoxicité donnerait lieu à une surcharge calcique dans le neurone qui entraîne l'activation d'enzymes délétères qui amènent à la mort neuronale. Ce phénomène a été observé dans le striatum de souris modèles de la MH au niveau des synapses cortico-striatales ⁹³. Plusieurs facteurs, causés par l'altération de la transcription, semblent expliquer la vulnérabilité des NEMs à l'excitotoxicité (voir figure 10). Le flux de glutamate en provenance des NCPs est augmenté, les cellules gliales capturent moins de glutamate et les récepteurs N-méthyl-D-aspartate (NMDA) sont hypersensibles au glutamate. La combinaison de ces facteurs mène à une importante entrée d'ions Ca^{2+} dans le NEM post-synaptique, menant à la mort neuronale par excitotoxicité.

En plus de son rôle dans l'excitotoxicité, la dérégulation transcriptionnelle impacte également la synapse cortico-striatale en altérant le transport du BDNF. Comme pour l'excitotoxicité, plusieurs mécanismes complémentaires interviennent dans la dérégulation de ce facteur. L'expression de BDNF est réduite dans les NCPs dans la MH ⁸³. De plus, comme déjà indiqué, la HTT sauvage joue un rôle dans le transport vésiculaire du BDNF ⁹⁴. Non seulement ce rôle est victime de la perte de fonction de la HTT, mais la HTTm est de plus susceptible de bloquer le transport par interaction avec les complexes protéiques en jeu. L'absence de BDNF mène à un phénotype similaire à celui de la MH ⁹⁵. Ce mécanisme peut donc expliquer, au moins en partie, la vulnérabilité des NEMs.

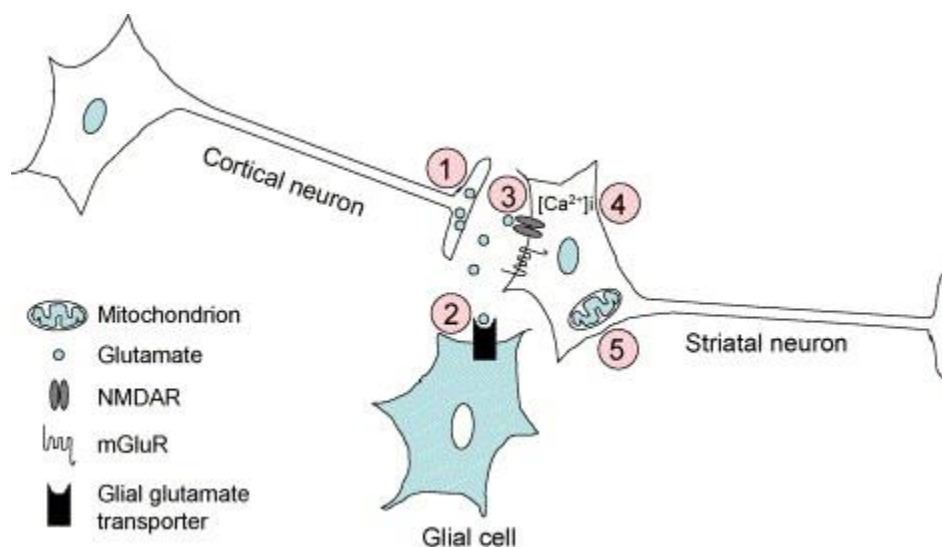


Figure 10 : Synapse cortico-striatale dans la MH et les possibles dysfonctions menant à l'excitotoxicité. 1) Augmentation du flux afférent de glutamate. 2) Absorption réduite de glutamate par les cellules gliales. 3) Dérégulation des récepteurs NMDA post-synaptiques. 4) Homéostasie intracellulaire calcique altérée. 5) Dysfonction mitochondriale. Tiré de Fan et al., 2007⁷⁰

III.2.b.iii. Atteintes métaboliques

Le métabolisme cellulaire semble être altéré dans la MH par le biais de plusieurs mécanismes ⁸⁵. Tout d'abord, en conséquence des mécanismes de gain de fonction et de toxicité décrits ci-dessus. En effet,

la protéolyse de la HTTm ou encore le transport des inclusions nécessitent de l'énergie et perturbent ainsi la balance énergétique. Mais la HTTm a également une influence sur l'activité des mitochondries⁶⁸. Cette atteinte mitochondriale semble participer à la vulnérabilité des NEMs face à la MH. En effet, un des premiers modèles animaux de la MH a été un modèle rat induit par l'injection systématique d'acide 3-nitropropionique (3NP), une toxine mitochondriale⁹⁶. Les rats développent alors une atrophie préférentielle du striatum rappelant celle que l'on observe dans la MH.

Les atteintes mitochondriales incluent une diminution du complexe II de la chaîne respiratoire, une altération des niveaux d'ATP, une baisse du potentiel membranaire des mitochondries et une capacité réduite à maintenir une concentration de Ca^{2+} stable⁹⁷. Le transport des mitochondries semble également altéré⁹⁸. Par ailleurs, la morphologie des mitochondries est anormale en présence de HTTm, probablement à cause de la perturbation de l'activité de la protéine DRP1 (*GTPase dynamin-related protein-1*) qui régule le mécanisme de fusion-fission des mitochondries, ce qui conduit à leur fragmentation⁹⁹.

Si le problème dans la chaîne respiratoire semble survenir tardivement dans la progression de la maladie, comme une conséquence d'autres altérations transcriptomiques ou métaboliques, la perte de capacité à maintenir l'homéostasie de Ca^{2+} semble être un aspect clé de la vulnérabilité des neurones striataux. En effet, comme décrit plus haut, ces derniers reçoivent d'importantes quantités de glutamate excitateur. Par ailleurs, une localisation anormale des récepteurs NMDA (NR2B) dans la membrane extrasynaptique contribuerait à rendre la voie glutamatergique toxique. Les mitochondries sont supposées capturer rapidement et en grande quantité le Ca^{2+} entrant ainsi lors de flux calciques. La perte de cette fonction participerait à l'excitotoxicité. Cette atteinte énergétique chronique conduisant à un phénomène d'excitotoxicité secondaire a été appelé « excitotoxicité indirecte »^{100,101}. Cette hypothèse ancienne a été réévaluée plus récemment, montrant par des expériences *in vitro* et *in vivo* qu'une atteinte mitochondriale partielle augmente considérablement la sensibilité du striatum aux processus excitotoxiques, via une altération de la gestion du calcium intracellulaire¹⁰². L'hypothèse d'excitotoxicité dans la MH est aussi appuyée par des observations expérimentales récentes dans différents modèles rongeurs, dont les souris transgéniques YAC128¹⁰³.

III.2.c Rôle des cellules gliales

La HTTm n'est pas seulement exprimée dans les neurones, et si le rôle des cellules gliales dans la pathogénèse de la MH a longtemps été laissé de côté, de plus en plus d'études prennent en compte l'impact de la mutation sur les fonctions astrocytaires ou oligodendrocytaires. La présence d'agrégats de HTTm a été détectée dans le noyau des cellules gliales issues de cerveaux de souris modèles de la MH¹⁰⁴. Dans les astrocytes et les oligodendrocytes, les agrégats sont moins nombreux et apparaissent

plus tardivement que dans les neurones. De plus, ils ne semblent pas provoquer de mort cellulaire. Seules quelques inclusions ont été retrouvées dans le noyau des microglies¹⁰⁵. Les cellules gliales, en particulier les microglies, semblent donc avoir une meilleure capacité à éliminer les agrégats de HTTm.

III.2.c.i. Astrocytes

Les astrocytes ont un rôle de support pour les neurones, leur fournissant notamment leur énergie, maintenant l'homéostasie ionique au niveau des synapses, participant à la synaptogénèse et stabilisant la barrière hémato-encéphalique⁷¹. La co-culture neurone-astrocyte de neurones exprimant la HTTm avec des astrocytes sains permet de secourir le niveau de microtubules observé par immunohistochimie, tandis qu'avec des astrocytes exprimant également la mutation, la protection est significativement moins élevée. Des astrocytes exprimant la HTTm induisent même la mort cellulaire de neurones exprimant la HTT sauvage avec lesquels ils sont en co-culture¹⁰⁴.

La concentration de K⁺ extracellulaire a été mesurée augmentée dans des modèles souris de la MH¹⁰⁶. L'augmentation de la concentration de K⁺ dans le striatum de cerveaux sains mène à la mort neuronale par excitotoxicité de façon similaire à la MH. Un déficit au niveau de la régulation du niveau de K⁺ extracellulaire par les astrocytes semble donc participer à la pathogénèse. L'expression de récepteurs Kir4.1, impliqués dans l'homéostasie du K⁺, dans les astrocytes striataux permet de réduire le phénotype de souris modèles de la MH et de rallonger leur durée de vie.

De façon similaire, la régulation de glutamate extracellulaire par les astrocytes semble altérée dans la MH. L'expression des transporteurs du glutamate GLAST et GLT-1 dans les astrocytes est réduite dans un modèle exprimant la HTTm spécifiquement dans ces cellules¹⁰⁷. Cela se traduit par une concentration anormalement élevée de glutamate au niveau de la synapse, qui participe directement à l'excitotoxicité dans les NEMs.

La dérégulation des transporteurs de glutamate est accompagnée d'une réactivité astrocytaire accrue dans la MH. Une classification des astrocytes en 4 niveaux de réactivité a été proposée par analyse transcriptomique⁹² (figure 11). Cette analyse montre que dans les tissus témoins, les astrocytes quiescents, c'est-à-dire non réactifs, représentent environ 50% de la population d'astrocytes, contre 6,5% dans les tissus pathologiques. La réactivité astrocytaire est donc augmentée dans la MH.

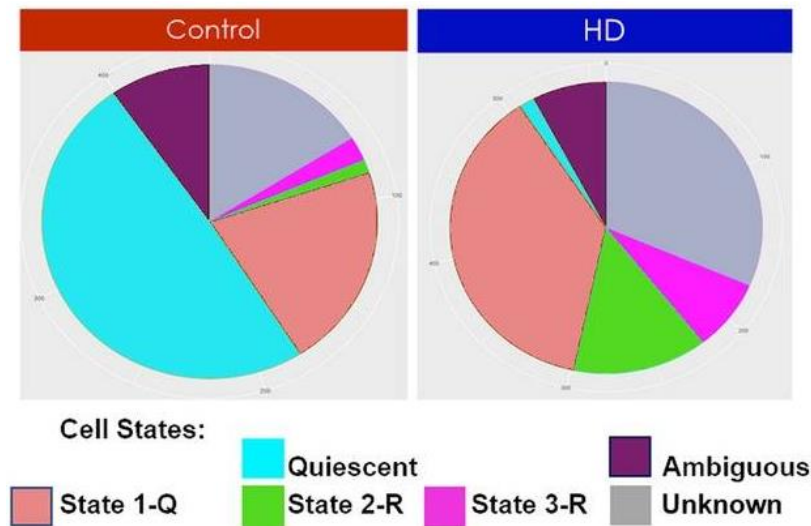


Figure 11 : Répartition des différents types d'astrocytes réactifs dans la MH (à droite) et un témoin sain (à gauche). Le marron et le gris représentent les astrocytes appartenant à plusieurs et aucune classe respectivement. Tiré de Al-Dalahmah et al., 2020 ⁹².

III.2.c.ii. Microglies

Les microglies sont les cellules immunitaires du cerveau, remplaçant les macrophages et remplissant également d'autres rôles comme la régulation de la neurogénèse, la supervision de la maturation des oligodendrocytes et de la myélinisation ou encore le modelage des circuits neuronaux pendant le développement ⁷¹.

Un changement structurel a également été montré chez la microglie de façon très précoce dans un modèle souris de la MH ¹⁰⁸. Le soma de ces cellules s'élargit tandis qu'elles présentent moins de branches. Ces cellules présentent également un défaut de mobilité, avec une vitesse décrie ⁷¹. Ces changements pourraient traduire leur capacité accrue de phagocytose. De plus, plusieurs cytokines, des protéines impliquées dans les mécanismes d'inflammation régulés par les microglies dans le cerveau, sont surexprimées dans la MH.

III.2.c.iii. Oligodendrocytes

Les oligodendrocytes ont la fonction de produire les feuillets de myéline autour des axones pour accélérer la transmission des signaux électriques inter-neuronaux dans le système nerveux central, rôle assuré en périphérie par les cellules de Schwann. Ce procédé est dynamique et participe à la plasticité synaptique. Comme les astrocytes, les oligodendrocytes ont également un rôle de support pour le métabolisme des neurones avec qui ils échangent notamment du pyruvate et du lactate ⁷¹.

Des altérations de la myéline ont été montrées de façon très précoce dans des modèles rongeurs de la MH. Les feuillets de myéline sont plus fins dans le corps calleux d'animaux malades que d'animaux sains ¹⁰⁹. Ces détériorations apparaissent dès l'âge d'un mois, suggérant un problème au niveau de la

différenciation des oligodendrocytes ou de leur capacité à s'enrouler autour des axones pour démarrer la production de myéline.

La myéline est constituée de protéines présentes en grande quantité comme la protéine MBP (*Myelin Basic Protein*, Protéine de base de la myéline) et la protéine MOG (*Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein*, Glycoprotéine oligodendrocytaire de la myéline). Ces marqueurs de la myéline sont moins exprimés dans les oligodendrocytes du même modèle souris, en corrélation avec l'épaisseur des feuillettes de myéline ¹⁰⁹. Ces altérations s'aggravent avec l'âge des animaux.

Trois mécanismes ont été proposés pour expliquer l'impact de la HTTm sur la fonction oligodendrocytaire. Le premier implique le facteur de transcription PGC1 α qui joue un rôle dans la régulation du métabolisme du cholestérol. L'absence de ce facteur dans un modèle souris donne lieu à une baisse de l'expression de MBP et MOG de façon similaire à la MH ¹¹⁰. Le second mécanisme impliqué est l'interaction anormale de la HTTm avec le facteur de régulation de la myéline (MYRF) qui donne lieu à une réduction de son expression qui conduit au mauvais fonctionnement de la myélinisation ¹¹¹. Enfin, il a été mis en évidence que la HTTm augmentait l'activité du complexe PRC2, impliqué dans la spécification cellulaire et la différenciation, et que cette augmentation résulte en une mauvaise maturation des oligodendrocytes ¹¹².

Pour récapituler, la MH provoque donc des dysfonctionnements des oligodendrocytes au niveau de la maturation, du métabolisme et de la régulation. Ces altérations mènent à une dégradation des feuillettes de myéline qui sont plus fines. Cela pourrait mener à une altération de la matière blanche.

III.3. Vulnérabilité de la matière blanche

La matière blanche est composée de faisceaux de projections axonales. Plusieurs structures de matière blanche existent dans le cerveau. La plus importante en taille est le corps calleux qui permet la communication des régions corticales situées en périphérie entre elles.

Chez les petits mammifères, la génération d'animaux exprimant la protéine YFP (protéine fluorescente jaune) dans les neurones a permis de montrer une dégénérescence axonale dans le corps calleux, bien avant l'apparition des symptômes moteurs ¹¹³(figure 12). La sévérité de la dégénérescence est corrélée à la taille de l'expansion polyQ. De façon surprenante, cette atteinte semble porter spécifiquement sur les projections axonales des neurones corticaux formant le corps calleux. En effet les auteurs n'ont pas détecté de dégradation des axones dans le nerf optique, la moelle épinière ou encore les nerfs sciatiques. Cette dégénérescence axonale est accompagnée d'une complexification de la microstructure, avec une orientation plus dispersée des axones et une réactivité astrocytaire ¹¹⁴. Cette dégénérescence se traduit par une réduction du diamètre de l'axone, une réduction de l'épaisseur de

la myéline, et une augmentation de la tortuosité. C'est pourquoi elle est également visible par imagerie du tenseur de diffusion (DTI), qui permet d'obtenir une indication sur l'anisotropie du milieu. Nous reviendrons en détails sur cette modalité et son application dans la MH dans les prochains chapitres.

Cette dégénérescence mène à une atrophie du corps calleux qui est visible par IRM anatomique dès l'âge de 3 mois dans le modèle souris YAC128 de la MH¹¹⁵. Chez l'homme, en particulier chez le porteur du gène durant la phase présymptomatique, seules les études d'imagerie permettent d'obtenir des informations sur le volume et la structure de la matière blanche. L'atrophie du corps calleux a ainsi été montrée de façon très précoce chez les porteurs du gène à un temps éloigné de la survenue théorique des symptômes de la maladie⁵⁸. De même, la vitesse d'atrophie en 24 mois est significativement plus élevée chez les porteurs du même groupe que chez les sujets sains.

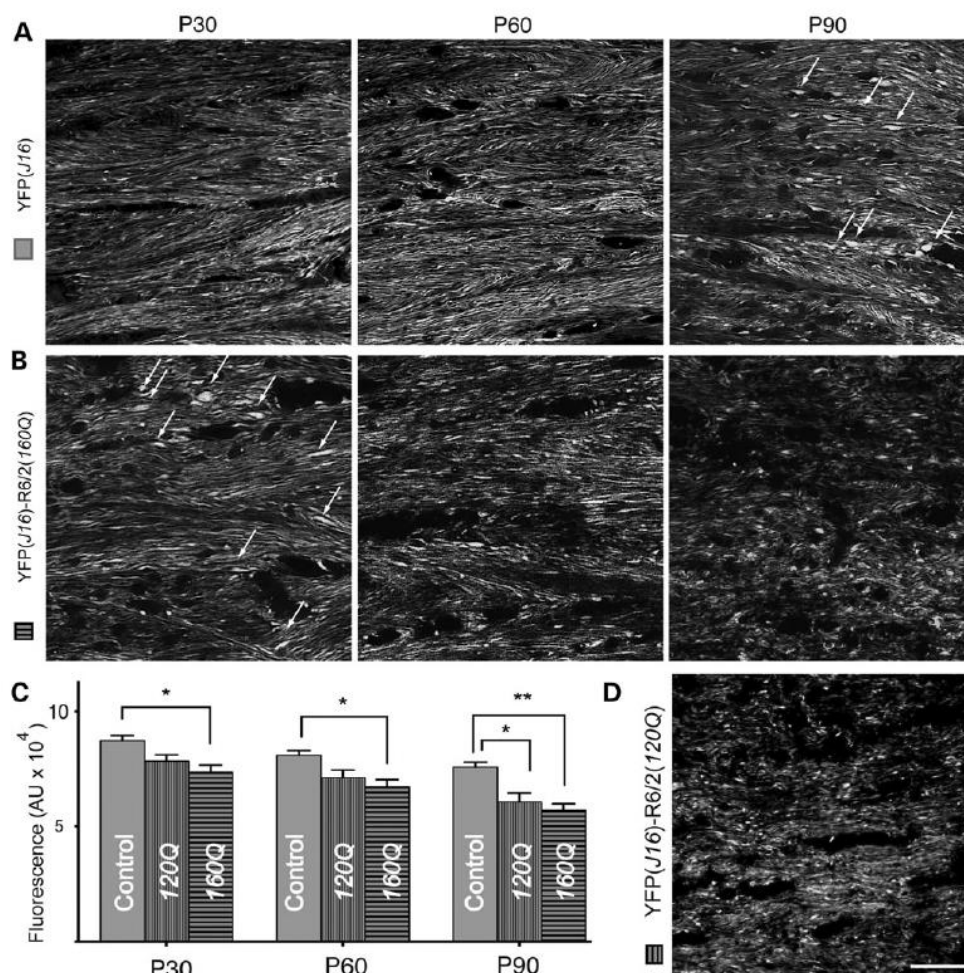


Figure 12 : Dégénérescence axonale dans le corps calleux de souris modèle de la MH. A) Marquage YFP montrant les fibres axonales chez les souris témoins à 1, 2 et 3 mois. B) Le même marquage chez les souris modèles de la MH montre une dégénérescence progressive des fibres axonales ainsi qu'une perte de l'alignement. C) Les fibres sont significativement moins nombreuses chez les souris exprimant 160 CAG dès un

mois, et chez les souris exprimant 120 CAG à 3 mois. D) Les souris exprimant 120 CAG montrent une dégénérescence moins sévère. Tiré de Gatto et al. 2015 ¹¹³

L'imagerie du Tenseur de Diffusion a permis de montrer une réduction de l'anisotropie dans le corps calleux des patients Huntington, et même chez les porteurs durant la phase prodromale ¹¹⁶. L'imagerie en transfert d'aimantation (MT) a montré une réduction de la fraction macromoléculaire de protons dans la matière blanche de patients de la MH ¹¹⁷. Cette valeur est en lien avec la myélinisation des fibres axonales. Enfin, l'imagerie T₂* a permis de montrer une baisse du niveau de fer dans le corps calleux chez des patients ayant récemment déclaré la MH ¹¹⁸. Cette donnée pointe une altération des fonctions oligodendrocytaires qui nécessitent du fer pour la myélinisation. Au global, ces résultats semblent indiquer une dégénérescence axonale similaire à ce qui peut être observé chez les modèles animaux.

Malgré ce qui avait pu être affirmé lors des premières études morphométriques sur la MH ¹¹⁹, de plus en plus d'évidences semblent donc montrer que la matière blanche dégénère de manière indépendante de la matière grise, à cause de dysfonctionnements oligodendrocytaires. Cette multiplicité des voies de pathogénèse et la précocité de certaines observations ont mis la communauté scientifique sur la piste d'une cause développementale de la MH.

III.4. Hypothèse développementale

Une littérature de plus en plus fournie expose l'hypothèse d'une cause développementale à la maladie de Huntington. En effet, rappelons que l'inactivation totale de la HTT est léthale pour l'embryon ³⁵, démontrant l'importance de cette protéine dans la neurogénèse. Dans un modèle souris exprimant très faiblement la HTT lors du développement, on observe des anomalies dans la structure du striatum, ainsi qu'une dégénérescence axonale et une perte de myéline à 12 mois ¹²⁰. De plus, l'inactivation sélective de la HTTm dans les progéniteurs oligodendrocytaires permet de secourir le phénotype moteur de souris modèles de la MH ¹¹². C'est également au niveau neurodéveloppemental que pourrait intervenir le facteur de transcription du métabolisme du cholestérol PGC1 α . En effet son expression est à son maximum lors du pic de myélinisation postnatale ¹²¹. PGC1 α semble donc jouer un rôle dans la myélinogénèse à un stade précoce. La réduction de près de 50% du nombre d'axones myélinisés 14 jours après la naissance chez un modèle murin exprimant la HTTm ayant 250 répétitions CAG montre l'impact que cette dernière a sur la myélinisation développementale. Enfin, l'analyse de tissus corticaux issus d'embryons humains porteurs du gène *HTT* muté a montré une baisse des progéniteurs neuronaux, ceux-ci se spécifiant de façon précoce ¹²²(figure 13).

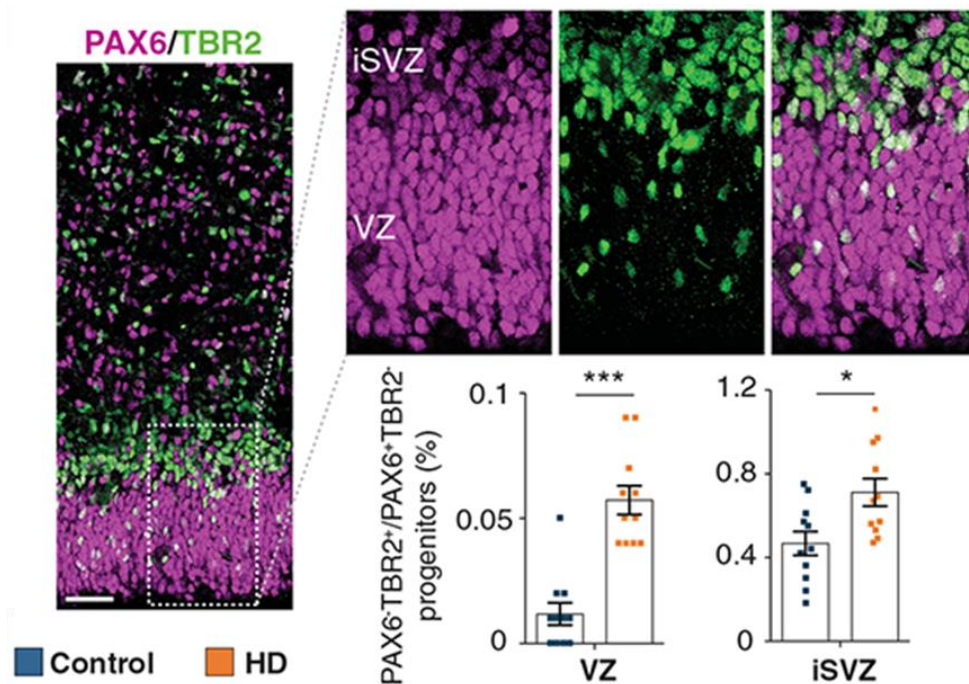


Figure 13 : Différenciation prématurée des progéniteurs neuronaux dans les tissus corticaux embryonnaires.

Marquage immunohistochimique des progéniteurs apicaux (PAX6 en rose) et basaux (TBR2 en vert). Les progéniteurs basaux sont plus avancés dans la spécification en lignée neuronale. La proportion de progéniteurs basaux est plus élevée dans les tissus d'embryons porteurs de la MH que dans les tissus témoins, dans la région ventriculaire (VZ) et la région sousventriculaire interne (iSVZ). Adapté de Barnat et al. 2020¹²².

Ces altérations ont des conséquences macroscopiques. Une hypertrophie des structures de la matière grise a été mise en évidence chez la souris modèle de la MH à l'âge de 3 semaines, ainsi que chez l'enfant porteur de la maladie. De façon intéressante, ces structures retrouvent un volume normal par la suite, avant de s'atrophier. De même, la myélinisation anormale lors du développement est suivie d'une période où d'apparence les axones sont sains. Néanmoins, il semble que les altérations du développement neuronal et de la myélinisation précoce provoquent des modifications dans l'homéostasie qui mènent à long terme à la dégénérescence préférentielle des NEMs.

La description de l'état des connaissances sur la pathogénèse dans la MH nous a permis d'aborder les théories de vulnérabilité de la matière blanche et de contribution développementale de cette maladie sur lesquelles se sont appuyées cette thèse. En effet, la première étude longitudinale (voir chapitre VII) porte sur l'évaluation de biomarqueurs d'IRM et l'étude de la pathogénèse dans le modèle souris Ki140 de la MH. Avant d'exposer ces résultats, nous allons poursuivre cette introduction avec la description des modèles rongeurs des maladies à PolyQ puis nous présenterons les modalités d'IRM utilisées.

Chapitre IV : Modèles animaux des maladies à PolyQ

La recherche médicale se heurte à des problèmes pratiques en clinique. En effet, quelle que soit la pathologie étudiée, la grande diversité de symptômes, de génotype et de facteurs environnementaux présente chez l'homme oblige à accroître le nombre de sujets pour obtenir un résultat statistiquement significatif. De plus, l'essai de nouvelles molécules pharmacologiques peut représenter un danger pour la santé des sujets. Enfin, la recherche clinique est coûteuse et demande beaucoup de temps. Pour toutes ces raisons, l'utilisation de modèles animaux est nécessaire en recherche médicale.

En particulier dans le cas des maladies à PolyQ, l'étude clinique de la pathogénèse est de plus complexifiée par la rareté des patients pouvant entrer dans les protocoles de recherche et constituer des groupes homogènes au niveau de l'avancement de la maladie par exemple. De plus, comme mentionné dans le chapitre I, afin de traiter la maladie avant l'apparition de symptômes dus à une dégénérescence irréversible, dans l'idéal beaucoup d'études devraient se placer durant la phase présymptomatique de la maladie. Les changements étant très lents et subtils durant cette phase, on comprend que l'obtention de résultats significatifs chez l'homme demande le déploiement de moyens conséquents.

Pour répondre à ce constat, des lignées de rat et de souris modifiées génétiquement ont été créées afin de modéliser la maladie. Ces modèles, exprimant différentes formes d'HTT, développent des atteintes cérébrales et comportementales qui rappellent celles observées chez les patients ayant la MH. L'étude de ces modèles présente plusieurs avantages. D'une part elle permet d'obtenir des cohortes conséquentes en peu de temps grâce à une vitesse de reproduction très rapide. De plus, ces cohortes sont très homogènes avec un génotype très proche entre les animaux, ce qui permet de diminuer la variabilité interindividuelle. D'autre part, l'espérance de vie relativement courte des rongeurs permet de transposer l'évolution de la maladie qui prend plusieurs années chez l'homme à quelques mois voire semaines chez l'animal. Ainsi, il est plus robuste et plus facile d'étudier un processus biologique précis ou d'évaluer l'efficacité thérapeutique d'un médicament candidat sur cette échelle de temps. Enfin, certaines mesures ou essais thérapeutiques expérimentaux ne peuvent pas être testés directement chez l'homme pour des raisons éthiques ou bien techniques. Notamment, l'étude de modèles rongeurs sur les aimants précliniques à très haut champ (11.7T) offre des possibilités d'analyses sur le cerveau *in vivo* qui sont plus difficiles à implémenter sur des IRM cliniques. Dans ce chapitre, nous mettrons en avant les intérêts des modèles animaux pour l'étude de la MH et nous

présenterons plus spécifiquement les différents modèles génétiques de la MH, en omettant les modèles induits par agents neurotoxiques qui ne permettent pas l'instauration progressive de la maladie.

IV.1. Les modèles de la MH

IV.1.a Modèles transgéniques de la MH

Les modèles transgéniques de la MH expriment un fragment ou bien la totalité du gène *HTT* inséré de façon aléatoire dans le génome. Ces modèles expriment des fragments de HTTm en plus des deux allèles endogènes de *htt* saine. Cela donne lieu à des modèles caractérisés par des atteintes neurologiques et histopathologique sévères en quelques semaines et une espérance de vie réduite.

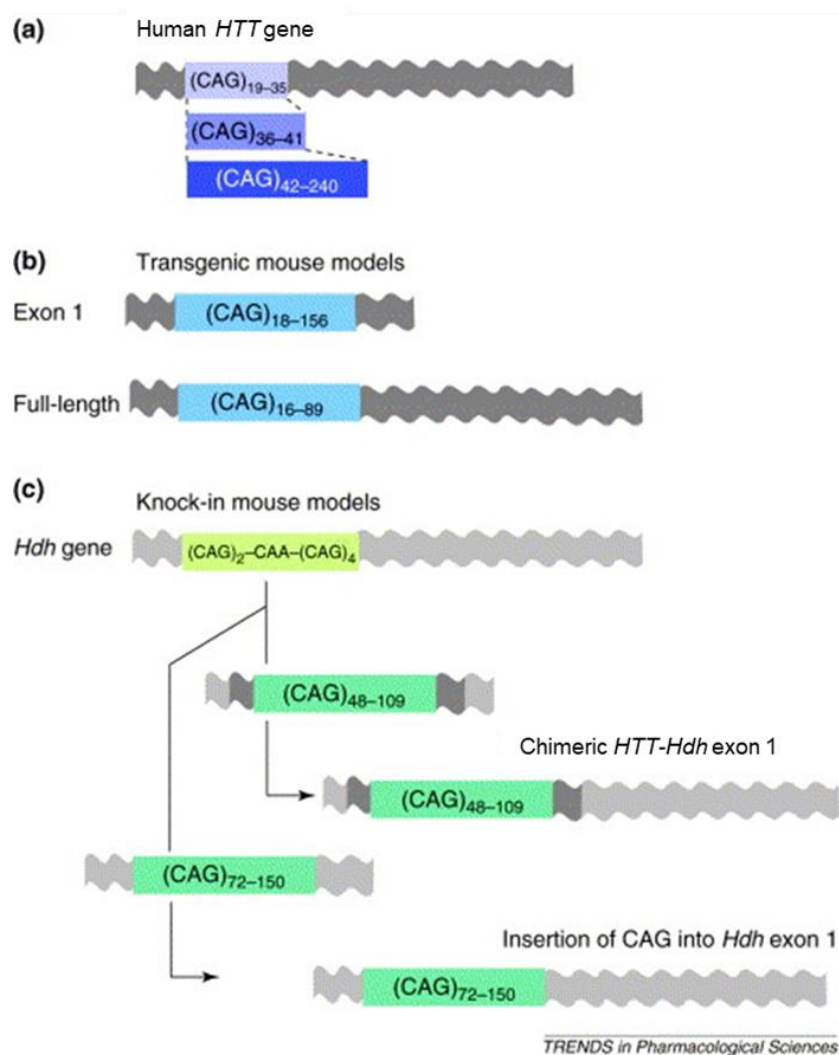


Figure 14 : Constructions génétiques des modèles transgéniques et knock-in. a) La répétition de CAG se trouve dans l'exon 1 du gène *HTT* humain. La longueur normale de cette répétition est située entre 19 et 35 CAG. Au-dessus, on arrive à une longueur pathologique à plus de 42 répétitions, alors qu'entre 36 et 41 répétitions la pénétrance est incomplète b) Dans les modèles transgéniques, un fragment ou la totalité du gène *HTT* muté est inséré de façon aléatoire dans le génome de la souris. c) Les modèles knock-in sont générés par insertion de la

répétition CAG dans le gène Hdh, homologue endogène de HTT, ou bien par création d'un exon chimérique HTT-Hdh. Adapté de Menalled et Chesselet, 2002¹²³

IV.1.a.i. Le modèle souris R6/1

Le modèle R6/1 est le tout premier modèle transgénique de la MH à avoir été développé. Ce modèle surexprime l'exon 1 entier du gène *HTT* avec environ 116 répétitions CAG. Ce dernier est exprimé via le promoteur de la HTT humaine, exprimé de façon ubiquitaire¹²⁴. Les souris présentent une espérance de vie réduite, d'environ 10 mois, mais certaines peuvent vivre plus de 12 mois¹²⁵. Le test du Rotarod montre des performances motrices impactées à partir de 14 semaines. De plus, un éventail de défauts cognitifs a été mis en évidence chez ces souris, incluant des altérations de la mémoire spatiale, procédurale, court-terme et long-terme.

L'apparition des agrégats de HTTm est visible dès 2 mois, et a montré une corrélation avec les performances motrices des souris R6/1. Ce modèle a été développé au même moment que le modèle R6/2 plus sévère. Ce dernier a été plus utilisé du fait de sa rapidité de progression et de la robustesse de son phénotype.

IV.1.a.ii. Le modèle souris R6/2

Le modèle souris R6/2 est un des modèles les plus largement utilisés pour l'étude de la MH. Construit en même temps que le modèle R6/1, il exprime un fragment N-terminal de la HTT contenant 144 à 150 CAG¹²⁵. Ce nombre plus élevé que le modèle R6/1 donne naissance à un modèle plus sévère, avec une espérance de vie qui va de 14 à 21 semaines selon les études. Malgré cette rapidité, la pathologie se développe progressivement dans ce modèle. Ces souris présentent rapidement des troubles moteurs qui s'aggravent avec l'âge jusqu'à la mort de l'animal. Ces troubles incluent une performance réduite au Rotarod dès 4 semaines, suivie d'une hypokinésie à 6 semaines, mais aussi une perte de poids et un déficit de force de préhension (*grip strength*). Les souris présentent également des symptômes cognitifs tels qu'une altération de la mémoire à long-terme qui apparaît à 10 semaines ainsi que de la mémoire procédurale, évaluée par le test de la piscine de Morris, visible à 12 semaines¹²⁶.

Sur le plan anatomopathologique, on retrouve des agrégats de HTT dès le premier jour postnatal¹²⁷. Ces inclusions se développent avec l'âge de l'animal et se retrouvent en grand nombre dans l'intégralité du cerveau, en contradiction avec ce que l'on peut observer chez l'homme. Cela peut être dû à l'expression partielle du gène *HTT* muté, ou à l'utilisation d'un promoteur exogène. Malgré cela, les mécanismes de dégénérescence observés dans le modèle R6/2 sont consistants avec ce qui a été observé chez l'homme, tant en termes de défauts d'interactions avec les protéines participant au transport vésiculaire (voir III.2.a) que des altérations transcriptionnelles (voir III.2.c) ou encore des défauts mitochondriaux (voir III.2.d)¹²⁸. Ces défauts se traduisent par une atrophie progressive du

striatum qui est visible à 4 semaines et qui atteint par la suite le néocortex, le corps calleux et l'hippocampe ^{129,130}.

IV.1.a.iii. Le modèle souris N171-82Q

Le modèle N171-82Q, l'un des premiers modèles transgéniques utilisés, exprime ainsi un fragment N-terminal de la HTT, d'une longueur de 171 acides aminés, contenant 82 répétitions CAG ¹³¹. Une autre différence avec les modèles R6/1 et R6/2 tient dans le promoteur utilisé. Dans le cas des modèles R6, ce dernier est le promoteur de la HTT humaine, exprimé de façon ubiquitaire ¹²⁴, tandis que dans le modèle N171-82Q le promoteur utilisé est celui de la protéine prion murine. Cette construction a été développée afin d'étudier spécifiquement l'impact d'agrégats N-terminaux sur la pathogénèse dans les neurones. Contrairement aux souris témoins, qui expriment le même fragment avec seulement 18 CAG, les souris N171-82Q présentent un spectre de symptômes cognitifs et moteurs ainsi qu'une espérance de vie très réduite, les souris mourant vers l'âge de 5-6 mois. Les souris présentent un poids anormalement faible dès 2 mois, suivi par des performances réduites dans le test moteur du Rotarod à 3 mois. Les symptômes cognitifs ont été révélés par le test du *Radial Arm Water Maze* qui évalue les mémoires spatiale et procédurale, impactées dans ce modèle ¹³².

Au niveau histopathologique, les souris N171-82Q montrent une atrophie du striatum avec perte neuronale à 4 mois. Des inclusions intranucléaires ont été observées au même âge chez ces animaux. Le phénotype de ce modèle est cependant assez variable et nécessite plus de sujets pour arriver à une puissance statistique concluante. C'est pourquoi les modèles R6/1 et R6/2 ont été plus utilisés.

D'une façon générale, les modèles transgéniques sont donc des modèles assez sévères, qui présentent un phénotype marqué et une espérance de vie réduite. Ces modèles sont utiles pour l'évaluation rapide de molécules thérapeutiques ou bien la compréhension d'un mécanisme de dégénérescence. Cependant, cette célérité rend plus difficile l'étude des altérations plus subtiles qui ont lieu pendant la phase présymptomatique de la maladie. Par ailleurs, la surexpression de la forme tronquée (fragment court N-terminal) de HTT mutée n'induirait pas les mêmes mécanismes pathogéniques que ceux déclenchés par la HTT entière. La figure 15 récapitule ces caractéristiques en proposant un score de sévérité dans 4 catégories : la motricité, l'espérance de vie, les atteintes histopathologiques et la cognition. Cette notation n'étant pas tirée d'un article, les critères que nous proposons pour déterminer ce score sont détaillés dans le tableau III. C'est une façon synthétique de représenter les caractéristiques des modèles pour aider à la prise de décision dans le choix du modèle lors de la mise au point d'un protocole préclinique.

Tableau III : Critères de notation utilisés pour mesurer la sévérité des modèles animaux.

Score	Motricité	Espérance de vie	Histopathologie	Cognition
0	Aucune atteinte motrice	Pas de réduction de l'espérance de vie	Aucune atteinte histopathologique	Aucune atteinte cognitive
1	Atteinte motrice tardive, détectée par un seul test	Espérance de vie > 18 mois	Présence d'agrégats ou inclusions très localisées en fin de vie	Atteinte cognitive tardive, détectée par un seul test
2	Atteinte motrice plus précoce ou détectée par plusieurs tests	Espérance de vie > 12 mois	Présence d'agrégats ou inclusions très localisées en milieu de vie ou généralisées en fin de vie	Atteinte cognitive plus précoce ou détectée par plusieurs tests
3	Atteinte motrice précoce détectée par un seul test	Espérance de vie > 6 mois	Présence d'agrégats ou inclusions localisées à un stade précoce ou généralisées en milieu de vie	Atteinte cognitive précoce détectée par un seul test
4	Atteinte motrice précoce détectée par plusieurs tests	Espérance de vie < 6 mois	Présence d'agrégats ou inclusions généralisées à un stade précoce	Atteinte cognitive précoce détectée par plusieurs tests

Modèles transgéniques

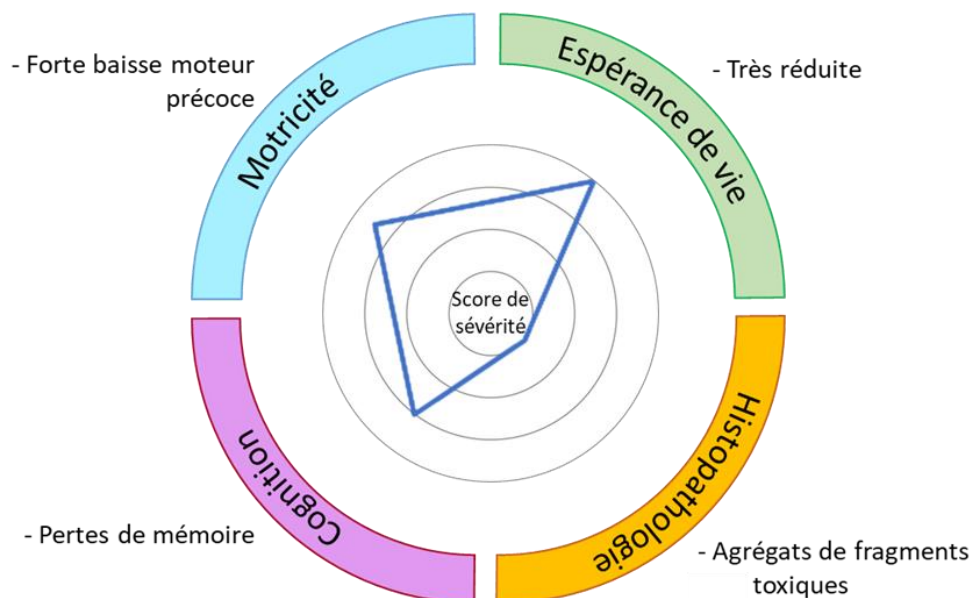


Figure 15 : Schéma récapitulatif des caractéristiques principales des modèles transgéniques

IV.1.b Modèles knock-in de la MH

Dans les modèles « knock-in », la mutation polyQ est insérée directement dans le gène *Hdh*, homologue murin du gène *HTT*. Les animaux peuvent donc être hétérozygotes ou homozygotes à la mutation, avec un phénotype plus sévère chez ces derniers ¹³³. Les modèles knock-in permettent de répondre au besoin de modèles à la progression plus lente. Ce sont des phénotypes moins marqués. Plusieurs modèles ont été ainsi générés avec un nombre de répétitions CAG croissant. Globalement la sévérité du phénotype de ces souris augmente avec la longueur de l'expansion. Des modèles possédant 50, 71, 92, 94 ou 111 répétitions CAG ont ainsi été générés, cependant leur phénotype comportemental est très faible et ces modèles n'ont pas été très étudiés au plan fonctionnel ¹³³. Les modèles avec un plus grand nombre de CAG, en particulier les souris CAG140 et zQ175 (respectivement avec environ 140 et 175 répétitions de CAG) développent une pathologie cérébrale très progressive mais facilement détectable chez les adultes de 6-9 mois d'âge.

IV.1.b.i. Le modèle souris CAG140

Le modèle CAG140 est un modèle knock-in avec 140 répétitions CAG insérées dans l'exon 1 chimérique humain/souris du gène de la Huntingtine. Ce modèle présente un développement lent et progressif des symptômes, notamment au niveau moteur. Les souris homozygotes présentent en effet des anomalies motrices telles qu'une augmentation du nombre de redressements et une hyperkinésie dès l'âge d'un mois. Cet état est suivi d'un retour à la normale à 2 mois puis d'une hypokinésie à 4 mois ¹³⁴. Le test du Rotarod a montré des performances réduites à 4 mois chez les souris CAG140 ¹³⁵. Bien que ce test montre une baisse semblable chez les animaux hétérozygotes et homozygotes, d'autres tests ont montré une progression de la sévérité des déficits locomoteurs en fonction du génotype ¹³⁶. Par ailleurs, sur cette cohorte les atteintes motrices semblent arriver plus tardivement que lors des premières descriptions, possiblement à cause d'une dérive génétique de la lignée. Sur le plan cognitif, seul un défaut de mémoire à long-terme a pu être mis en évidence chez des souris âgées de 4 mois ¹³⁷.

Les souris CAG140 développent également des lésions histopathologiques, en particulier des inclusions intranucléaires. Ces dernières ont été retrouvées dans le striatum, le néocortex, l'hippocampe, le cortex piriforme et les tubercules olfactifs. On trouve également des inclusions semblables à celles observées dans d'autres modèles génétiques et dans le cerveau de patients ayant la MH. Cependant, contrairement au modèle R6/2, les inclusions sont principalement situées dans le striatum et les tubercules olfactifs dans le modèle CAG140, en consistence avec ce qui est observé chez l'homme. Au niveau macroscopique, une atrophie du striatum a été mise en évidence avec une sévérité corrélée au génotype des souris.

IV.1.b.ii. Le modèle souris zQ175

Le modèle souris zQ175 a été développé dans l'objectif de faciliter l'étude de la pathogénèse dans des souris hétérozygotes, par soucis de similarité avec les patients de la MH. Ce modèle a été dérivé du modèle CAG140 avec une expansion CAG plus importante. Malgré ce que son nom semble indiquer, le modèle zQ175 inclue une expansion de 188 répétitions CAG en moyenne ¹³⁸.

Les souris homozygotes montrent une réduction de poids corporel à partir de 5 mois ainsi qu'une espérance de vie légèrement réduite (90 semaines). Sur le plan moteur, de façon surprenante, ce modèle présente une apparition plus tardive des symptômes que le modèle CAG140. Le test du Rotarod permet de détecter une réduction de la performance à partir de 30 semaines et seulement durant la phase nocturne. Les animaux homozygotes montrent une hypokinésie à l'âge de 8 semaines contre 20 semaines pour les hétérozygotes, toujours dans la phase nocturne ¹³⁸. La seule atteinte cognitive découverte est une perte de la mémoire procédurale chez les animaux homozygotes âgés de 10 mois ¹³⁹.

Bien que le modèle ne soit pas très marqué au niveau comportemental, le phénotype anatomopathologique des zQ175 est assez sévère. En effet, l'atrophie du néocortex et du striatum est visible dès 3 mois chez les animaux homozygotes, et à 4 mois chez les animaux hétérozygotes ¹⁴⁰. Les analyses immunohistochimiques sur les tissus cérébraux de souris zQ175 ont mis en évidence la présence d'agrégats de HTTm très répandus dans le cerveau entier. Ces agrégats ont été observés à 6 et 12 mois, avec une augmentation du nombre d'agrégats avec l'âge.

Les modèles knock-in sont donc des modèles peu sévères, avec une apparition progressive des symptômes moteurs et cognitifs et une espérance de vie normale. Ils apparaissent ainsi comme parfaitement adaptés pour l'étude de la phase présymptomatique de la MH. La figure 16 récapitule ces caractéristiques. En particulier, les souris CAG140 hétérozygotes développent des symptômes très tardifs et une atrophie striatale peu prononcée. C'est ce modèle que nous avons choisi d'utiliser pour l'étude de la pathogénèse de la MH (voir Chapitre VIII).

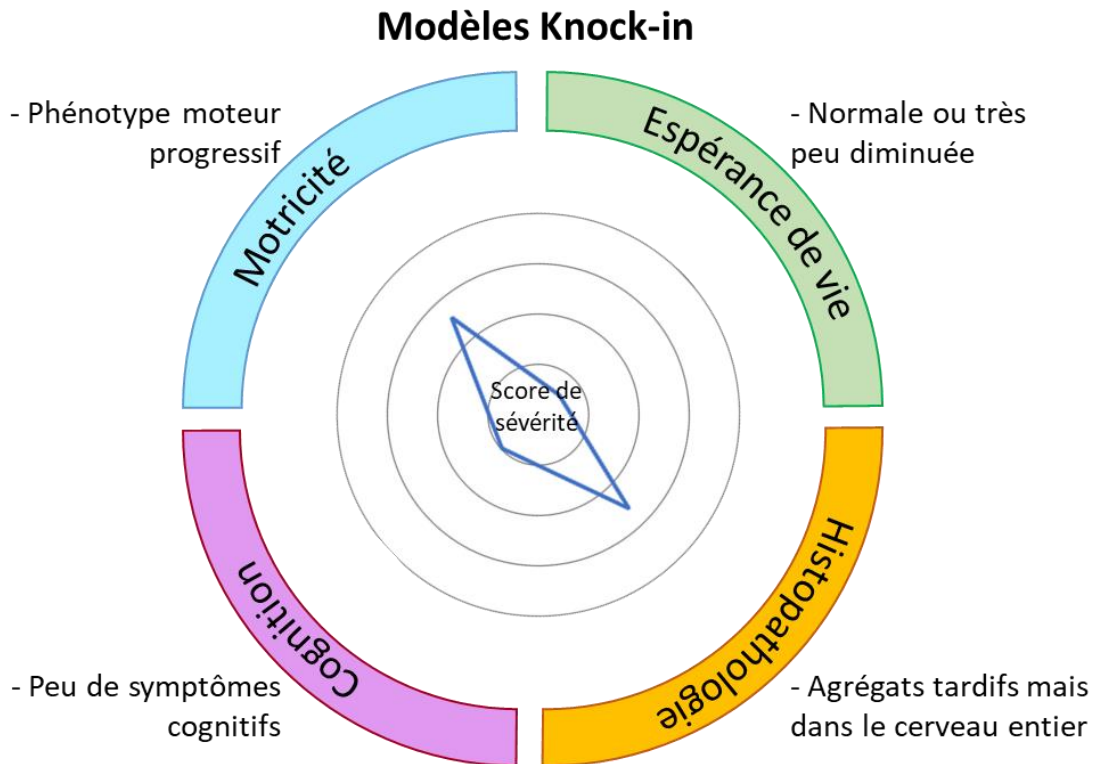


Figure 16 : Schéma récapitulatif des caractéristiques principales des modèles « knock-in »

IV.1.c Modèles exprimant la Huntingtine entière par chromosome artificiel

Un troisième type de modèle génétique a vu le jour après les modèles transgéniques et knock-in. Il s'agit des modèles dans lesquels le gène *HTT* humain est inséré dans son intégralité dans un chromosome artificiel. L'objectif derrière ces constructions est d'obtenir un modèle avec une progression relativement rapide des symptômes, comme les modèles transgéniques, mais une pathogénèse plus proche de la MH clinique grâce à l'expression de la protéine entière, comme dans les modèles knock-in⁹⁰.

IV.1.c.i. Le modèle souris YAC128

Le modèle YAC128 exprime la *HTT* entière avec 128 répétitions CAG via un chromosome artificiel de levure. En plus de la séquence du gène *HTT* en elle-même, le chromosome contient également le promoteur et les éléments de régulation en amont et en aval du gène pour une expression plus fidèle à ce qui se passe chez l'homme⁹⁰. Ces souris présentent une espérance de vie normale et, à l'inverse des autres modèles, un poids augmenté à partir de 32 semaines.

Les souris YAC128 montrent des symptômes moteurs peu sévères tels qu'une performance réduite au test du rotarod à 4 mois ainsi qu'une faible hypokinésie qui apparaît de façon tardive¹⁴¹. Ces troubles moteurs sont précédés de déficiences cognitives, notamment dans l'apprentissage, avec une précision réduite aux tests de tâches d'apprentissage implicite en série et du *Water Maze*¹⁴².

L'immunomarquage à l'anticorps anti-Huntingtine EM48 sur des coupes de cerveau de souris YAC128 révèle l'absence d'inclusions à 12 mois, et leur présence à 18 mois dans les cellules striatales⁹⁰.

IV.1.c.ii. Le modèle souris et rat BACHD

Le modèle BACHD est construit, d'une façon similaire au modèle souris YAC128, par expression de la HTT entière par chromosome artificiel, de bactérie cette fois¹⁴³. Cette construction a été à la fois portée chez la souris et le rat, mais l'analyse comportementale sur les modèles souris reste peu détaillée et limitée à l'étude de l'apprentissage et de la mémoire.

Ces souris ayant une surcharge pondérale importante, les tests moteurs, notamment le Rotarod, sont largement biaisés. On attribue communément les mauvaises performances motrices des souris BACHD à cette surcharge pondérale. Les tests comportementaux ont été plus développés chez le rat. Le modèle rat BACHD, bien que demandant plus de ressources, présente donc un grand intérêt, en particulier pour la modélisation des atteintes cognitives de la MH.

Ce modèle a montré un phénotype moteur très précoce, avec une endurance musculaire en déficit dès l'âge de 2 mois¹⁴⁴. Le test du Rotarod a montré une déficience motrice dès l'âge d'un mois, empirant avec l'âge¹⁴³. Contrairement aux autres modèles exprimant la HTT entière, les rats BACHD ont un poids similaire à celui des rats sauvages. Les déficits moteurs apparents observés chez les rats BACHD ne sont donc pas directement causés par une surcharge pondérale. Le rapport masse grasseuse/masse musculaire est cependant augmenté chez les rats BACHD par rapport aux animaux témoins du même âge, ce qui pourrait expliquer une fatigabilité musculaire supérieure. Il semble par ailleurs que l'apparente déficience motrice constatée chez les jeunes rats BACHD ne soit pas directement liée à des atteintes uniquement motrices mais également à une perturbation de l'émotivité et de la motivation (communication personnelle du Professeur Hoa Nguyen). Les autres troubles cognitifs et moteurs incluent une hypoactivité dans les premiers mois (qualifiée parfois d'apathie) et une diminution de l'anxiété révélée par le test du labyrinthe en croix.

Des agrégats de HTTm sont visibles dans tout le cerveau des rats BACHD, en particulier dans le néocortex, les noyaux accumbens et l'hippocampe.

Les modèles par chromosome artificiel sont donc des modèles intéressants présentant une chronologie plus rapide que les modèles knock-in tout en surexprimant une version complète de la HTT plus adéquate pour modéliser les mécanismes de pathogénèse. Les caractéristiques de ces modèles sont schématisées dans la figure 17. Nous avons choisi le modèle rat BACHD pour conduire la deuxième étude longitudinale qui sera développée au chapitre IX. Dans notre cas le choix d'un modèle rat n'a pas été motivé par la possibilité de réaliser des tests cognitifs avancés mais plutôt par la grande

taille du cerveau comparativement à celui de la souris, ce qui permet l'obtention d'images de qualité par IRM. Par ailleurs, ce modèle a été implanté au laboratoire depuis plusieurs années dans le cadre d'études métaboliques par IRM et MRS (ANR HD-Energy, 2014-2018). Le tableau IV passe en revue les informations principales présentées dans cette section sur les différents modèles de la MH.

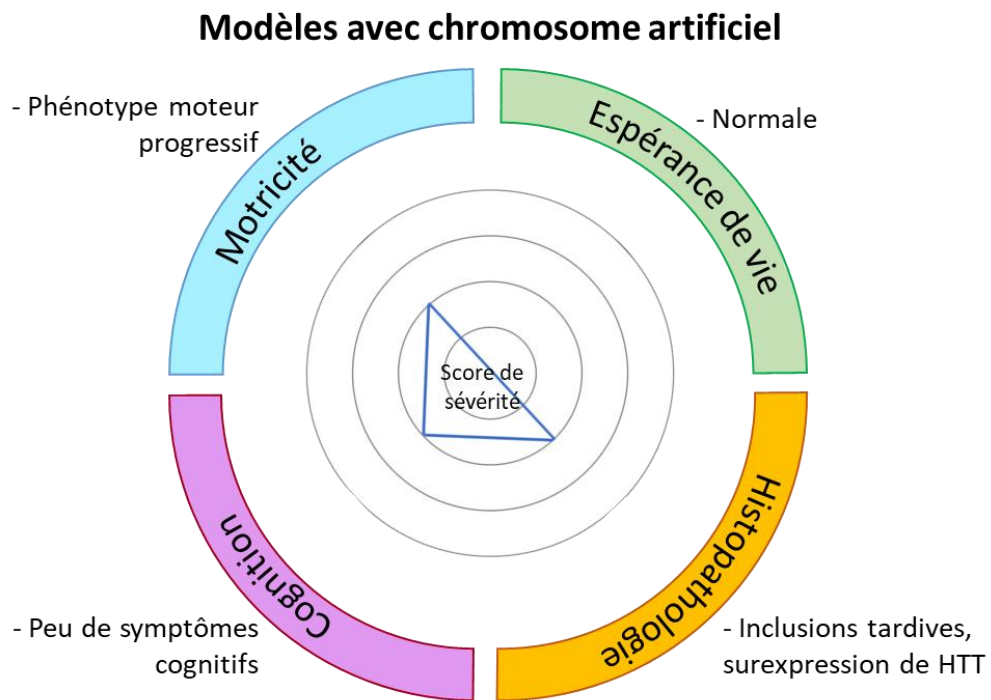


Figure 17 : Schéma récapitulatif des caractéristiques principales des modèles avec chromosome artificiel

Tableau IV : Tableau récapitulatif des caractéristiques principales des différents modèles rongeurs de la MH. La dernière ligne résume les caractéristiques du modèle rat BACHD et non du modèle souris.

		Espérance de vie	Symptômes moteurs	Symptômes cognitifs	Morphométrie	Neuropathologie
Modèles transgéniques	N171-82Q	5-6 mois	Performances réduites au test du rotarod à 3 mois	Mémoires spatiale et procédurale déficientes à 3 mois	Atrophie striatale à 4 mois	Perte neuronale Inclusions intranucléaires à 4 mois
	R6/1	8-10 mois	Performances réduites au test du rotarod à 14 semaines	Mémoires spatiale, procédurale, court-terme et long-terme déficientes à 14 semaines	-	Agrégats à 2 mois
	R6/2	10-13 semaines	Performances réduites au test du rotarod à 6 semaines	Mémoire à long-terme déficiente à 10 semaines, mémoire procédurale déficiente à 12 semaines	Atrophie striatale à 4 semaines. Atrophie du néocortex, corps calleux et hippocampe	Agrégats dès P1
Modèles knock-in	CAG140	Normale	Hyperkinésie à 2 mois, hypokinésie à 4 mois, Performances réduites au test du rotarod à 4 mois	Mémoire à long-terme déficiente à 4 mois	Atrophie striatale à 12 mois	Agrégats dès 2 mois
	zQ175	90 semaines	Hypokinésie à 8 semaines (HMZ), ou 20 semaines (HTZ) Performances réduites au test du rotarod à 30 semaines	Mémoire procédurale déficiente à 10 mois	Atrophie striatale et corticale à 3 mois (HMZ) et 4 mois (HTZ)	Agrégats dès 6 mois
Modèles par chromosome artificiel	YAC128	Normale	Performances réduites au test du rotarod à 4 mois Hypokinésie tardive	Apprentissage et mémoire procédurale déficients à 6 mois	Atrophie striatale à 3 mois, Atrophie du cortex frontal, du septum, du cortex piriforme et du corps calleux	-
	BACHD	Normale	Performances réduites au test du rotarod à 1 mois Endurance musculaire réduite à 2 mois. Hypoactivité dans les premiers mois.	Diminution de l'anxiété	-	Agrégats dès 9 mois

IV.2. Le modèle SCA7^{140Q/5Q}

De façon analogue à la MH, le développement et l'étude de modèles animaux ont été essentiels à une meilleure compréhension des mécanismes de pathogénèse d'ASC7²⁵. Des modèles transgéniques ont permis d'identifier que la rétinopathie dans cette maladie proviendrait d'une perte de fonction de l'ATXN7, possiblement liée à la toxicité de la forme mutée de cette protéine (ATXN7m). Avec la mutation, cette protéine impliquée dans le complexe de co-activation transcriptionnelle SAGA dérégulerait l'expression de gènes liés à la photoréception et ne permettrait pas la bonne différenciation des photorécepteurs. Cependant ces modèles n'ont pas permis d'élucider les mécanismes sous-tendant la dégénérescence des cellules de Purkinje du cervelet qui mène à l'ataxie.

C'est pourquoi l'équipe d'Yvon Trottier, partenaire du projet TreatPolyQ, a récemment développé un nouveau modèle knock-in d'ASC7 possédant 140 répétitions CAG¹⁴⁵. Ce modèle, moins sévère que le précédent modèle knock-in à 266 répétitions dont il est dérivé, permet de récapituler une grande partie des symptômes cliniques d'ASC7. Les souris peuvent être hétérozygotes (SCA7^{140Q/5Q}) ou homozygotes (SCA7^{140Q/140Q}). Comme dans le cas des modèles CAG140 et zQ175 de la MH, l'étude des souris SCA7^{140Q/5Q} paraît plus pertinente pour bien modéliser la maladie.

Les souris SCA7^{140Q/5Q} ont une espérance de vie de 54 semaines, avec une masse corporelle réduite à partir de 12 semaines. A partir de 40 semaines, ces souris développent des symptômes moteurs importants qui permettent de les reconnaître facilement des souris témoins. Ces symptômes moteurs incluent une hypoactivité, détectable dès 16 semaines par le test de l'Open-Field, et une réduction des performances au test du Rotarod à 24 semaines. De plus, l'étude de la démarche des souris SCA7^{140Q/5Q} comparativement aux souris témoins a montré une perte de la coordination apparaissant entre 20 et 25 semaines.

Des agrégats d'ATXN7m se retrouvent dans les noyaux des photorécepteurs dès 12 semaines, avant de se propager à tous les neurones de la rétine. Des agrégats nucléaires ont également été trouvés dans les cellules de Purkinje au même âge. Ces agrégats augmentent en taille jusqu'à l'âge de 19 semaines, et causent probablement la dégénérescence de ces cellules, visible à partir de 34 semaines. Les souris SCA7^{140Q/5Q} présentent enfin une atrophie globale du cerveau à 25 semaines et en particulier une longueur réduite du vermis qui montre la vulnérabilité cérébelleuse. La chronologie des symptômes des souris SCA7^{140Q/5Q} est récapitulée dans la figure 18 suivante.

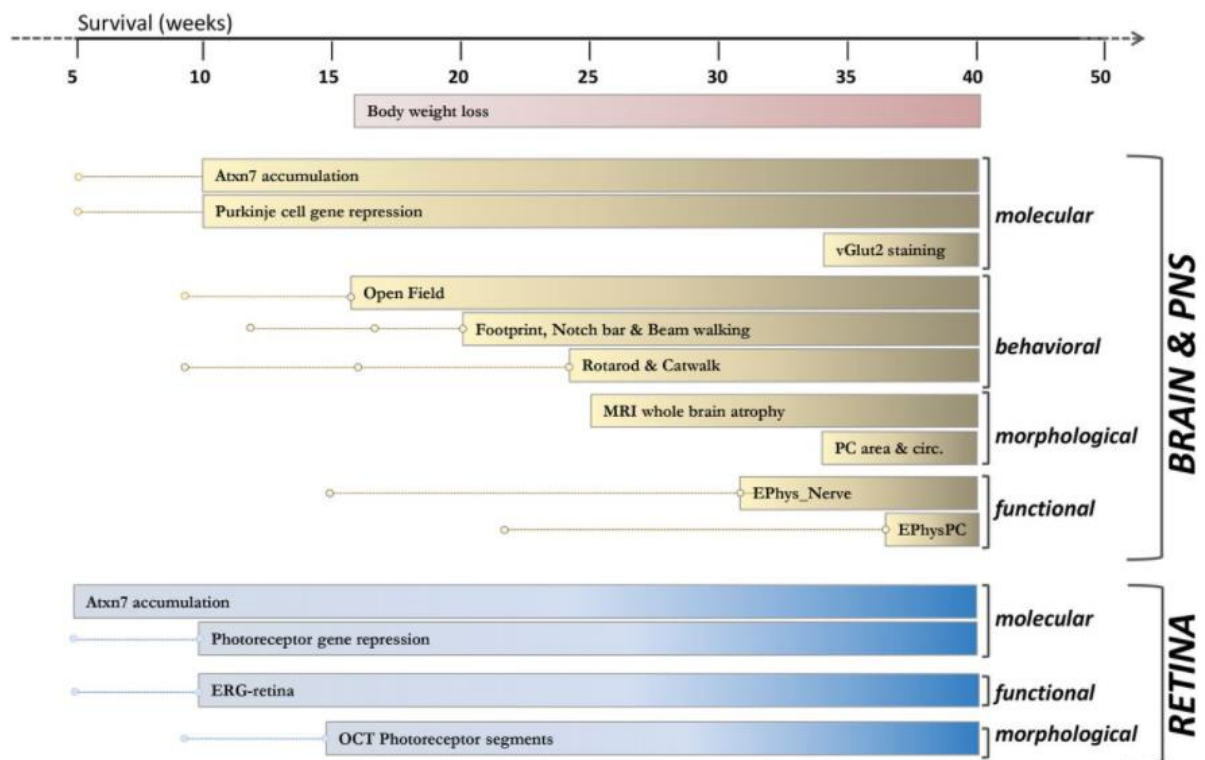


Figure 18 : Chronologie d'apparition des symptômes dans le modèle SCA7^{140Q/5Q}.

Le modèle SCA7^{140Q/5Q} a été choisi pour la troisième étude longitudinale de cette thèse portant sur l'évaluation d'une thérapie génique à base d'ARN interférant. Cette étude, présentée au chapitre X, a ainsi de multiples intérêts. Elle a permis d'évaluer l'efficacité des biomarqueurs pour une maladie autre que la MH, d'obtenir de nouvelles données pour la caractérisation du modèle SCA7^{140Q/5Q} et enfin d'évaluer l'efficacité d'une thérapie innovante.

Comme présenté dans le chapitre précédent, les modèles animaux des maladies à PolyQ ont déjà prouvé leur intérêt puisque nombre de mécanismes de pathogénèse y ont été identifiés. Cependant, nous avons vu dans ce chapitre que la construction d'un modèle de la MH n'était pas triviale, plusieurs modèles coexistant avec leurs avantages et inconvénients selon l'aspect de la maladie que l'on souhaite étudier. Les modèles animaux ont ainsi leurs limites qu'il est important de rappeler brièvement ici. En effet, même dans une construction très similaire à la mutation humaine comme dans le cas des modèles knock-in, des différences entre les deux espèces existent qui peuvent remettre en cause la pertinence du modèle. Ces différences peuvent être d'ordre morphologiques, comme la structure du striatum qui diffère entre la souris et l'homme, ou d'ordre comportemental, le répertoire moteur d'une souris étant très différent de celui de l'homme. D'autres types de différences majeures existent, par exemple le rythme circadien qui est totalement opposé chez la souris, avec des conséquences sur de nombreux biomarqueurs. Par ailleurs, comme décrit dans ce chapitre, les différentes constructions de modèles génétiques donnent naissance à des phénotypes très différents.

Au laboratoire, au cours de cette thèse et dans les précédentes études, nous avons pu comparer différents modèles et montrer qu'il est nécessaire de toujours prendre du recul dans l'interprétation des résultats et de les replacer dans le contexte du modèle animal utilisé¹⁴⁶. Le choix du modèle animal doit ainsi être motivé par la phase de la maladie et les mécanismes étudiés.

Dans les prochains chapitres, avant de présenter les résultats de cette thèse, nous allons introduire les grands principes de l'IRM et comment les modalités utilisées peuvent nous fournir des biomarqueurs pertinents pour l'étude de la pathogénèse et l'évaluation de thérapies dans des modèles de maladies à PolyQ.

Chapitre V : Imagerie par Résonance Magnétique

L'imagerie par Résonance Magnétique est une technique d'imagerie relativement récente non ionisante fondée sur le principe de la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN). Elle utilise le phénomène de relaxation des moments angulaires (ou spins) nucléaires, découvert par Bloch et Purcell qui décrivent en 1946 l'effet de précession des spins lorsque soumis à un champ magnétique externe. Il apparaît que certains noyaux (tels que le ^1H , le ^{13}C , le ^{17}O) possédant un spin non-nul, lorsqu'ils sont placés dans un champ magnétique, ont la faculté d'absorber des ondes électromagnétiques puis de réémettre une onde du même type lors de la relaxation. Ces travaux valurent à Bloch et Purcell le prix Nobel de physique en 1952. Mais l'application médicale naît des travaux de Paul Lauterbur, qui détermine la distribution spatiale des spins en 1974 en appliquant un gradient au champ magnétique, et de Peter Mansfield, qui met au point la séquence d'Echo-Planar Imaging (EPI) qui permet de réduire considérablement le temps d'acquisition des images^{147,148}. Ces derniers partageront le prix Nobel de médecine en 2003. Depuis, la technique s'est beaucoup développée, avec des améliorations technologiques (haut champ, sondes cryogéniques, amélioration des gradients, etc.) mais également de nouvelles séquences ouvrant de nouvelles applications (imagerie de diffusion, CEST, imagerie fonctionnelle, etc.). Dans ce chapitre, nous allons présenter de façon concise ces différentes techniques ainsi que leur principe de fonctionnement. Une attention particulière sera apportée aux méthodes employées durant cette thèse.

V.1. Phénomène de résonance magnétique

V.1.a Aimantation des tissus biologiques

Chaque particule possède un moment angulaire intrinsèque appelé spin, en particulier les protons ^1H , principaux constituants des molécules d'eau H_2O qui composent en grande partie les tissus biologiques.

Dans le cas du proton, ce moment angulaire peut prendre deux valeurs : $-\frac{1}{2}$ et $\frac{1}{2}$. Lorsque soumis à un champ magnétique externe \vec{B}_0 , le spin s'aligne avec celui-ci, avec deux états possibles et deux niveaux d'énergie qui correspondent aux deux valeurs que peut prendre le spin (figure 19) :

$$E_\alpha = \frac{\gamma B_0 \hbar}{2} \text{ et } E_\beta = -\frac{\gamma B_0 \hbar}{2} \quad \text{V.1}$$

Lorsqu'une population de protons est soumise à un champ \vec{B}_0 , l'aimantation longitudinale nette M_z , somme des moments angulaires des protons de la population, atteint une valeur nette non nulle. En effet, dû à l'agitation thermique, à l'état d'équilibre on retrouve légèrement plus de spins d'énergie E_α que d'énergie E_β . Cette répartition est dictée par la loi statistique de Maxwell-Boltzmann :

$$\frac{N_\alpha^0}{N_\beta^0} = e^{\frac{\Delta E}{kT}} \quad \text{V.2}$$

, où N_α^0 et N_β^0 sont le nombre de protons d'énergie α et β respectivement, k la constante de Boltzmann et T la température en Kelvin.

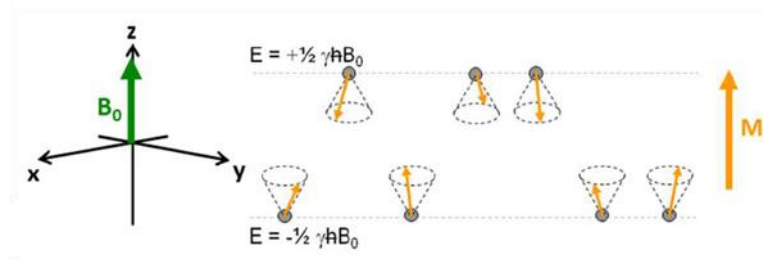


Figure 19 : Lorsque soumis au champ externe B_0 , les spins sont alignés dans un des deux états d'énergie E_α ou E_β . A cause de l'agitation thermique, la proportion de spins dans l'état E_β est légèrement supérieure et mène à une aimantation nette M_z . Adapté de la thèse de Jérémy Pépin ¹⁴⁹.

Dans une expérience d'IRM, c'est l'aimantation M_z que l'on souhaite mesurer afin d'en déduire les propriétés des tissus. Cependant, celle-ci est bien trop faible en comparaison de B_0 pour être détectée dans la même direction.

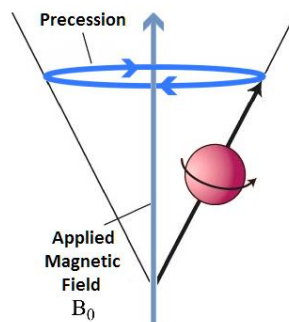


Figure 20 : Précession du spin d'un proton ^1H autour de l'axe du champ B_0

V.1.b Détection de l'aimantation

Pour détecter l'aimantation il faut donc la basculer dans une autre direction. Or cette aimantation nette résulte de la somme des moments angulaires qui précessent autour de la direction de \vec{B}_0 à une fréquence $\omega = 2\pi\gamma B_0$ appelée fréquence de Larmor (figure 20). Dans le plan transverse xy , l'aimantation nette M_{xy} est nulle à cause de la distribution aléatoire de la phase de précession.

Lorsqu'on applique une onde radiofréquence (RF) à la fréquence de Larmor sur les spins, ceux-ci entrent en résonance. Un transfert d'énergie s'effectue alors, ce qui a pour conséquence de faire basculer l'aimantation \vec{M} dans le plan transverse et de synchroniser la phase des spins. On obtient ainsi une aimantation transverse, en rotation dans le plan xy (figure 21). C'est cette aimantation qui est à l'origine du signal que l'on peut mesurer en RMN ou en IRM. Après arrêt de l'onde RF, cette aimantation M_{xy} va décroître de façon exponentielle dû au déphasage des spins selon l'équation

$$M_{xy} = M_0 e^{-t/T_2} \quad \text{V.3}$$

, où T_2 est la constante de temps du déphasage de la magnétisation transverse. D'autre part, l'aimantation longitudinale M_z va se relaxer selon la formule :

$$M_z = M_0(1 - e^{-t/T_1}) \quad \text{V.4}$$

, où T_1 est la constante de temps de relaxation de l'aimantation longitudinale. Le signal de décroissance libre de l'induction (*Free Induction Decay*) détecté par la sonde de réception de l'appareil d'IRM est ainsi caractérisé par ces deux constantes qui vont former la base du contraste de l'image d'IRM.

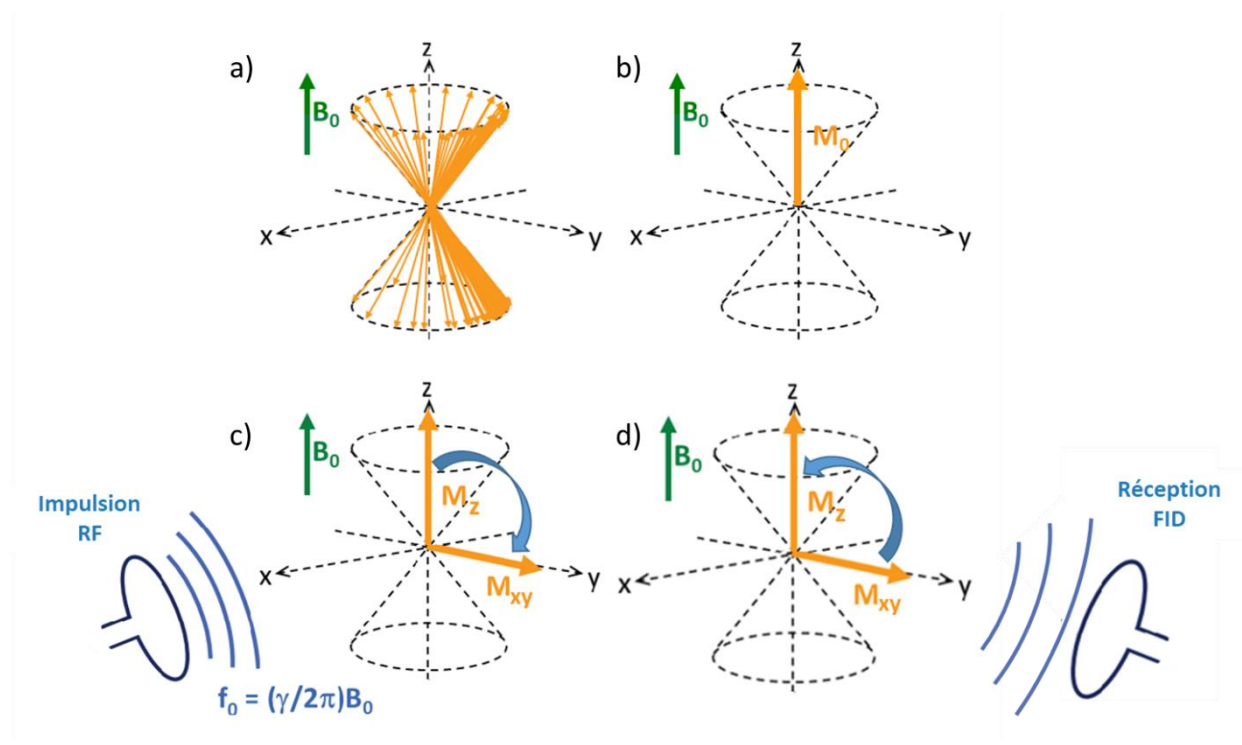


Figure 21 : a-b) L'aimantation nette, somme des moments angulaires des protons, est orientée dans l'axe z, dans la même direction que le champ externe B_0 . c) Lors de l'application d'une impulsion RF à la fréquence de Larmor, l'aimantation M_z est basculée dans le plan transverse xy . d) Après l'arrêt de l'impulsion RF, l'aimantation M_z se relaxe selon une constante de temps T_1 et l'aimantation transverse M_{xy} s'éteint selon une constante de temps T_2 . Adapté de la thèse de Jérémie Pépin ¹⁴⁹.

V.2. Imagerie par Résonance Magnétique

V.2.a Localisation du signal

Afin d'obtenir une image à partir du signal FID, il est nécessaire de localiser spatialement la provenance du signal. Pour cela, on utilise des gradients de champ. On applique d'abord le gradient de sélection de coupe qui va donner à chaque point sur l'axe z un champ effectif $B = B_0 + G_z z$. Ainsi, lors de l'impulsion RF, la fréquence de celle-ci va correspondre à la fréquence de Larmor sur une coupe de l'axe z , dont l'épaisseur dépend de la pente du gradient G_z . Sur cette coupe, afin de discriminer le signal venant de chaque pixel, on utilise deux autres gradients (figure 22). Le premier gradient, appelé encodage de fréquence, permet de sélectionner une colonne sur le même principe que le gradient de sélection de coupe. Le second gradient, appelé encodage de phase, est appliqué brièvement afin de modifier la phase des spins d'une même colonne. L'acquisition IRM permet ainsi de remplir l'espace k , transformée de Fourier bidimensionnelle de l'image.

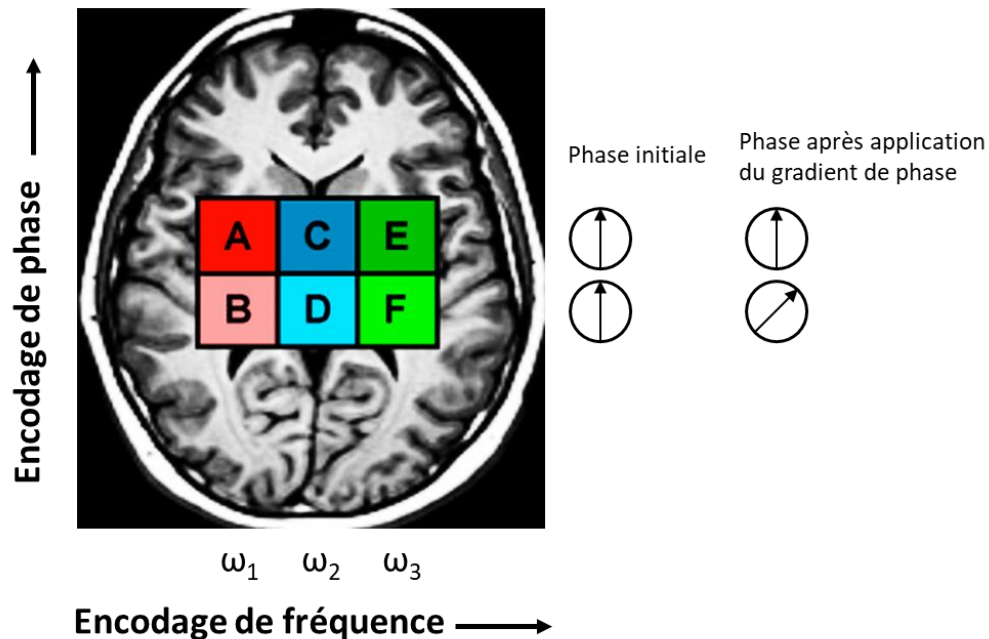


Figure 22 : Illustration des encodages de fréquence et de phase. L'encodage de fréquence modifie la fréquence de Larmor pour chaque colonne. L'encodage de phase est appliqué pour déphaser les spins d'une même colonne.

V.2.b Imageries pondérée T_1 et T_2

Basé sur ce principe, l'acquisition d'images en IRM est régie par la séquence d'impulsions RF, gradients et acquisitions de FID appliqués, qui se répète au cours du temps afin de remplir l'espace k . Une des séquences les plus utilisées, appelée séquence d'écho de spin, consiste en une première impulsion RF qui permet la bascule de l'aimantation dans le plan xy , suivie d'une seconde impulsion de 180° . L'aimantation est alors toujours située dans le plan xy , mais tournent dans le sens opposé. Cette

séquence permet de remettre en phase les spins qui avaient été déphasés à cause d'inhomogénéités du champ \vec{B}_0 . Ce phénomène est illustré dans la figure 23. Il est à noter qu'elle n'a pas d'influence sur la décroissance T_2 du signal.

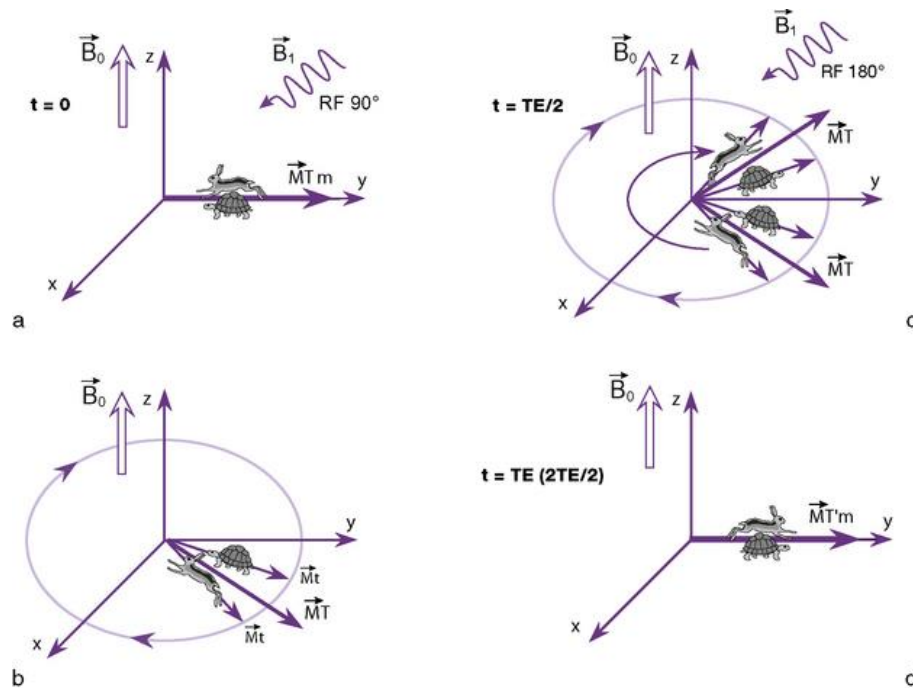


Figure 23 : a) Après l'impulsion RF de 90° les spins sont en phase dans le plan transverse. b) Après un temps $T_E/2$ pendant lequel les spins se sont déphasés, une seconde impulsion RF de 180° est appliquée. c) Les spins se remettent en phase pendant un temps $T_E/2$. d) A T_E les spins non influencés par le T_2 sont en phase, c'est ce qu'on appelle l'écho de spin.

Les séquences sont définies entre autres par deux valeurs, le temps d'écho T_E et le temps de répétition T_R (figure 24). Le T_E est défini comme la durée entre le milieu de la première impulsion RF et le milieu de l'écho. Le T_R quant à lui est la durée entre deux répétitions de la séquence. Ces deux valeurs permettent d'obtenir plusieurs contrastes différents en imagerie anatomique. En effet, avec un T_E et un T_R courts, on sera sensible à la différence de temps de relaxation du T_1 tandis que la décroissance T_2 n'aura pas encore beaucoup d'impact. On aura donc un contraste pondéré en T_1 . A l'inverse, avec un T_E et un T_R longs, on sera plutôt sensible aux variations de T_2 alors que le signal aura largement eu le temps de récupérer selon T_1 , diminuant son impact. On parle de pondération T_2 .

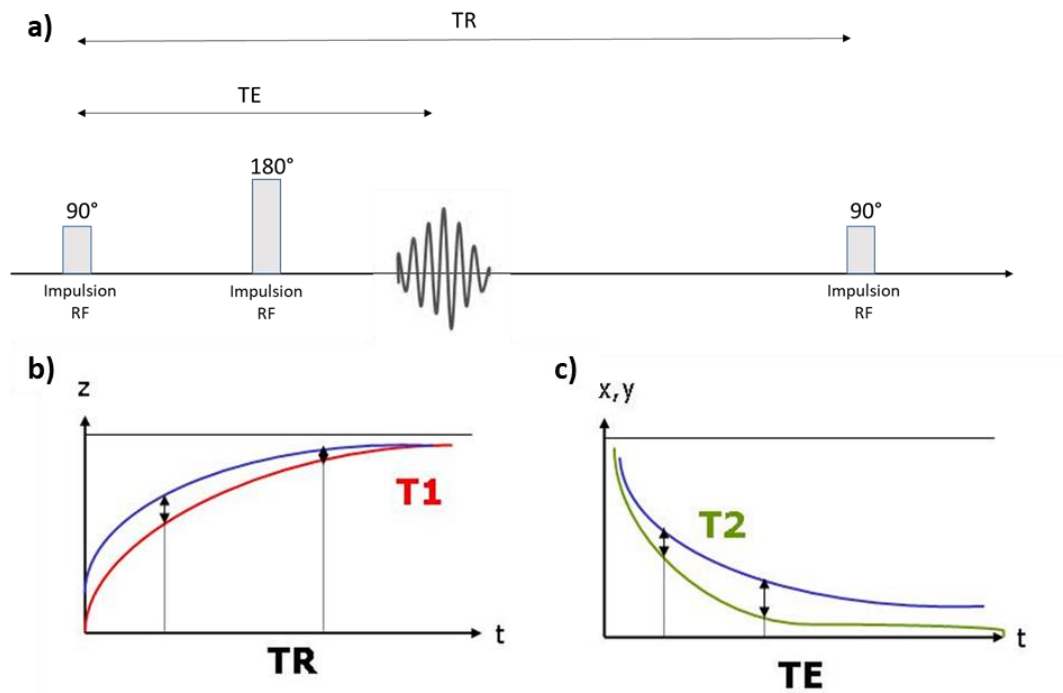


Figure 24 : a) Séquence d'écho de spin. b) Relaxation de l'aimantation longitudinale pour un T_1 court (bleu) ou long (rouge). Le contraste T_1 est maximisé lorsque T_R est court. c) Décroissance de l'aimantation transverse pour un T_2 court (vert) ou long (bleu). Le contraste T_2 est maximisé lorsque T_E est long.

Dans cette thèse, nous avons utilisé une séquence multi écho de spin (MSME) avec contraste pondéré T_1 pour l'imagerie anatomique. Cette séquence permet d'acquérir plus vite les images en enchaînant plusieurs échos dans le même T_R . Le contraste pondéré T_1 permet de bien distinguer les structures de matière grises du cerveau.

V.2.c Imagerie pondérée T_2^*

Une autre séquence très utilisée en IRM est la séquence d'écho de gradient. Cette dernière repose sur le même principe de déphasage puis rephasage des spins que la séquence d'écho de spin, mais plutôt que d'utiliser une seconde impulsion RF, elle implique des gradients. Cette séquence est plus rapide car elle ne nécessite qu'une seule impulsion RF, cependant elle ne permet de remettre en phase que les spins qui ont été déphasés par le gradient. Ainsi, à l'inverse de la séquence de spin, les spins déphasés à cause d'inhomogénéités de \vec{B}_0 ne seront pas rephasés. Le signal décroît alors selon une constante de temps appelée T_2^* , plus courte que T_2 et qui reflète l'inhomogénéité du champ. Ainsi l'imagerie anatomique par écho de gradient, bien que rapide, est très sensible aux artefacts d'inhomogénéités de champs, ce qui peut poser problème sur un appareil qui manque d'homogénéité. Néanmoins, il est possible d'exploiter cette propriété de l'imagerie d'écho de gradient pour obtenir des images pondérées T_2^* , qui reflètent la susceptibilité magnétique des tissus.

V.3. Modalités d'IRM

V.3.a Imagerie de diffusion

V.3.a.i. Imagerie pondérée en diffusion

La diffusion est définie comme le mouvement Brownien d'une molécule, c'est-à-dire le mouvement aléatoire de ces molécules dans un fluide. Dans les tissus biologiques les molécules peuvent être contenues à l'intérieur de corps cellulaires ou bien restreintes par la tortuosité du milieu extracellulaire. Dans ce cas la diffusion n'est pas entièrement brownienne. Ainsi, l'imagerie de diffusion a pour objectif de caractériser la diffusion des protons dans chaque voxel afin d'en tirer des informations sur la microstructure tissulaire. Pour cela, la séquence de pondération en diffusion ajoute un gradient, appelé gradient de diffusion, à la séquence d'écho de spin. Ce gradient, dirigé dans une direction fixée, est appliqué symétriquement de part et d'autre de l'impulsion RF de 180°. La première partie a pour effet d'accélérer le déphasage des protons selon la direction du gradient. Après l'impulsion, cette phase est inversée et si le proton est resté statique il retrouve sa phase initiale à la fin de la deuxième partie du gradient de diffusion. En revanche, si les protons ont diffusé alors ils ne se remettent pas complètement en phase et le signal est atténué selon la formule :

$$S = S_0 e^{-bD} \quad \text{V.5}$$

, où D est le coefficient de diffusion et S_0 le signal basal. L'image qui en résulte est alors pondérée en diffusion dans la direction du gradient de diffusion. Cette pondération est caractérisée par la valeur de b, paramètre reflétant la sensibilité de la séquence à la diffusion :

$$b = \gamma^2 G^2 \delta^2 \left(\Delta - \frac{\delta}{3} \right) \quad \text{V.6}$$

, où γ est le ratio gyromagnétique, G l'amplitude des gradients de diffusion, δ la durée d'un gradient et Δ l'intervalle de temps entre les deux gradients.

V.3.a.ii. Imagerie du tenseur de diffusion

Dans les expériences d'imagerie pondérée en diffusion, on cherche à extraire des informations sur la microstructure des tissus à partir des images acquises dans différentes directions de diffusion. Ces informations sont contenues dans le tenseur de diffusion ¹⁵⁰. Ce dernier est une matrice 3 x 3 qui représente la valeur du coefficient de diffusion dans chaque combinaison de direction :

$$D = \begin{bmatrix} D_{xx} & D_{xy} & D_{xz} \\ D_{yx} & D_{yy} & D_{yz} \\ D_{zx} & D_{zy} & D_{zz} \end{bmatrix} \quad \text{V.7}$$

, où les éléments de la diagonale représentent le coefficient de diffusion dans la direction des trois axes du laboratoire, tandis que les éléments non diagonaux représentent les corrélations dans la diffusion entre deux axes. Par symétrie de la diffusion, $D_{xy} = D_{yx}$ et le tenseur D est représenté par 6 valeurs. Afin de le résoudre on a donc besoin d'un minimum de 7 acquisitions, 6 images acquises dans 6 directions différentes, à laquelle on ajoute une image non-pondérée en diffusion. Ainsi il est possible à partir de ces images de diagonaliser le tenseur afin d'en extraire les vecteurs propres ($\epsilon_1, \epsilon_2, \epsilon_3$), qui correspondent aux directions principales de diffusion, et les valeurs propres ($\lambda_1, \lambda_2, \lambda_3$) qui correspondent au coefficient de diffusion dans la direction des vecteurs propres, avec $\lambda_1 \geq \lambda_2 \geq \lambda_3$. Le tenseur de diffusion peut ainsi être visualisé comme une ellipsoïde dont les axes i ont une longueur λ_i dans la direction ϵ_i (figure 25).

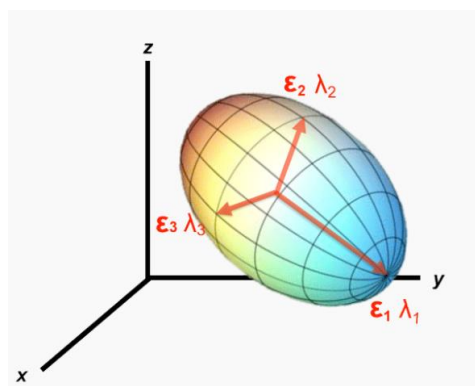


Figure 25 : Ellipsoïde représentant les principales directions définies par les vecteurs et valeurs propres du tenseur de diffusion

V.3.a.iii. Paramètres mesurables en imagerie du tenseur de diffusion

Plusieurs paramètres d'intérêt peuvent être dérivés de ces valeurs propres. La valeur propre λ_1 est appelée diffusivité axiale (AD) alors que la moyenne de λ_2 et λ_3 est appelée diffusivité radiale (RD). La diffusivité moyenne (MD), quant à elle, est définie comme la moyenne des trois valeurs propres. L'AD, la RD et la MD sont respectivement représentatives des restrictions de diffusion dans l'orientation de l'axe principal de diffusion, dans une direction transverse et sans direction particulière. Elles donnent ainsi des informations sur la microstructure tissulaire et sont beaucoup utilisées comme biomarqueurs potentiels des maladies neurodégénératives. Cependant, il faut prendre des précautions dans l'interprétation de ces valeurs. En effet, selon la morphologie du tissu considéré, une baisse d'AD peut par exemple être caractéristique d'une démyélinisation des tissus ou bien d'une perte axonale ¹⁵¹.

D'autres paramètres peuvent également être calculés à partir des valeurs propres du tenseur de diffusion. Le coefficient apparent de diffusion (ADC) est égal à la somme des trois valeurs propres. Il permet de donner une mesure de la restriction des protons dans le voxel étudié. L'anisotropie fractionnelle (FA), quant à elle, est définie par la formule :

$$FA = \sqrt{\frac{(\lambda_1 - \lambda_2)^2 + (\lambda_2 - \lambda_3)^2 + (\lambda_1 - \lambda_3)^2}{2(\lambda_1^2 + \lambda_2^2 + \lambda_3^2)}} \quad \text{V.8}$$

La FA est la valeur la plus utilisée dans la recherche de biomarqueurs dans les maladies neurodégénératives. Ce paramètre contenu entre 0 et 1 est en effet indicateur de l'anisotropie du milieu. Ainsi, un voxel placé dans la matière blanche, riche en fibres très orientées et donc très anisotrope ($\lambda_1 \gg \lambda_2 \approx \lambda_3$) aura une FA proche de 1, alors qu'à l'inverse un voxel de matière grise plus isotrope ($\lambda_1 \approx \lambda_2 \approx \lambda_3$) montrera une FA plus faible.

V.3.b Spectroscopie RMN

V.3.b.i. Acquisition de spectres RMN

En IRM, le signal mesuré provient des protons de l'eau libre, présents en grande quantité dans les tissus biologiques. Il est également possible de mesurer le signal en provenance de protons constitutifs de certains métabolites. En effet, l'environnement électronique des protons induit une modification du champ magnétique effectif $B_{eff} = B_0 + B_{induit}$, où B_{induit} est dépendant de la géométrie de la molécule et de la position du proton dans la molécule. Cette légère différence de champ effectif a pour conséquence une petite modification de la fréquence de résonance des protons. Ce phénomène est appelé déplacement chimique, et peut être quantifié par la formule :

$$\delta = 10^6 \frac{\omega_{eff} - \omega_{ref}}{\omega_{ref}} \quad \text{V.9}$$

, où $\omega_{eff} = \gamma B_{eff}$. δ est exprimé en partie par millions (ppm). C'est une mesure du déplacement chimique normalisée par la fréquence de résonance ω_{ref} , généralement celle du tétraméthylsilane (TMS), dont le déplacement chimique est par convention fixé à 0 ppm.

Lors de l'acquisition d'une image en IRM, la sensibilité est trop faible pour détecter le signal de ces métabolites, présents en concentrations de l'ordre du millimolaire (mM). Pour comparaison, les protons de l'eau sont présents à une concentration de 110 M. Dans une expérience de spectroscopie RMN, on cherche à quantifier ces métabolites afin d'analyser la composition chimique des tissus. Pour cela, il est nécessaire de se placer dans un voxel assez large (de l'ordre de quelques mm³) pour obtenir assez de signal.

Il est également nécessaire de supprimer le signal de l'eau libre qui noie celui des métabolites. Cela est obtenu en préparant le signal préalablement à l'acquisition du spectre. Lors de la préparation, une série d'impulsions RF suivies de l'application de gradients permet de basculer l'aimantation dans le plan transverse et de déphaser les spins. Ainsi lors de l'acquisition du spectre, ces derniers ne sont pas revenus en phase et l'aimantation nette M_{xy} des protons de l'eau libre est nulle.

V.3.b.ii. Métabolites mesurables en spectroscopie RMN

La spectroscopie RMN permet ainsi l'obtention de spectres métaboliques dans un voxel d'intérêt. Dû à la faible concentration des métabolites dans l'espace extracellulaire, la quantification extraite des spectres reflète principalement leur concentration intracellulaire. De façon intéressante, certains de ces métabolites sont représentatifs d'un type cellulaire en particulier. En effet, de par sa concentration importante dans les neurones, le N-acétylaspartate (NAA) est considéré comme un marqueur de l'intégrité neuronale. A l'opposé, la glutamine (Gln), le myo-inositol (Ins), et dans une moindre mesure, la choline (Cho) sont présents en majorité dans le compartiment astrocytaire. La Gln est ainsi considérée comme un marqueur de la réactivité astrocytaire. Un autre métabolite d'intérêt est le glutamate (Glu). Ce dernier est un neurotransmetteur mais joue également un rôle dans le métabolisme. Il est présent en quantité importante dans les neurones. Il est considéré comme un marqueur du métabolisme neuronal. Enfin, la spectroscopie RMN ne donnant qu'une mesure semi-quantitative de la concentration de chaque métabolite, à moins d'utiliser la modélisation pour retrouver une valeur absolue de concentration, cette dernière doit être donnée de façon relative à un autre métabolite. Le métabolite généralement choisi comme référence est la créatine (tCr). En effet la concentration de ce métabolite est considérée comme variant très peu d'un sujet à l'autre, ce qui peut être à discuter selon les pathologies étudiées.

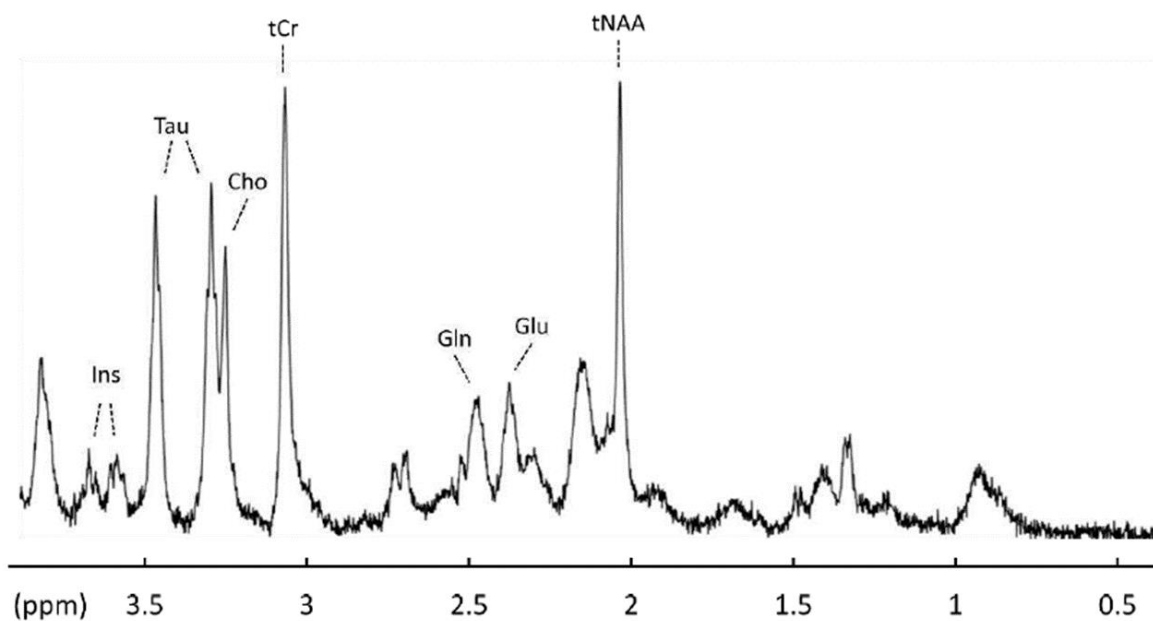


Figure 26 : Exemple d'un spectre métabolique acquis dans le striatum d'une souris.

V.3.c Imagerie CEST & MT

Si la spectroscopie RMN permet d'obtenir une information très riche d'un point de vue fonctionnel sur le métabolisme cérébral et les types cellulaires, cette technique est limitée par le faible rapport signal sur bruit (RSB) des métabolites d'intérêt qui oblige à acquérir le spectre dans un voxel large. L'imagerie de transfert de saturation par échange chimique (CEST) et de transfert de magnétisation (MT) adressent ce problème en proposant une méthode indirecte de détection de ces métabolites. En 1958, Harden McConnell publie une version modifiée des équations de Bloch afin de prendre en compte les phénomènes de transfert d'aimantation entre deux espèces chimiques ¹⁵². En 1989, Wolff et Balaban trouvent une application médicale en observant chez le lapin une baisse du signal de l'eau libre mesurable et corrélée à la concentration de la triméthylamine ¹⁵³. Cette baisse due à l'échange chimique entre les deux groupes de protons est à la base de l'imagerie CEST.

V.3.c.i. Imagerie CEST

L'imagerie CEST repose sur le déplacement chimique de la fréquence de résonance des protons d'une molécule d'intérêt ¹⁵⁴. Cette molécule, dénommée agent CEST, est présente en trop faible quantité pour pouvoir être détectée, son signal étant noyé dans celui de l'eau libre. En revanche, il est possible de saturer les protons liés à l'agent CEST de façon sélective grâce à ce déplacement chimique. La saturation consiste en une phase de préparation pendant laquelle une impulsion RF très intense est envoyée jusqu'à déphasage complet des spins. Le signal en provenance des protons liés à l'agent CEST est alors totalement éteint. Après la saturation, certains protons saturés sont transférés à l'eau libre, soit par échange chimique soit par interaction dipolaire (effet Overhauser nucléaire ou NOE) avec une molécule d'eau liée. Le signal de l'eau libre est alors également diminué. Cette diminution est facilement détectable et est dépendante de la concentration de l'agent CEST, entre autres. La figure 27 illustre ce principe. L'avantage de cette technique est qu'elle ne requiert que l'acquisition du signal de l'eau libre, présente en abondance. Ainsi le RSB du CEST permet de réduire considérablement la taille des voxels en comparaison avec la spectroscopie RMN. C'est pourquoi on parle d'imagerie CEST, car la résolution atteinte permet de former des images, pondérée en concentration de l'agent CEST.

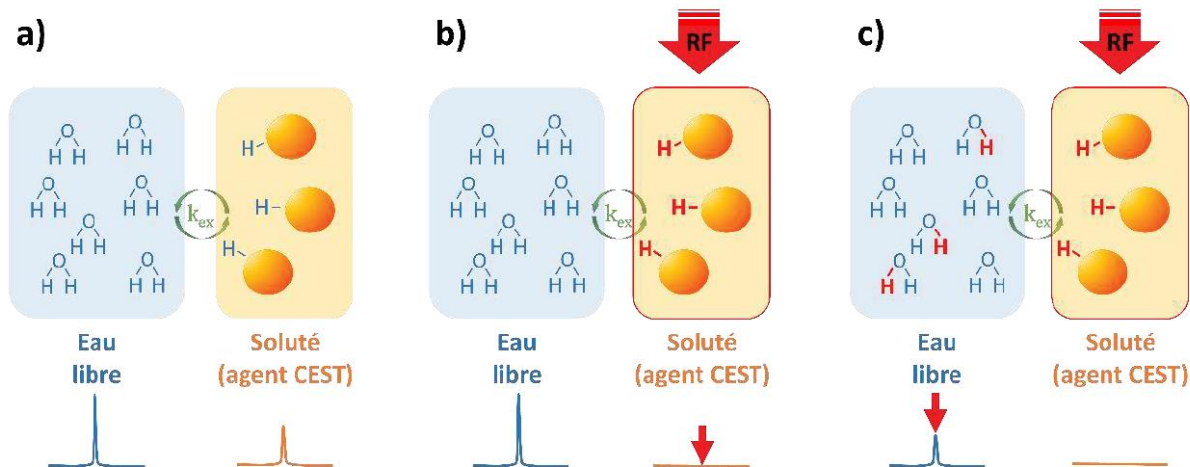


Figure 27 : Principe de l'effet CEST. a) à l'état initial, les deux groupes de protons sont en échanges, sans saturation. b) L'impulsion RF applique une saturation à la fréquence de résonance des protons de l'agent CEST, légèrement différente de celle de l'eau libre. Le faible signal en provenance de ce groupe de proton disparaît. c) Les protons saturés sont transmis au groupe de l'eau libre par échange chimique. Le signal de l'eau libre diminue de façon détectable. Tiré de la thèse de Jérémy Pépin ¹⁴⁹.

Plusieurs paramètres de l'impulsion RF de saturation sont importants à prendre en compte afin de sélectionner le signal dû à l'effet CEST de l'agent d'intérêt :

- La fréquence de saturation δ . Typiquement, dans une expérience d'imagerie CEST, plusieurs images vont être acquises en balayant plusieurs fréquences autour du pic de l'eau libre, et de la fréquence de résonance des protons de l'agent CEST. Le déplacement chimique entre ces deux pools est calculé selon la formule V.9, avec ω_{ref} la fréquence de résonance de l'eau libre.
- La durée de saturation t_{sat} . La durée de saturation permet de sélectionner les molécules d'intérêt sur la base de leur taux d'échange avec l'eau libre. En effet, plus le taux d'échange sera lent, plus l'impulsion devra être longue afin de saturer correctement l'eau libre. En choisissant la durée optimale, on s'affranchit ainsi d'une grande partie du signal venant d'autres molécules dont le taux d'échange avec l'eau libre est plus rapide ou plus lent.
- L'intensité de saturation B_1 . La saturation est plus rapide lorsque l'intensité de l'impulsion augmente. C'est pourquoi pour une molécule avec un taux d'échange rapide, l'intensité devra être élevée. Cependant une intensité trop élevée augmente la saturation directe de l'eau libre. Ainsi, la valeur optimale de l'intensité de saturation est donnée par la formule $B_{1opt} = \frac{k_{BA}}{2\pi\gamma}$.

Après avoir fixé t_{sat} et B_1 , les images préparées avec une saturation à différentes valeurs de δ sont donc acquises. En traçant le signal obtenu pour chaque fréquence de saturation, en balayant de part

et d'autre de la fréquence de résonance de l'eau libre, on obtient un spectre d'atténuation appelé Z-spectrum (figure 28). Ce dernier représente en effet l'atténuation du signal de l'eau libre. Le pic central marque l'atténuation due à la saturation directe. En cas d'effet CEST, un deuxième pic plus petit s'ajoute à la fréquence de résonance de l'eau liée à l'agent CEST et la courbe n'est pas parfaitement symétrique. La mesure de cette asymétrie, nommée *MTRasym* (*asymetrical Magnetization Transfer Ratio*, ratio de transfert de magnétisation asymétrique), est la valeur principale de quantification de l'effet CEST :

$$MTR_{asym} = \frac{S(-\delta) - S(\delta)}{S_0} * 100 \quad V.10$$

, où S_0 est le signal de référence, acquis à une fréquence lointaine de la résonance de l'eau libre.

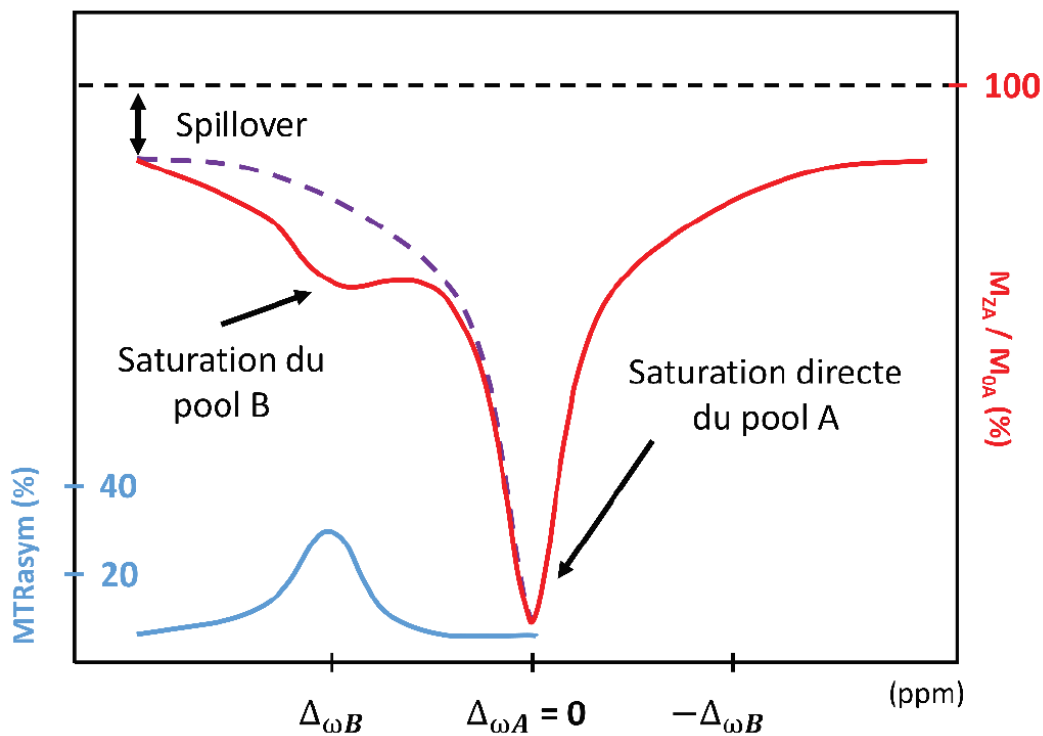


Figure 28 : Modèle de Z-spectrum et *MTRasym* lors d'une expérience d'imagerie CEST. Tiré de la thèse de Jérémy Pépin ¹⁴⁹.

En visualisant le Z-spectrum, il paraît clairement qu'une légère erreur de fréquence, qui aurait pour conséquence un mauvais centrage du pic de saturation directe, engendre une erreur conséquente dans l'estimation du *MTRasym*. Une telle erreur peut être causée par des inhomogénéités dans le champ \vec{B}_0 . Il est donc important de maximiser l'homogénéité du champ avant l'acquisition du Z-spectrum. Cependant, l'homogénéité ne peut pas être parfaite malgré toutes les précautions prises. C'est pourquoi il est nécessaire de corriger a posteriori le Z-spectrum afin de centrer le pic de saturation directe. La méthode WASSR (*water saturation shift referencing*, référencement du décalage de

saturation de l'eau) a été conçue pour la correction de ces inhomogénéités¹⁵⁵. Elle consiste à acquérir un Z-spectrum avec quelques fréquences proches de la résonance de l'eau libre afin de modéliser la courbe. Ensuite, le décalage entre le minimum du pic de saturation directe et la fréquence de résonance de l'eau, fixée à 0 ppm, est mesuré pour chaque voxel et une correction peut être appliquée au Z-spectrum.

V.3.c.ii. Imagerie MT

L'imagerie en transfert de magnétisation repose sur un principe semblable à celui du CEST et diffère essentiellement de ce dernier par la nature des molécules d'intérêt. En effet, la cible de l'imagerie MT sont les macromolécules comme les protéines de masse moléculaire importante. Le transfert d'aimantation pour ces molécules se fait essentiellement par effet NOE envers les molécules d'eau qui leur sont liées. Ces effets ont lieu en amont de la fréquence de résonance de l'eau, à partir de -1,5 ppm. Cependant, pour éviter d'être sensible aux agents CEST dont les fréquences de résonance sont situées à la symétrie du Z-spectrum, il est préférable de mesurer le MTR_{asym} du contraste MT en se plaçant loin de la fréquence de résonance de l'eau, aux alentours de 16 ppm. En effet, à cette fréquence, les effets NOE sont toujours présents et permettent une bonne sensibilité ainsi qu'une spécificité acceptable.

V.3.c.iii. Molécules détectables en imagerie CEST et MT

L'imagerie CEST est utilisée pour une variété d'applications. Les molécules détectables en imagerie CEST peuvent être réparties en plusieurs classes en fonction des groupements chimiques qu'elles contiennent et qui conditionnent le déplacement chimique de leur fréquence de résonance. Les principaux métabolites détectables par effet CEST possèdent ainsi soit un groupement amide (-NH), soit un groupe amine (-NH₂), soit un groupe hydroxyle (-OH).

Les molécules possédant un groupement amide sont utilisés pour la technique d'APT (*Amide Proton Transfer*), qui est sensible au pH des tissus. Cette technique a ainsi des applications dans l'imagerie de tumeurs ou d'ischémie, qui altèrent le pH, et a même été proposée comme biomarqueur des maladies d'Alzheimer et de Parkinson¹⁵⁶. L'APT est détectée autour de 3,5 ppm et nécessite une saturation relativement longue due à un taux d'échange lent.

Les principales molécules possédant un groupement amine détectées en CEST sont le glutamate et la créatine. De par sa forte concentration dans l'espace intracellulaire et son taux d'échange rapide, l'effet CEST du glutamate (gluCEST) est détecté à 3 ppm avec une bonne sensibilité et une spécificité d'environ 70%¹⁵⁷. L'imagerie gluCEST permet ainsi d'obtenir des images pondérées en glutamate, qui est un biomarqueur de choix dans les maladies neurodégénératives dû à son rôle prépondérant dans

le métabolisme neuronal et la neurotransmission. Elle a ainsi déjà montré une sensibilité dans des modèles animaux de la maladie d'Alzheimer ou de la MH^{136,158}. Cependant, le taux d'échange rapide oblige à utiliser un haut champ pour être sensible au gluCEST. C'est pourquoi un minimum de 7T est nécessaire pour cette technique.

Enfin, les protons des groupements hydroxyles sont également capables d'échanger avec l'eau libre. L'effet CEST ainsi généré, à environ 1 ppm de la fréquence de résonance de l'eau libre, a été utilisé pour l'imagerie du glycosaminoglycan (Gag) et du glycogène. Le gagCEST a été utilisé comme biomarqueur pour l'évaluation de l'intégrité du cartilage dans le genou ou dans les disques intervertébraux¹⁵⁹. L'imagerie CEST du glycogène, ou glycoCEST, semble d'intérêt au vu de l'importance de ce métabolite dans l'homéostasie du glucose. Il peut ainsi être considéré comme un biomarqueur d'obésité ou de diabète de type 2. Le glycoCEST s'est montré sensible à la perfusion hépatique d'un modèle animal.

L'imagerie MT a été utilisée comme biomarqueur des maladies neurodégénératives, avec en particulier un lien avec la myélinisation¹⁶⁰. En effet, la myéline est constituée de protéines de très grand poids moléculaire et très hydratées. De plus, elle est présente en grande quantité dans le cerveau. Ainsi, une baisse de signal MT a été mise en évidence dans les maladies d'Alzheimer et de Parkinson, ainsi que dans la MH, en corrélation avec le score UHDRS.

V.3.d Imagerie par résonance magnétique fonctionnelle

V.3.d.i. Imagerie BOLD

L'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle (IRMf) est un terme qui désigne certaines techniques employées pour observer l'activation des régions cérébrales en utilisant la propriété que cette activation augmente localement le flux sanguin pour répondre aux besoins des neurones. La première application de cet effet a été réalisée avec la technique DSC (*dynamic susceptibility contrast*, contraste dynamique de susceptibilité), qui consiste à injecter un agent de contraste ayant un effet paramagnétique et de mesurer la modification locale de susceptibilité magnétique par imagerie pondérée T_2^* ¹⁶¹. Cependant, la découverte de l'imagerie BOLD (*blood oxygen level dependant*, dépendant du niveau d'oxygène sanguin), a permis de s'affranchir de la nécessité d'injecter un agent de contraste en utilisant le paramagnétisme naturel du sang. En effet, lors de l'afflux de sang dans une zone activée, le ratio entre désoxyhémoglobine, paramagnétique, et oxyhémoglobine, diamagnétique, est altéré. Cette altération génère des inhomogénéités dans le champ \vec{B}_0 qui affectent le T_2^* ¹⁶² (figure 29).

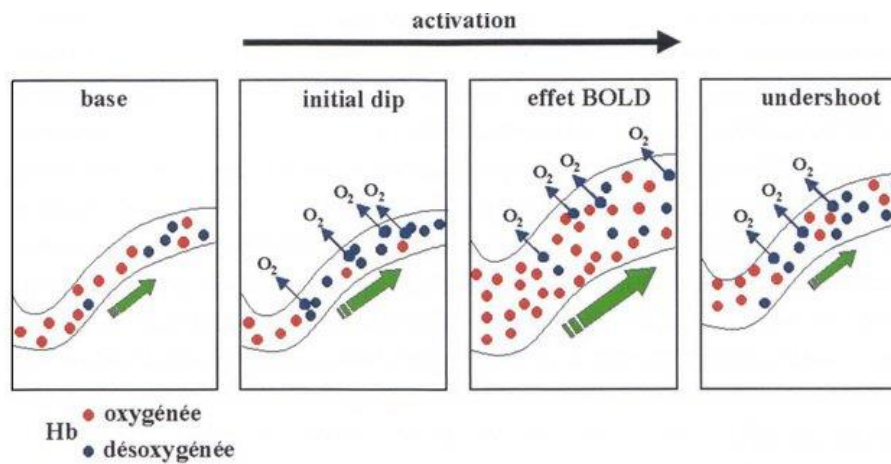


Figure 29 : Changements locaux du flux sanguin et du ratio désoxyhémoglobine/oxyhémoglobine suivant l'activation neuronale. L'activation augmente ainsi le paramagnétisme du sang ce qui mène à un contraste T_2^* accru. Tiré de Perez 2013 ¹⁶³.

V.3.d.ii. Paramètres mesurables en IRMf

Lors d'une expérience d'IRMf, une région du cerveau est activée par stimulus visuel ou auditif ou bien par la réalisation d'une tâche, par exemple taper du doigt. Une image pondérée T_2^* est alors acquise par imagerie d'écho de gradient, pendant le stimulus et au repos. La comparaison statistique des deux images permet de conclure sur l'activation de certaines zones cérébrales.

De plus en plus utilisée, la technique d'IRMf à l'état de repos propose d'acquérir des images pondérées T_2^* sur une certaine durée sans aucun stimulus. L'activation naturelle des régions corticales au repos permet alors d'enregistrer des fluctuations de signal dans chaque voxel. L'analyse statistique temporelle de ces fluctuations et de leur corrélation délivre des informations sur la connectivité fonctionnelle entre les régions du cerveau. En effet, les fluctuations de deux régions corticales connectées peuvent être corrélées positivement ou même négativement.

Suite à la présentation dans ce chapitre des modalités d'IRM et des biomarqueurs potentiels qui en découlent, nous allons exposer dans le chapitre suivant, le dernier de cette introduction, un état de l'art de l'utilisation de ces biomarqueurs dans les maladies à PolyQ, chez l'homme ainsi que dans les modèles rongeurs présentés au chapitre précédent.

Chapitre VI : Apport de l'IRM et de la spectroscopie RMN pour l'identification de biomarqueurs dans les maladies à PolyQ

Afin de conclure cette introduction, après avoir passé en revue les modèles animaux des maladies à PolyQ, ainsi que les modalités d'IRM et les différentes mesures qui en découlent, nous allons dans ce chapitre exposer comment elles peuvent être utilisées comme biomarqueurs des maladies à PolyQ. Dans une première partie nous nous concentrerons sur l'utilisation de l'IRM en clinique dans le suivi de ces pathologies, avant de poursuivre avec l'application aux modèles animaux en imagerie préclinique dans le contexte des maladies à PolyQ.

VI.1. Biomarqueurs des maladies à PolyQ en clinique

Comme expliqué dans le chapitre I, l'évaluation de l'efficacité de thérapies chez les porteurs présymptomatiques des maladies à PolyQ se confronte à la difficulté de suivre la progression de la maladie faute de biomarqueurs assez précoce. Les scores cognitifs et moteurs, bien que pouvant être altérés plusieurs années avant l'apparition des symptômes, ne sont pas suffisamment prédictifs et reflètent une dégradation déjà avancée des structures cérébrales. L'imagerie propose de répondre à ce défi en apportant des informations plus pertinentes sur le plan fonctionnel de façon non invasive. Parmi les modalités d'imagerie, l'IRM est particulièrement pertinente pour la recherche de biomarqueurs des maladies à PolyQ, de par la résolution spatiale qu'elle permet d'obtenir, ainsi que la diversité de contrastes et de paramètres qu'elle permet de mesurer (voir chapitre V).

VI.1.a Morphométrie des structures cérébrales par IRM anatomique

L'imagerie anatomique permet d'obtenir des images hautement résolues du cerveau des patients, à partir desquelles il est possible de mesurer le volume des structures cérébrales. La dégénérescence préférentielle de certains neurones peut mener à des atrophies détectables par ce biais. Ainsi, dans la MH, la mesure du volume striatal est considérée comme un biomarqueur de la progression de la maladie.

L'atrophie striatale mesurée à partir d'IRM anatomique est le marqueur le plus utilisé dans la MH^{53,54}. Elle est visible avant l'apparition des symptômes et progresse entre la phase présymptomatique et la phase symptomatique. En effet, Paulsen et al. ont observé une perte de volume significative et progressive du putamen et du noyau caudé entre trois groupes de participants dans la phase

présymptomatique de la MH, respectivement à plus de 15 ans, entre 9 et 15 ans, et à moins de 9 ans de l'âge supposé d'apparition des symptômes ¹⁶⁴.

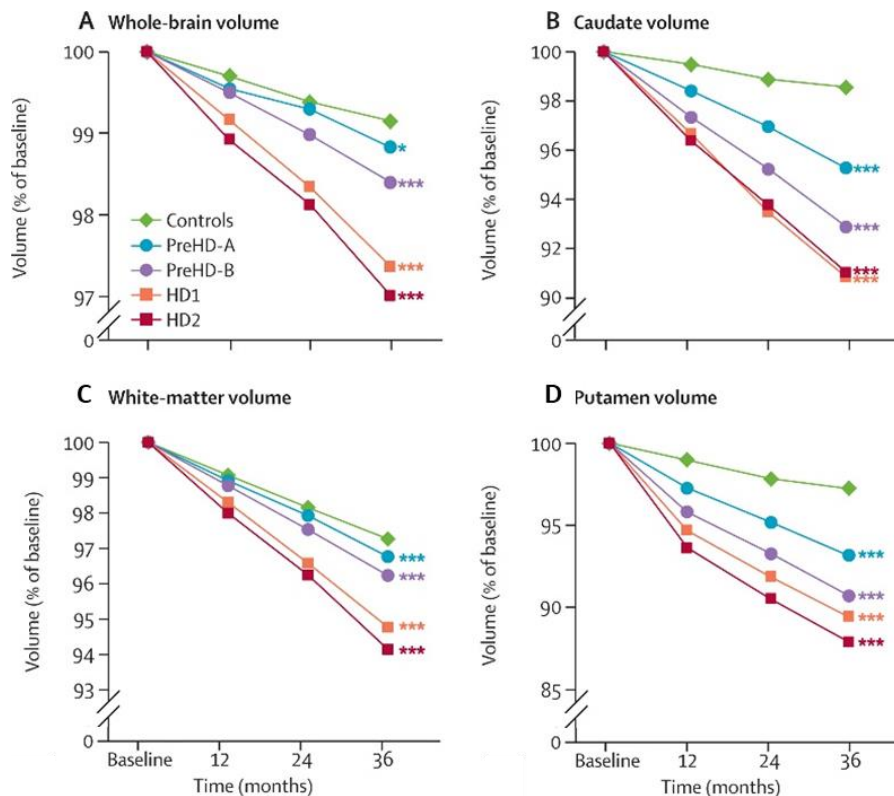


Figure 30 : Evolution du volume total du cerveau (A), du noyau caudé (B), de la matière blanche (C) et du putamen (D) chez les patients de la MH (à un stade peu avancé et avancé en orange et rouge respectivement) et porteurs du gène présymptomatique (loin et proche de l'apparition présumée des symptômes en bleu et violet respectivement) à différents stades de la maladie, en comparaison avec les sujets témoins sains. Adapté de Tabrizi et al., 2013¹⁵.

En plus du striatum, l'IRM anatomique a permis la mise en évidence d'atrophie dans d'autres structures de la matière grise, incluant le cortex, le cervelet et le thalamus (figure 30)¹⁵. La matière blanche a également montré une vulnérabilité, en particulier le corps calleux, la capsule interne et la couronne rayonnante ⁵⁷. Le corps calleux est particulièrement affecté et semble être la deuxième structure la plus atrophiée après le striatum, tant en termes de sévérité que de précocité. En effet, on voit que pour ces deux structures, la diminution du volume au cours du temps est significativement plus importante chez les porteurs du gène présymptomatiques, et ce même pour le groupe éloigné de l'apparition supposée des symptômes. Par ailleurs, la perte de volume striatal a été montrée comme corrélée au nombre de répétitions CAG, montrant une sensibilité à la sévérité de la maladie ¹⁴.

VI.1.b Profils métaboliques par Spectroscopie RMN ¹H

La spectroscopie RMN permet d'acquérir des spectres de concentrations relatives de métabolites dans un voxel, généralement d'une taille comparable aux structures cérébrales. Cette technique peut donc

être informative sur le métabolisme énergétique des cellules dans le voxel d'intérêt, mais également sur les populations de cellules neuronales ou gliales. Dans le contexte des maladies neurodégénératives, ces informations sont très pertinentes pour comprendre les mécanismes de pathogénèse et les modifications métaboliques permettant de maintenir l'homéostasie cellulaire malgré la maladie.

De nombreuses études ont investi le métabolisme des patients Huntington à l'aide de la spectroscopie RMN. La majorité des études placent un voxel dans le striatum, incluant le putamen et le noyau caudé. En effet, en plus de son intérêt pour l'étude de la MH, cette structure présente l'avantage d'avoir une forme plutôt sphérique, idéale pour l'insertion d'un voxel de volume conséquent. Le résultat le plus commun est une baisse du NAA dans le striatum, apparaissant peu de temps après, voire juste avant l'arrivée des symptômes ¹⁶⁵(figure 31). Une diminution du niveau de créatine a également été observée, à la fois chez des patients déclarés et dans la forme juvénile ^{166,167}. En ce qui concerne les autres métabolites, l'hétérogénéité des profils métaboliques des patients de la MH induit des observations contradictoires selon les études ¹⁶⁸. Ainsi, si les niveaux de Glu et de myo-Ins striataux semblent affectés, des augmentations et des diminutions ont été rapportés. Les changements semblent très localisés dans le temps, probablement symptomatiques d'un maintien difficile de l'homéostasie.

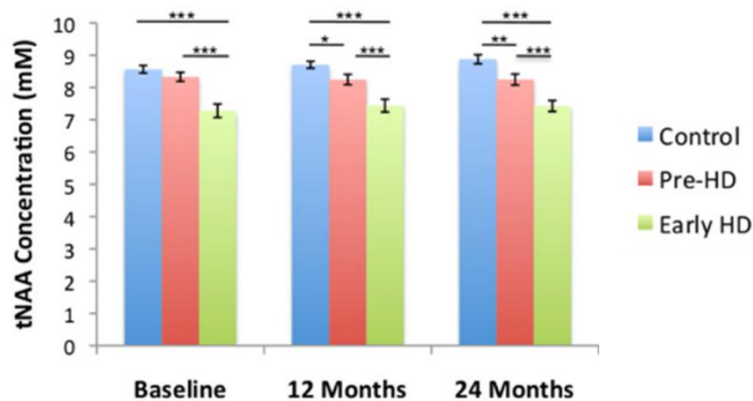


Figure 31 : Concentration striatale de NAA totale au cours du temps pour les patients de la MH et porteur du gène présymptomatique en comparaison avec les sujets témoins sains. Tiré de Sturrock et al., 2015¹⁶⁵.

Tableau V : Tableau récapitulatif des variations métaboliques observées chez des patients atteints de la MH

Métabolites en hausse	Métabolites en baisse	Métabolites fluctuants

	NAA, Cr, Cho	Glu, myo-Ins
--	--------------	--------------

VI.1.c Cartes pondérées en macromolécules par IRM-MT

Comme décrit dans le chapitre précédent, le signal MT est corrélé à la concentration de myéline dans les tissus. Etant donné les atteintes de la myéline dans la MH (voir chapitre III), qui semblent participer à la pathogénèse, l'imagerie MT s'avère être d'une extrême pertinence pour l'obtention de biomarqueurs précoces et fonctionnels. Le signal MT a ainsi été mesuré augmenté chez des porteurs du gène muté, loin de l'apparition des symptômes ¹⁶⁹. En revanche, une autre étude sur des patients déclarés a montré une diminution du signal dans plusieurs structures de la matière grise, incluant le striatum, le cortex, l'hippocampe et les amygdales ¹⁷⁰. Afin d'aller plus loin dans l'interprétation de ce contraste, Bourbon-Teles et al. ont récemment réalisé une étude incluant de l'imagerie MT quantitative ¹¹⁷. Cette technique associe de la modélisation à l'acquisition de plusieurs images MT pour extraire la fraction de protons macromoléculaires (MMPF) des tissus, marqueur reflétant la myélinisation. La MMPF est réduite dans la matière blanche ainsi que dans la matière grise des ganglions de la base, avec par Analyse en Composante Principale, une composante hautement pondérée en MMPF significativement différente chez les patients de la MH.

VI.1.d Intégrité de la microstructure par Imagerie en Tenseur de Diffusion

L'imagerie du Tenseur de Diffusion a beaucoup été utilisée en IRM clinique pour l'étude des modifications de la microstructure cérébrale dans la MH. En effet, comme expliqué au chapitre précédent, les paramètres de diffusion délivrés par cette modalité reflètent la microstructure des tissus (myélinisation, densité neuronale, orientation des fibres, etc.).

La FA et la RD ont été montrées décrues dans la matière blanche des patients atteints de la MH ¹⁷¹(figure 32), avec le corps calleux atteint de façon précoce, avant l'apparition des symptômes ¹¹⁶. A l'inverse, la FA est augmentée dans la matière grise, notamment dans le striatum et le globus pallidus ¹⁷². Dans les mêmes structures, l'AD a montré une dispersion accrue, mettant en évidence une vulnérabilité des neurones de la voie striato-pallidale.

Tableau VI : Tableau récapitulatif des variations des paramètres de diffusion observées chez des patients atteints de la MH.

Matière grise	Matière blanche
FA , σ (AD) ↑	FA , RD ↓

Plusieurs approches existent pour le traitement des images DTI et la comparaison inter-groupes des paramètres d'intérêt. L'approche classique consiste à segmenter les structures d'intérêt du cerveau et à comparer des valeurs de FA, par exemple, moyennées sur la structure. Cependant on comprend que dans le cas d'atteintes locales au sein de larges structures, les différences vont être noyées par ce calcul de moyenne. De plus, comme il sera expliqué en détails dans le chapitre suivant, la segmentation de la matière blanche pose problème. Afin d'adresser ce défi, une autre approche basée sur une analyse voxel-à-voxel a été proposée ¹⁷³. Nommée TBSS (*Tract-Based Spatial Statistics*, Statistiques spatiales basées sur les tracts), elle a été utilisée sur des patients de la MH et des porteurs du gène présymptomatiques. Cette technique a ainsi permis de relever des clusters de voxels montrant une baisse de FA dans le corps calleux, le fornix, la capsule externe, et les fascicules ⁵⁷.

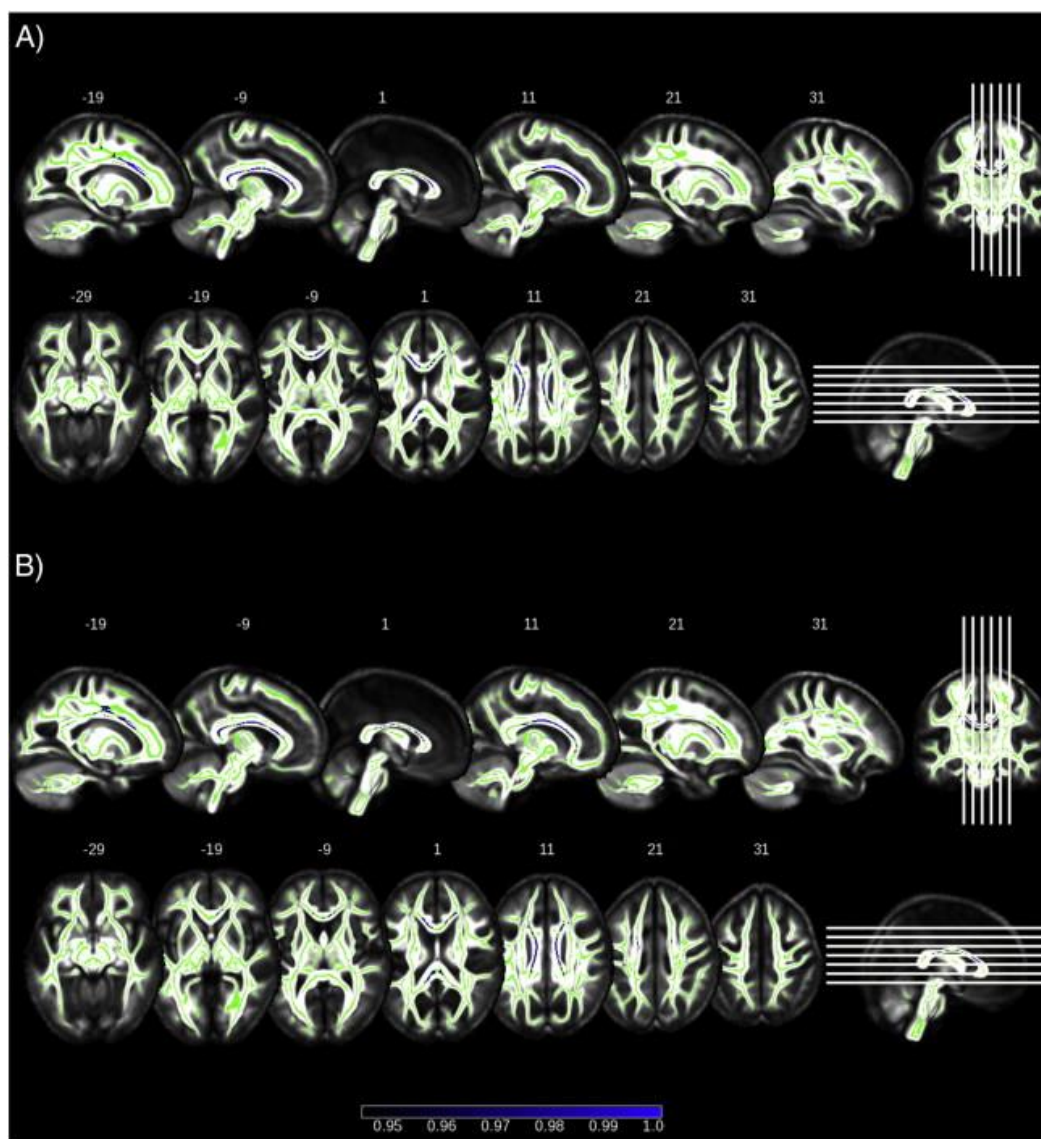


Figure 32 : Changements longitudinaux de FA chez les patients de la MH comparés aux sujets témoins sains (A) et porteurs présymptomatiques (B). Les régions en vert représentent le squelette de matière blanche utilisé

pour l'analyse TBSS. Les régions en bleu indiquent une réduction significative de la FA, échelle de couleur : 1 - p-value. Tiré de Poudel et al., 2015¹⁷¹.

L'interprétation de ces biomarqueurs n'est cependant pas triviale, et s'il semble possible de conclure que ces résultats sont expliqués par une atteinte neuronale, plusieurs études s'accordent à dire qu'il ne serait pas prudent de statuer sur la nature précise de cette atteinte. En effet, la mort de neurones et une démyélinisation des fibres axonales pourraient par exemple mener au même résultat en termes de FA et d'AD sur un voxel entier ¹⁵¹.

VI.1.e Connectivité fonctionnelle des structures cérébrales par rs-fMRI

L'IRMf est d'une grande pertinence pour l'étude de la MH en clinique, et a été utilisée dans plusieurs études. L'imagerie BOLD a révélé une baisse de l'activité neuronale dans le cortex et une augmentation dans plusieurs autres structures de la matière grise ¹⁷⁴. L'IRMf à l'état de repos a montré une diminution de la connectivité fonctionnelle entre les régions, en particulier dans le réseau du mode par défaut (*default-mode network*), un réseau neuronal qui s'active lorsque le sujet est inactif ¹⁷⁵. Chez les porteurs du gène non symptomatiques, la connectivité entre le cortex moteur et le noyau caudé est déficiente ¹⁷⁶. Si la connectivité inter-régionale semble ainsi altérée de façon précoce dans la MH, la connectivité intra-régionale quant à elle a été montrée augmentée ¹⁷⁷. Cette observation pourrait s'expliquer par un manque de différenciation des neurones à l'intérieur des régions, en conséquence d'un sur-recrutement de neurones pour compenser la perte de connectivité inter-régionale.

Pour aller plus loin et proposer un biomarqueur quantitatif représentatif de la connectivité des réseaux neuronaux, Gargouri et al. ont proposé d'utiliser la théorie des graphes ¹⁷⁸. Le SPL (*shortest path length*, longueur minimale de chemin), paramètre de cette technique d'analyse, est ainsi significativement diminué chez les patients de la MH. Ce résultat montre qu'une connectivité plus aléatoire du cerveau mène à des symptômes plus sévères de la maladie.

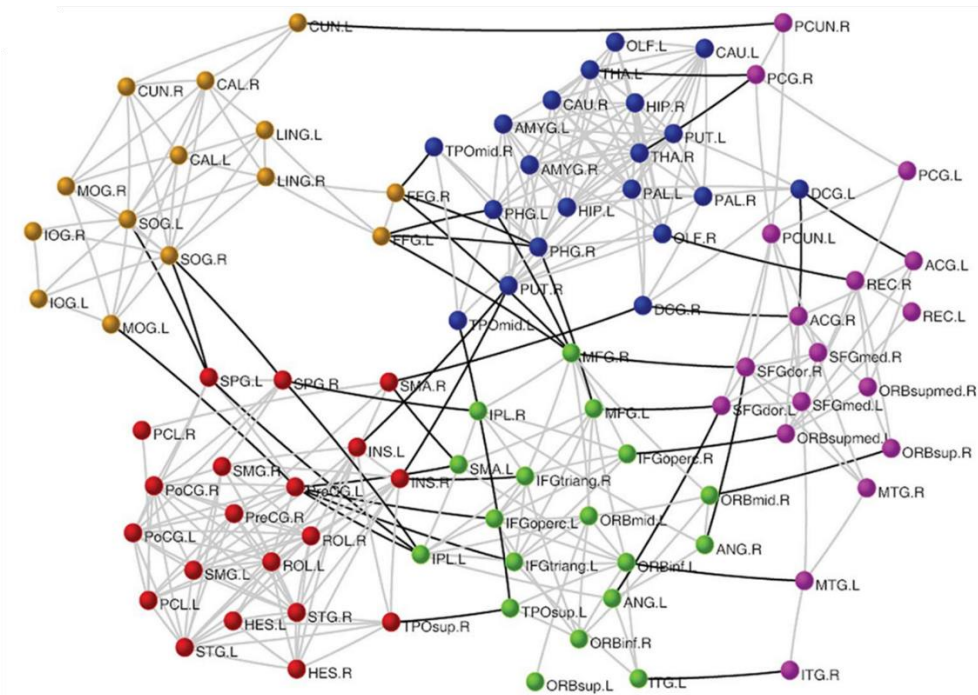


Figure 33 : Exemple d'une représentation de réseau fonctionnelle par théorie des graphes. Les nœuds représentent les régions cérébrales. 6 modules représentant 6 réseaux ont été identifiés et signalés par des couleurs différentes. Les liens inter- et intra-modules (respectivement en noir et en gris) représentent les connexions entre les régions. La distance géométrique entre deux régions sur le graphe représente le SPL. Tiré de Wang et al. 2010 ¹⁷⁹.

VI.2. Biomarqueurs des modèles animaux des maladies à PolyQ

Comme indiqué dans le chapitre IV, la recherche sur les modèles animaux, bien que ceux-ci soient par définition des modèles imparfaits, permet l'étude plus rapide et plus spécifique d'un mécanisme de pathogénèse en particulier. Par ailleurs, certaines modalités comme l'imagerie CEST sont difficiles à adapter en clinique. La recherche de biomarqueurs par IRM s'est donc beaucoup appuyée sur des modèles rongeurs de la MH.

VI.2.a Morphométrie des structures cérébrales par IRM anatomique

Les souris exprimant des fragments de HTTm, comme les N171-82Q, R6/1 et R6/2 montrent des atrophies précoces du cerveau, en particulier du striatum et du néocortex. L'atrophie est visible par la suite dans le thalamus, l'hypothalamus et l'hippocampe dès 6 semaines chez les souris R6/2 et 10 semaines dans le modèle N171-82Q ¹⁸⁰⁻¹⁸².

Les modèles knock-in exprimant la huntingtine entière, avec différentes longueurs de répétitions CAG montrent une progression bien plus lente de l'atrophie. Les souris zQ175 hétérozygotes ont une atrophie striatale dès 4 mois, tandis que dans le modèle CAG140 l'atrophie n'apparaît qu'à 12 mois ^{140,183}. Tout comme pour les modèles transgéniques, l'atrophie est visible plus tardivement sur d'autres

structures dont le néocortex, le cortex piriforme, le thalamus, le corps calleux ou encore le cortex moteur.

Les modèles surexprimant la huntingtine par chromosome artificiel montrent également une atrophie progressive, bien que plus rapide. L'atrophie striatale est visible dès l'âge de 3 mois chez les souris YAC128, puis à 8 mois plusieurs structures incluant le striatum, les cortex piriforme et moteur, le thalamus, les bulbes olfactifs ou encore le corps calleux sont atrophiées ¹¹⁵.

Il existe deux techniques différentes de traitement d'image pour le calcul de différences de volume entre souris modèles et témoins : le traitement basé sur les structures et le traitement basé sur les voxels. Avec la première approche, les régions cérébrales sont délimitées, manuellement ou automatiquement, à l'aide d'un atlas, tandis qu'avec la seconde approche les images sont comparées directement et des clusters de voxels qui diffèrent sont identifiés. Ces deux approches sont complémentaires, l'une permettant d'identifier les structures les plus touchées tandis que la seconde met en évidence des régions vulnérables à une échelle plus localisée.

La morphométrie basée sur les voxels a ainsi été appliquée sur les modèles zQ175 et YAC128, permettant l'identification de clusters avec une atrophie particulière dans le striatum, mais également dans les cortex piriforme, somato-sensoriel et moteur, le globus pallidus, l'hippocampe et la substance noire.

La morphométrie, bien que peu informative sur le plan fonctionnel, n'est donc pas une modalité à oublier dans la recherche de biomarqueurs. Plusieurs études ont ainsi pu mettre en évidence une diminution de la vitesse d'atrophie dans des modèles souris traités avec des hormones régulatrices du BDNF ^{184,185}.

VI.2.b Profils métaboliques par Spectroscopie RMN ¹H

La diminution de NAA dans le striatum semble un bon biomarqueur de la MH dans les modèles murins. En effet cette diminution est retrouvée dans tous les modèles présentés excepté le modèle YAC128. Tout comme l'atrophie striatale, il apparaît de façon précoce, à seulement quelques semaines chez les souris transgéniques. Dans les modèles knock-in, on retrouve cette altération dès 4 mois chez les souris zQ175, en parallèle de l'atrophie striatale.

L'étude des profils métaboliques de modèles progressifs de la MH est particulièrement intéressante lorsqu'elle est réalisée de façon longitudinale. En effet, elle permet ainsi de découvrir des défauts métaboliques qui peuvent disparaître et revenir dans le temps, suggérant des adaptations homéostatiques. Cela semble par exemple être le cas du Glu et de la Gln, deux métabolites d'intérêt au vu de leur implication dans le métabolisme énergétique. La Gln est augmentée dans la plupart des

modèles murins de la MH, tandis que les études montrent des résultats contradictoires sur le Glu, qui pourraient être expliqués par ces fluctuations dues à l'adaptation homéostatique. Une étude sur le modèle zQ175 a ainsi montré une baisse de Glu striatal à 4 mois, suivie d'un retour à la normal à 8 mois et d'une rechute à 12 mois ¹⁴⁰. En parallèle, la Gln est largement augmentée, ce qui pourrait refléter l'effort cellulaire pour maintenir un niveau de glutamate correct, effort qui deviendrait insuffisant à 12 mois.

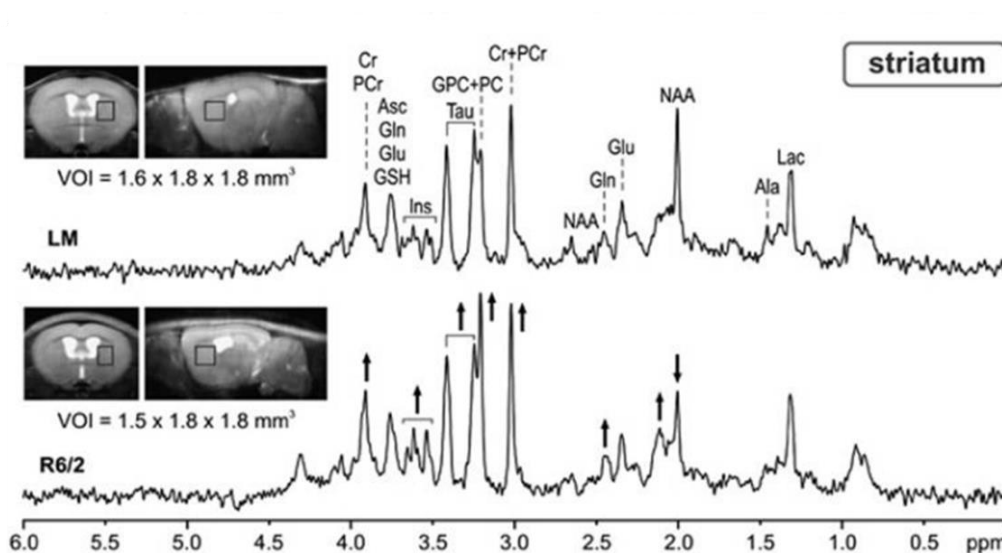


Figure 34 : Changements métaboliques dans le striatum des souris R6/2 comme mesuré par Spectroscopie RMN. Tiré de Zacharoff et al. 2012¹⁸⁶

La protéine Tau est également un métabolite d'intérêt et un potentiel biomarqueur. Cette protéine a montré une diminution striatale chez les souris CAG140 à 12 mois, tandis que dans les modèles N171-82Q, R6/2 ou encore zQ175 au même âge, elle est augmentée (figure 34). Ces résultats d'apparence contradictoires peuvent refléter la différence de progression de la maladie entre le modèle CAG140 très doux et les autres, plus sévères.

Tableau VII : Tableau récapitulatif des variations métaboliques observées dans les modèles animaux de la MH.

	Métabolites en hausse	Métabolites en baisse	Métabolites fluctuants
R6/1		NAA	
R6/2	Gln, Tau, Cr, myo-Ins	NAA, Glu	Cho
N171-82Q		NAA	
CAG140	Gln	NAA, Tau, Cho, Glu	
zQ175	Gln, Tau, Cr, myo-Ins	NAA, Glu, GABA	
YAC128	NAA, Cr, Cho		

VI.2.c Cartes pondérées en glutamate par IRM-CEST

L'imagerie CEST peut être utilisée afin de mesurer des concentrations relatives d'un certain nombre de molécules d'intérêt dans le cerveau, avec une résolution spatiale bien meilleure que la spectroscopie RMN. Cependant, du fait de son développement récent et du champ intense requis, seule l'imagerie gluCEST a été utilisée pour le moment dans le cadre de la MH, sur les modèles CAG140 et R6/1^{136,146}. Ce dernier n'a montré aucune différence significative dans le striatum à 7 mois, alors que l'atrophie était déjà présente.

En revanche, les souris CAG140 ont montré une réduction du contraste gluCEST dans le corps calleux, le striatum et le cortex piriforme à 12 mois (figure 35). Ce défaut est dépendant du génotype et, de façon intrigante, est plus intense dans le corps calleux. Ce résultat souligne l'importance de l'imagerie de la matière blanche dans la MH.

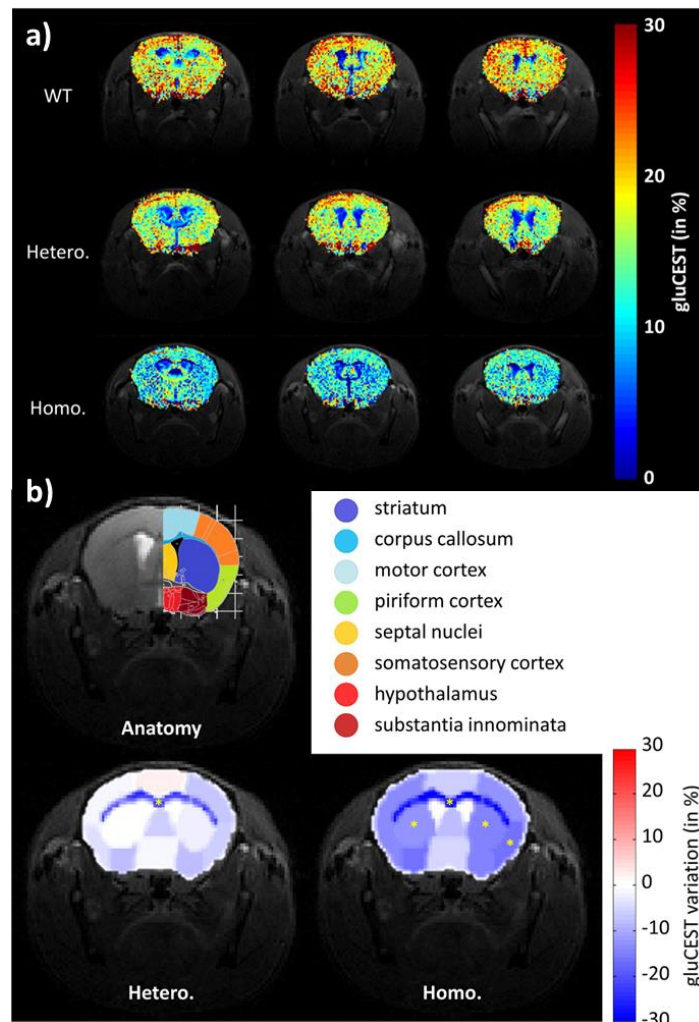


Figure 35 : a) Images gluCEST du cerveau de souris témoins (haut), et CAG140 hétérozygotes (milieu) et homozygotes (bas). b) Cartes de variation de signal gluCEST entre souris témoins et hétérozygotes (bas-gauche) ou homozygotes (bas-droite), après segmentation selon l'atlas situé en haut à gauche. Tiré de Pépin et al. 2016

VI.2.d Intégrité de la microstructure par Imagerie en Tenseur de Diffusion

L'imagerie pondérée en diffusion a été utilisée pour mesurer l'ADC dans le modèle R6/2 de la MH, sur des souris relativement âgées pour ce modèle sévère (10-12 semaines) ¹⁸⁷. L'ADC mesurée était augmentée dans le globus pallidus, indiquant une diffusion moins contrainte, d'une façon ou d'une autre. Des expériences supplémentaires ont permis d'établir une corrélation avec une augmentation de la fraction extracellulaire dans cette structure. L'imagerie pondérée en diffusion peut donc révéler des dommages importants de la microstructure à travers la mesure de l'ADC. Cependant l'imagerie du tenseur de diffusion permet d'aller plus loin en explorant les composantes transversale et longitudinale de la diffusivité. L'AD et la RD sont augmentées dans le corps calleux des souris R6/2 ¹⁸⁸. A l'inverse, les souris YAC128 montrent une accélération de la baisse de MD due au vieillissement ¹⁸⁹.

La FA, telle que mesurée par DTI, a été observée décrie dans le corps calleux des souris R6/2 dès l'âge de 4 semaines, au même âge que l'apparition de l'atrophie striatale et du défaut de NAA striatal, et bien avant l'augmentation visible de l'ADC ¹¹³. De façon surprenante, la FA a été trouvée diminuée dans le corps calleux des souris YAC128 plus tôt encore, dès l'âge de deux semaines, malgré que ce modèle soit plus progressif ¹⁰⁹. Chez ces souris, une étude longitudinale montre que la baisse de FA concerne le cortex préfrontal, le striatum, l'hippocampe, le pallidum et le thalamus ¹⁸⁹.

Tableau VIII : Tableau récapitulatif des variations des paramètres de diffusion observées dans les modèles animaux de la MH.

	Matière grise	Matière blanche
R6/2		FA ↓ AD, RD, MD ↑
YAC128	FA, MD ↓	FA ↓
Rat BACHD		FA ↓

Les paramètres de DTI ne sont pas aisément interprétables. L'augmentation de l'AD et de la RD, combinée à la baisse de FA, peut être expliquée par une perte d'organisation des tissus dans le corps calleux des R6/2. Cela peut se traduire par une démyélinisation ou bien une perte axonale. L'imagerie du kurtosis de diffusion, une généralisation du DTI prenant en compte un modèle plus complexe avec plusieurs compartiments, a montré une augmentation de la tortuosité ainsi qu'une densité axonale accrue ¹⁸⁸. Le DKI pourrait ainsi permettre d'aller plus loin dans l'interprétation des résultats de l'imagerie de diffusion, mais d'autres études sont nécessaires.

L'imagerie de diffusion, à l'instar de l'imagerie gluCEST, met en évidence la vulnérabilité de la matière blanche et montre avec la FA l'un des biomarqueurs les plus précoces et significatifs sur le plan biologique dans la MH.

VI.2.e Connectivité fonctionnelle des structures cérébrales par rs-fMRI

L'IRMf englobe plusieurs techniques basées sur le contraste BOLD. Les paramètres les plus classiquement étudiés en IRMf sont le Volume Sanguin Cérébral (VSC) et le Flux Sanguin Cérébral (FSC). Le VSC est augmenté chez les souris R6/2 âgées de 7 semaines, en particulier dans le striatum et dans les cortex frontal et moteur, ainsi que dans l'hippocampe et le thalamus à 14 semaines¹⁹⁰. Le FSC est également augmenté dans ce modèle. En revanche, la fraction de vaisseaux réactifs, c'est-à-dire l'augmentation du VSC et du FSC après un stimulus, est largement réduite chez ces souris¹⁹¹. Ces observations sont confirmées sur d'autres modèles. L'imagerie pondérée T₂ suite à l'injection intraveineuse d'oxyde de fer a permis de montrer une augmentation de la densité vasculaire dans le modèle N171-82Q¹⁹¹. La réponse vasculaire à l'activation est diminuée dans le modèle zQ175¹⁹². Tous ces résultats semblent indiquer une dynamique d'activation vasculaire cérébrale altérée avec un niveau basal plus élevée mais moins d'amplitude dans la réponse d'activation.

Ces altérations semblent avoir un impact au niveau de la connectivité fonctionnelle. En effet, l'étude de la covariance des signaux BOLD inter-régions à l'état de repos a permis d'identifier des réseaux neuronaux fonctionnels. Si les réseaux identifiés sont similaires chez les souris modèles de la MH et les souris témoins, la corrélation intra-réseau est décrie dans le modèle N171-82Q entre les cortex moteur, rétrospécial, préfrontal et somato-sensoriel, le thalamus et le striatum¹⁹³ (figure 36). Il est intéressant de noter que toutes ces structures sont impliquées dans la fonction motrice. De plus, la baisse de connectivité fonctionnelle est corrélée à l'atrophie striatale, montrant la pertinence de cette mesure comme biomarqueur de la MH.

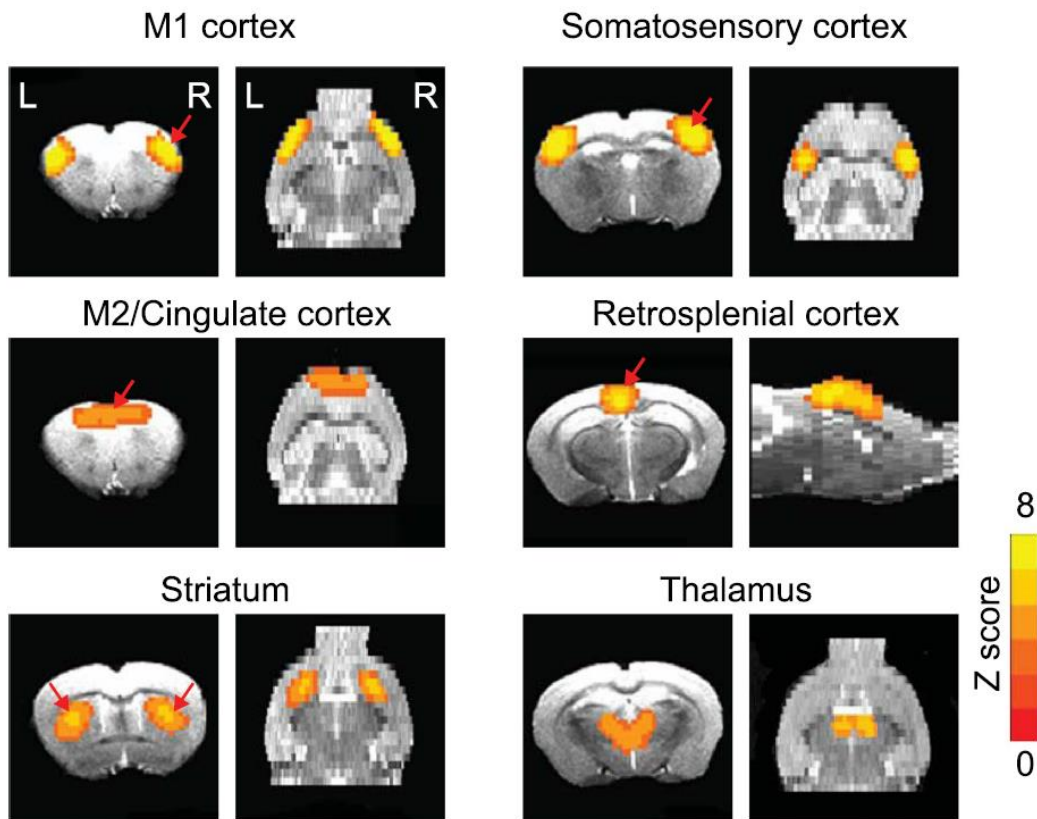


Figure 36 : Réseaux neuronaux détectés par IRM fonctionnelle à l'état de repos. Les structures identifiées dans le réseau sont similaires chez les souris N171-82Q et témoins. Tiré de Li et al. 2017¹⁹³

De manière tout aussi intéressante, la comparaison de la connectivité fonctionnelle avec un atlas de projections axonales a montré une correspondance avec les réseaux altérés dans le modèle YAC128, notamment le réseau du mode par défaut ¹⁹⁴.

VI.3. Récapitulatif des biomarqueurs par IRM de la MH

Le tableau IX récapitule toutes les informations sur les biomarqueurs par IRM et RMN, clinique et préclinique, de la MH. On peut voir que si la morphométrie et les spectres métaboliques ont été beaucoup étudiés, d'autres modalités pourtant pertinentes n'ont pas été utilisées dans tous les modèles animaux ou en clinique.

Pour conclure cette introduction, après avoir fait un tour d'horizon des biomarqueurs de la MH chez l'homme et dans les modèles animaux, il apparaît que plusieurs modalités d'IRM sont capables de fournir des informations pertinentes sur certains aspects fonctionnels, métaboliques ou microstructuraux, et ce de façon assez précoce. Il ressort également que les études longitudinales, permettant de suivre la progression d'un marqueur dans le temps, et où les sujets sont leurs propres témoins, sont particulièrement intéressantes pour l'étude des mécanismes de pathogénèse et la recherche de biomarqueurs précoces de la maladie.

Dans l'objectif d'améliorer la compréhension de la pathogénèse de la MH et ASC7, ainsi que de mesurer l'efficacité de thérapies, le travail de la présente thèse a été l'évaluation de ces biomarqueurs dans des modèles animaux de la MH et ASC7. Le prochain chapitre présentera la méthodologie utilisée, en particulier les protocoles d'IRM et les traitements d'image mis au point pour ce projet.

	Structural MRI	1H-MRS	DTI	fMRI	rs-fMRI	CEST/MT
N171-82Q	Matière grise: Str, Neocx, HC, HT, Th, Pir ↓ Matière blanche : CC ↓	NAA ↓ dans Str et cerveau entier		Densité vasculaire ↑	FC↓ entre MO et PFC, Rspl etTh, Str et autres, et intra SSp	
R6/1	Matière grise: Cerveau entier, Str, Rspl, SSp, HC ↓	tNAA ↓				Pas de changement du signal gluCEST
R6/2	Matière grise: Cerveau entier, Str, Neocx, HC, Th Pir ↓ GP ↑ Matière blanche : CC ↓	NAA, Glu, Cho ↓, Gln, Cr, Cho, myo-Ins, Tau ↑	FA ↓, AD, RD, MD ↑ dans le CC Tortuosité et densité axonale augmentées	VSC ↑ dans le Str, TempC, Mop, PFC, HC, TH mais réactivité ↓ FSC ↑ mais réactivité ↓		
CAG140	Matière grise:Str ↓	NAA, Tau ↓ chez souris Hm et Htz Gln ↑ et Cho ↓				GluCEST ↓ dans le CC, Str, Pal, Cx
zQ175	Matière grise: Cerveau entier, Str, Cx, Pir, GP, SSp, SN, HC, Th ↓ Matière blanche: Fimbria ↓	NAA, Glu, GABA ↓ Gln, Tau, Cr, myo-Ins ↑		Activation anormale dans FC, HT, HC Réponse à un challenge CO ₂ ↓		
YAC128	Matière grise: Cerveau entier, Str, NéoCx, Pir, Mop, Rspl, HC, Th, OB ↓; SSp, Cb, Sep, Ent, FC ↑ 123 Matière blanche: CC↓	Cr, NAA, Cho, GABA ↑	FA, MD ↓ dans le CC FA ↓ dans PFC, Str, HC, GP, Th	Baisse de VSC ↑ dans le Str	FC ↓ dans le cerveau entier Amplitude des fluctuations ↑	
rat BACHD			FA ↓ dans le CC			
Clinique	Matière grise: Cerveau entier, St, NéoCx, Th, Cb ↓ Matière blanche: CC, capsules ↓	Hétérogénéités chez les patients. En général: NAA, Cr, Cho ↓ Glu, myo-Ins ↑	FA ↑ dans le Str et GP FA ↓ dans CC, capsules, fornix, fascicula RD ↑ dans le CC	Activation ↓ dans le Cx	FC ↓ dans le cerveau entier, entre Mop et Cau, dans le réseau de mode par défaut Connectivité inter-régions ↓ mais Connectivité intra-région ↑ SPL ↓	MT ↓ dans le Cx, Pu, HC, amygdala MMPF ↓

Tableau IX : Tableau récapitulatif des atteintes observées en IRM clinique et préclinique de la MH. Str= Striatum, Neocx= Néocortex, HC= Hippocampe, Th= Thalamus, HT= Hypothalamus, Pir= Cortex Piriforme, Rspl= Cortex rétrosplénial, SSp= Cortex somato-sensoriel, GP= Globus Pallidus, SN= Substance noire, Mop= Cortex moteur, OB= Bulbes olfactifs, Cb= Cervelet, Sep= Septum, Ent= Cortex entorhinal, TempC = Cortex temporal, PFC= Cortex préfrontal.

Chapitre VII: Post-traitement des données IRM

Dans les chapitres précédents, nous avons introduit les différents concepts et le cadre scientifique de ce travail de thèse. Cette dernière s'inscrit dans le projet TreatPolyQ, qui vise à développer des thérapies géniques avec spécificité allélique pour les maladies à PolyQ. Dans ce cadre, l'objectif de cette thèse est l'évaluation de biomarqueurs par IRM dans les modèles animaux des maladies à PolyQ, pour la meilleure compréhension des mécanismes de pathogénèse et pour l'évaluation de l'efficacité des thérapies.

Dans ce chapitre, à la lumière des chapitres précédents qui ont présenté les biomarqueurs et modèles animaux disponibles, nous allons présenter la méthodologie générale employée ainsi que les développements méthodologiques qui ont été réalisés pour cette thèse. En particulier, les aspects de traitement d'images, primordiaux dans l'analyse des résultats, seront développés. Les détails méthodologiques propres à chaque étude menée au cours de cette thèse seront ensuite présentés dans les chapitres correspondants.

VII.1. Méthodologie d'expérimentation animale

Le développement de thérapies géniques nécessite l'essai de ces thérapies sur des modèles animaux avant transfert sur des patients, pour des raisons de sécurité mais également de praticité. En effet, lors des études préliminaires la molécule testée n'est pas optimale et nécessite généralement quelques mises au point trop coûteuses en clinique. Le projet TreatPolyQ se place donc uniquement dans la partie préclinique du développement, avec néanmoins l'ambition d'une recherche translationnelle qui permette un transfert rapide en clinique.

Pour cela, le choix des modèles animaux utilisés dans cette thèse a été primordial. Trois études vont être présentées dans les prochains chapitres, portant sur trois modèles différents. Comme exprimé dans le chapitre IV, le choix d'un modèle doit être appuyé par la question scientifique à laquelle on souhaite répondre, au mécanisme que l'on souhaite étudier, ainsi qu'à la temporalité visée.

VII.1.a Conception des études longitudinales

Dans l'introduction, nous avons vu que l'IRM préclinique permet la mesure de nombreux paramètres pouvant être utilisés comme biomarqueurs (voir chapitre VI). Afin d'évaluer la spécificité de ces biomarqueurs vis-à-vis des processus biologiques impliqués dans la progression de la maladie et leur sensibilité au cours du temps, il a été décidé de suivre leur évolution de façon longitudinale, avec

plusieurs mesures successives sur les mêmes animaux au cours de leur vie. Ce type d'étude longitudinale est très puissante car chaque animal est son propre témoin, et des tendances d'évolution différentes peuvent apparaître au cours du temps entre groupes.

De plus, il a été décidé de combiner l'acquisition de plusieurs biomarqueurs dans le protocole de chaque étude, afin d'obtenir un maximum d'information dans la durée d'une seule anesthésie de l'animal. Cependant, afin de limiter la sévérité de la procédure pour l'animal, et de garantir un nombre suffisant d'animaux sans monopoliser l'appareil d'IRM trop longtemps, la durée maximale d'acquisition a été fixée à 2h par animal, induction de l'anesthésie et installation comprises.

VII.1.b Choix de l'espèce

Une première question posée lors de la conception des études est la question de l'espèce animale à utiliser. En effet, des modèles souris et rats de la MH existent et ont chacun leurs spécificités. La taille de leur cerveau fait des modèles rats une alternative intéressante aux modèles souris. Cependant, la possibilité d'utiliser une sonde cryogénique dans les modèles souris compense la perte de signal grâce à une résolution spatiale supérieure, et au global on peut atteindre des niveaux de résolutions comparables en proportions avec un RSB correct pour les deux espèces. La différence se fait cependant sur l'homogénéité du signal, la sonde cryogénique étant une sonde surfacique qui ne délivre pas une puissance homogène sur toute la profondeur de la coupe. Pour les modalités où ce paramètre est important, comme en imagerie CEST, l'utilisation de cette sonde sur des modèles souris est donc plus adéquate pour l'imagerie de structures plates et dorsales, telles que le corps calleux ou l'hippocampe mais peu adéquate pour l'imagerie du cerveau entier. Pour cela, on préférera passer à une antenne volumique, et dans ce cas il est plus avantageux d'utiliser un modèle rat. Ces deux espèces permettent donc des études qui sont complémentaires, et durant cette thèse nous avons utilisé un modèle rat et deux modèles souris.

VII.1.c Choix des modèles

Dans le cadre du projet TreatPolyQ, pour maximiser l'impact des thérapies et minimiser la neurodégénérescence, on souhaite se placer très tôt dans la phase présymptomatique de la maladie. Nous avons donc privilégié les modèles knock-in, très progressifs. De plus, ces modèles ne surexpriment pas la HTT mutée mais intègrent l'expansion PolyQ dans le gène endogène du rongeur, mimant avec plus d'exactitude le mécanisme pathologique chez l'homme (voir chapitre IV).

Parmi les modèles knock-in souris, deux modèles bien caractérisés ont été considérés pour la MH, le modèle CAG140 et le modèle zQ175. Le premier a finalement été sélectionné, à la fois pour son aspect

plus progressif que le modèle zQ175 mais également afin de faire suite à la précédente étude de l'équipe¹³⁶. La première étude, présentée au chapitre suivant porte donc sur ce modèle.

De même, la troisième étude qui sera présentée au chapitre X porte sur des souris hétérozygotes d'un modèle knock-in d'ASC7, le modèle SCA7^{140Q/5Q}. Ce modèle, bien caractérisé¹⁴⁵, est également progressif et permet de se placer en amont de l'apparition des symptômes pour le traitement et les premières mesures d'imagerie.

Enfin, pour le modèle rat, nous avons choisi le modèle rat BACHD car c'est un modèle très bien caractérisé, progressif et qui a déjà été étudié au laboratoire (voir thèse de Jérémy Pépin¹⁴⁹). A notre connaissance il n'existe pas de modèle rat knock-in de maladies à PolyQ. Le modèle rat BACHD est le sujet de la deuxième étude, qui sera présentée au chapitre IX.

VII.1.d Élevage

Tous les animaux ont été hébergés dans les animaleries de MIRCen et élevés conformément aux conditions sanitaires et aux principes de bien-être animal et d'éthique. Les animaux sont entrés dans le protocole de recherche dans le cadre d'une saisine éthique (APAFIS#21335-201907031642584 v1). La saisine prévoit une attention particulière aux points limites de bien-être animal. Pour cette raison, tout animal ayant subi une chirurgie a été pesé par la suite de façon hebdomadaire afin de vérifier qu'il ne dépassait pas ce point limite fixé à 10% de perte de poids. Une attention a également été portée sur l'enrichissement du milieu de vie des animaux. Ces derniers ont eu accès à des matériaux de nidification avec change hebdomadaire.

VII.2. Acquisition des données

VII.2.a Matériel général d'acquisition

Tous les animaux ont été scannés dans l'IRM 11.7T Bruker située à MIRCen (figure 37 a), pilotée par le logiciel ParaVision 6.0.1. Les sondes utilisées comprennent une sonde volumique émission/réception utilisée pour l'imagerie des rats (Bruker, figure 37 b) et une sonde cryogénique émission/réception en quadrature utilisée chez la souris (Bruker, figure 37 c). La sonde volumique a été uniquement utilisée en émission et couplée avec une sonde surfacique de réception (Bruker, figure 37 d-e).

La sonde cryogénique, ou cryosonde, permet de réduire le bruit électronique grâce à un système de refroidissement à l'hélium liquide, ce qui permet l'augmentation du RSB de 2,5 fois par rapport à la configuration alliant antenne volumique en émission et antenne surfacique en réception. En revanche, contrairement à l'antenne volumique, cette antenne surfacique délivre une puissance non homogène, qui dépend de la profondeur des tissus.

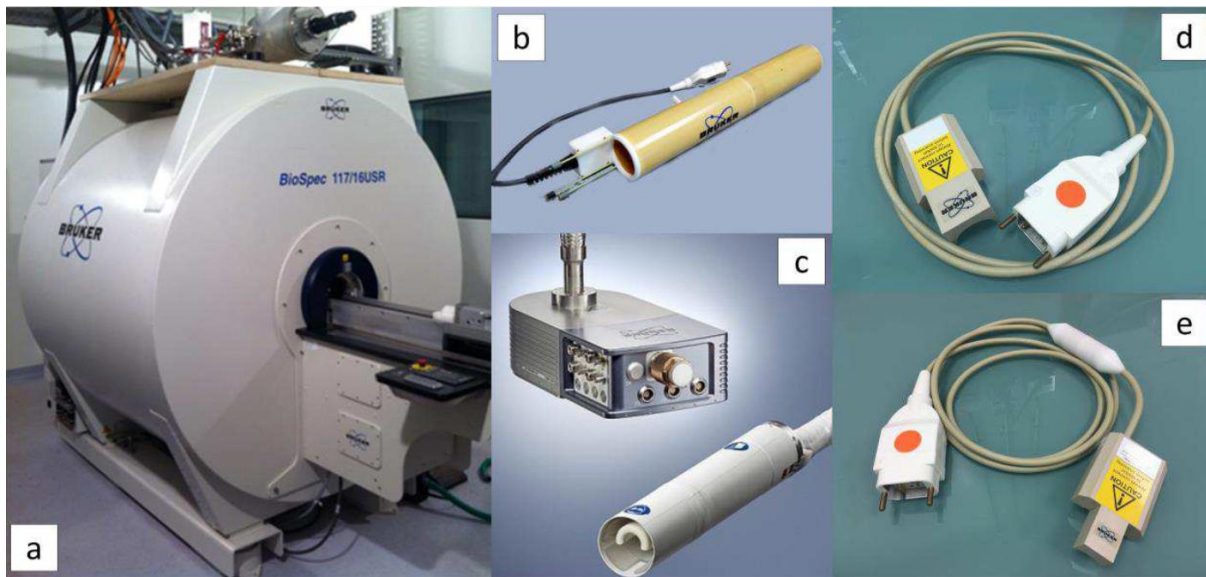


Figure 37 : Matériel d'acquisition utilisé lors de cette thèse. a) IRM 11,7T BioSpec Bruker. b) Antenne volumique émission/réception. c) Antenne surfacique cryogénique en quadrature émission/réception. d) Antenne surfacique de réception pour rats. e) Antenne surfacique de réception pour souris.

Le système de surveillance de la santé de l'animal comprenait une sonde thermique rectale et un ballonnet captant les respirations, reliés à un écran affichant la température interne et le rythme respiratoire de l'animal. Ce système permet ainsi d'ajuster le débit d'anesthésie ainsi que la température via un chauffage dans le lit de l'animal et une couverture chauffante. Le protocole d'anesthésie de chaque étude sera détaillé dans les chapitres correspondants.

VII.2.b Calibration de puissance

La cryosonde utilisée étant une sonde surfacique, il est nécessaire de calibrer la puissance délivrée par cette dernière afin qu'elle soit le plus homogène possible. La calibration de puissance a donc été réalisée manuellement avant l'acquisition de l'image anatomique, dans une coupe de 2 mm d'épaisseur tangente au sommet du cerveau. Cette épaisseur permet de limiter la puissance délivrée par l'antenne, qui peut sinon saturer le signal proche de l'antenne. En revanche, tout le cerveau ne pouvant être contenu dans les 2 mm de coupe, la puissance délivrée n'est pas homogène selon la profondeur. Pour les séquences anatomiques et de diffusion l'effet de cette erreur est négligeable, mais pour l'imagerie CEST on s'attend à une puissance de saturation précise pour être sélectif sur la saturation. Ainsi, avant la séquence d'imagerie CEST la puissance a été recalibrée avec une coupe de 5 mm d'épaisseur, toujours dans la même orientation (figure 38). Cela permet d'obtenir une distribution homogène de puissance dans tout le cerveau, avec cependant le désavantage d'avoir plus de saturation proche de l'antenne, phénomène illustré dans la figure 39.



Figure 38 : Calibration de puissance dans le cerveau de la souris sur une coupe de 5 mm d'épaisseur tangente au sommet du cerveau.

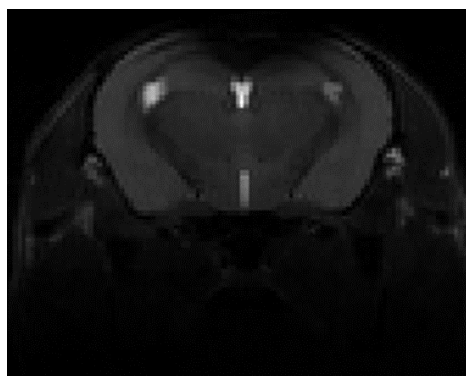


Figure 39 : Image de référence acquise lors d'une séquence CEST avec une saturation très éloignée de la fréquence de saturation de l'eau. On observe une zone d'ombre importante dans la partie supérieure de l'image correspondant à la saturation des spins due à l'inhomogénéité de la puissance délivrée.

VII.3. Traitement d'image

VII.3.a Recalage et segmentation automatique des images

La segmentation des images d'IRM est une étape de première importance lors du traitement d'image. En effet, afin de pouvoir comparer deux groupes d'animaux à l'aide d'un biomarqueur tel que le volume, le signal gluCEST ou encore la FA dans une structure comme le striatum, il est primordial d'isoler correctement cette dernière. La segmentation manuelle des structures d'intérêt permet cela, cependant il existe un risque de surestimation de certains effets induit par le manipulateur. La segmentation automatique permet de s'extraire de ce biais en proposant une segmentation homogène des images opérée par un programme. De plus, cette technique est beaucoup plus rapide et permet de segmenter l'intégralité des structures cérébrales, donnant ainsi accès à des informations qui n'auraient pas été regardées en cas de segmentation manuelle.

Toutes les images acquises durant cette thèse ont subi un traitement de recalage et de segmentation automatique visant à permettre la comparaison inter-groupes des biomarqueurs mesurés région à région. Pour ce faire, la librairie Python Sammba-MRI a été adaptée et utilisée. Sammba-MRI a été

développée à MIRCen par l'équipe du Dr Marc DHENAIN. Cette librairie vise à simplifier la segmentation automatique des images IRM précliniques en proposant des fonctions python haut niveau intégrant de nombreuses étapes du recalage. Ces fonctions font elles-mêmes appel à des outils plus difficiles d'accès comme AFNI, RATS ou FSL. Elles proposent d'entrer de nombreux paramètres en argument des fonctions pour ajuster le recalage. Pour une explication plus exhaustive sur le fonctionnement de Sammba-MRI, le lecteur est redirigé vers la publication de Marina Célestine et al. de 2020 ¹⁹⁵, ainsi que vers la page github de Sammba-MRI (<https://github.com/sammba-mri/sammba-mri>). Dans le cadre de cette thèse, le recalage et la segmentation d'images en provenance de plusieurs modalités a nécessité l'adaptation du procédé de traitement.

VII.3.a.i. Fonctionnement de Sammba-MRI

Lors de l'acquisition d'images d'IRM, les animaux ne sont pas placés exactement à la même position dans l'aimant. A chaque passage d'un animal, un espace est donc défini dans lequel se situent les images dont les informations nous intéressent. Si on tente de superposer ces images entre deux animaux, les cerveaux ne se superposent pas, ayant une position et une orientation légèrement différente, due à la variabilité de la manipulation. Afin de segmenter les images de façon homogène, il est tout d'abord nécessaire de les aligner dans un espace commun. Cette étape est appelée recalage (figure 40 1). Avec Sammba-MRI, le recalage est réalisé en plusieurs étapes successives à plusieurs niveaux. Lors de la première étape, les cerveaux sont simplement moyennés après repositionnement grossier basé sur le centre de masse des cerveaux. Ensuite, les cerveaux sont recalés sur ce premier modèle de façon linéaire, c'est-à-dire en n'autorisant que des translations et rotations sur toute l'image. Ce processus de moyennage-recalage est répété plusieurs fois, en augmentant progressivement les degrés de liberté des transformations possibles pour le recalage. A la sortie du recalage, un cerveau moyenné, appelé modèle de l'étude, est généré. Ce modèle récapitule toutes les caractéristiques communes des images utilisées pour le générer.

Une fois le modèle généré, l'étape de segmentation des images anatomiques de chaque animal consiste à calculer les transformations nécessaires pour superposer chaque image au modèle de l'étude. Enfin, une fois les images individuelles placées dans l'espace du modèle de l'étude, une dernière transformation est calculée pour superposer ce dernier à un atlas, c'est-à-dire une image générique de cerveau déjà segmentée et labellisée (figure 40 2). Les transformations des étapes 1 et 2 sont alors combinées et appliquées aux images anatomiques pour les superposer à l'atlas (figure 40 3).

Sammba-MRI

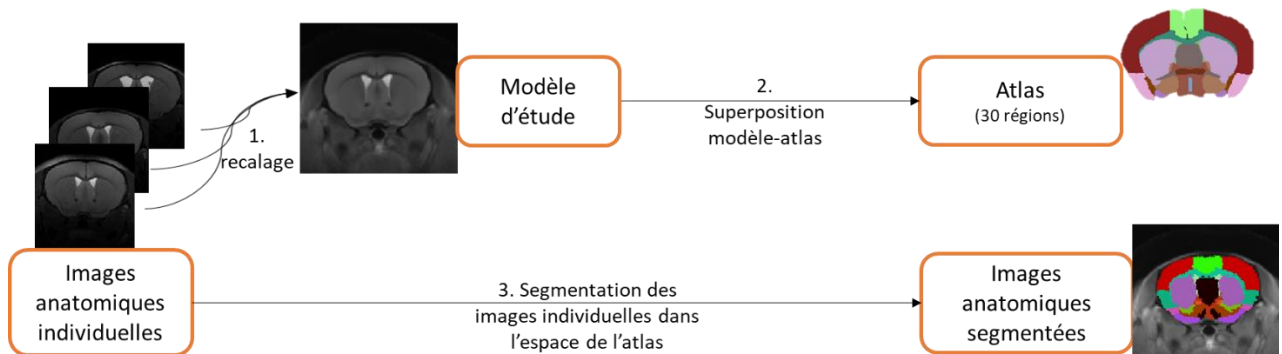


Figure 40 : Fonctionnement de Sammba-MRI dans son utilisation usuelle.

VII.3.a.ii. Limites rencontrées et solutions trouvées

Le module Sammba-MRI a été initialement conçu pour le recalage et la segmentation d'images d'IRMf. L'application à la recherche de biomarqueurs en imagerie anatomique, CEST ou de diffusion a nécessité quelques adaptations.

En effet, la première mesure d'intérêt dans le cadre de ce travail était le volume des structures cérébrales. Or en suivant le procédé décrit ci-dessus, les images anatomiques sont toutes recalées dans le même espace et sont donc transformées pour se superposer le mieux possible à l'atlas. Cela induit un biais dans le volume mesuré en atténuant les différences entre les images. Afin de réduire au maximum les manipulations sur les images individuelles, contenant l'information à mesurer, il a été décidé de modifier le procédé afin d'avoir une approche descendante plutôt qu'ascendante. Ainsi, après calcul des transformations pour passer des images anatomiques au modèle puis du modèle à l'atlas, ces transformations ont été inversées et appliquées à l'atlas, afin d'obtenir une version de l'atlas dans l'espace de chaque individu, se superposant à l'image anatomique (figure 41 3).

Cette approche a également été nécessaire pour la segmentation des images CEST. En effet, cette modalité étant relativement couteuse en temps, pour obtenir une bonne résolution il n'a été possible d'acquérir que 3 coupes dans le cerveau des souris. Afin de couvrir plus de structures, il a donc été décidé de laisser un espace entre ces 3 coupes (voir chapitre VIII). L'image obtenue est donc non-continue et l'application de transformations sur cette dernière génère des erreurs. Afin de garder les 3 coupes intactes et de les segmenter correctement, il a donc fallu également adopter une approche descendante, de l'atlas vers les images CEST.

Cependant, la résolution et le contraste des images CEST, comme ceux des images de diffusion, ne permettent pas de calculer les transformations de recalage avec une bonne précision. Le procédé utilisé pour la segmentation des images anatomiques ne peut donc pas être appliqué tel quel aux

images d'autres modalités. Pour arriver à cette fin, la solution trouvée a été d'utiliser les transformations déjà calculées pour la segmentation des images anatomiques. En effet, les images CEST, de diffusion et anatomique d'un même animal sont par définition dans le même espace et les transformations pour passer de cet espace à l'espace du modèle de l'étude sont donc applicables à l'ensemble de ces images. Cependant, pour pouvoir appliquer ces transformations, il est nécessaire de corriger la géométrie des images, leur résolution et leur origine afin de retrouver une superposition parfaite entre les images anatomiques et les images d'autres modalités (figure 41 4).

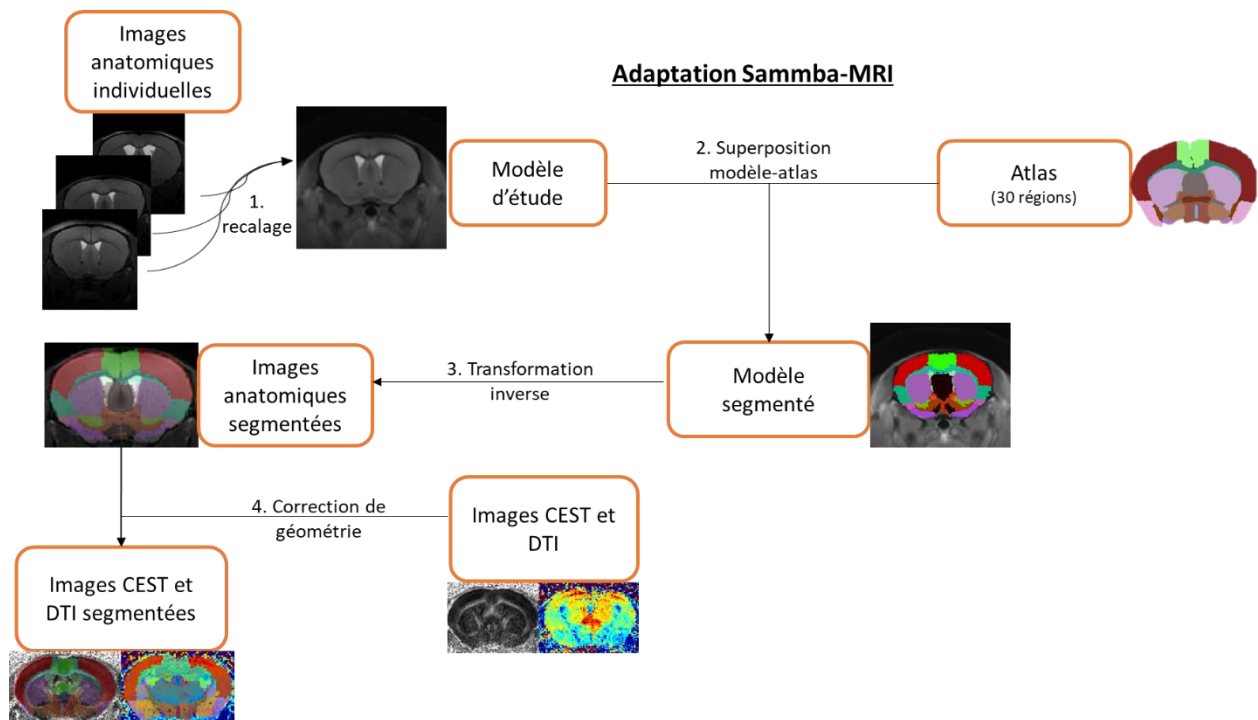


Figure 41 : Fonctionnement du procédé adapté de Sammba-MRI pour répondre aux besoins spécifiques de cette thèse.

Plusieurs approches ont été testées. La dégradation de la résolution des images anatomiques pour correspondre à celle des images CEST avant de calculer les transformations ne permet pas le recalage avec assez de précision. A l'inverse, l'amélioration artificielle de la résolution des images CEST est à éviter car elle peut induire des biais. La meilleure solution trouvée, qui a été utilisée pour les résultats présentés dans les chapitres suivants, a donc été de dégrader la résolution du produit final de la segmentation des images anatomiques, c'est-à-dire l'atlas dans l'espace individuel. Avec cette solution, le calcul des transformations reste optimal grâce à la résolution de l'image anatomique, et les images d'intérêt restent intouchées.

VII.3.b Traitement des images gluCEST

Les Z-spectra obtenus par imagerie CEST ont été corrigés par la méthode WASSR¹⁵⁵ en utilisant des fonctions MATLAB internes au laboratoire. Cette correction est nécessaire pour centrer le Z-spectrum

sur la fréquence de l'eau libre, afin que le calcul du MTRAsym prenne en compte des valeurs avec des déplacements chimiques symétriquement opposés. Le but de la méthode WASSR est d'identifier la valeur du décalage fréquentiel dans chaque pixel de l'image. Contrairement à une cartographie de B_0 standard, la valeur obtenue par la méthode WASSR reflète la valeur absolue de la fréquence de résonance et non une grandeur relative. L'écart par rapport à la fréquence de l'eau libre (référencée par défaut à 0 ppm en imagerie CEST) est ensuite appliqué voxel à voxel pour recentrer le Z-spectrum. Pour ce faire, la méthode WASSR propose d'ajouter une courte séquence au protocole afin d'acquérir un Z-spectrum avec une résolution fréquentielle élevée autour de la fréquence de l'eau. La puissance de saturation utilisée est faible afin de ne saturer que les protons de l'eau libre. Ce Z-spectrum est ensuite interpolé par une fonction spline cubique afin d'en extraire le minimum. Une interpolation similaire est alors appliquée au Z-spectrum à corriger et la valeur de décalage fréquentiel du minimum est soustraite afin de recentrer le pic de saturation directe. La figure 42 illustre le principe de fonctionnement de la méthode WASSR.

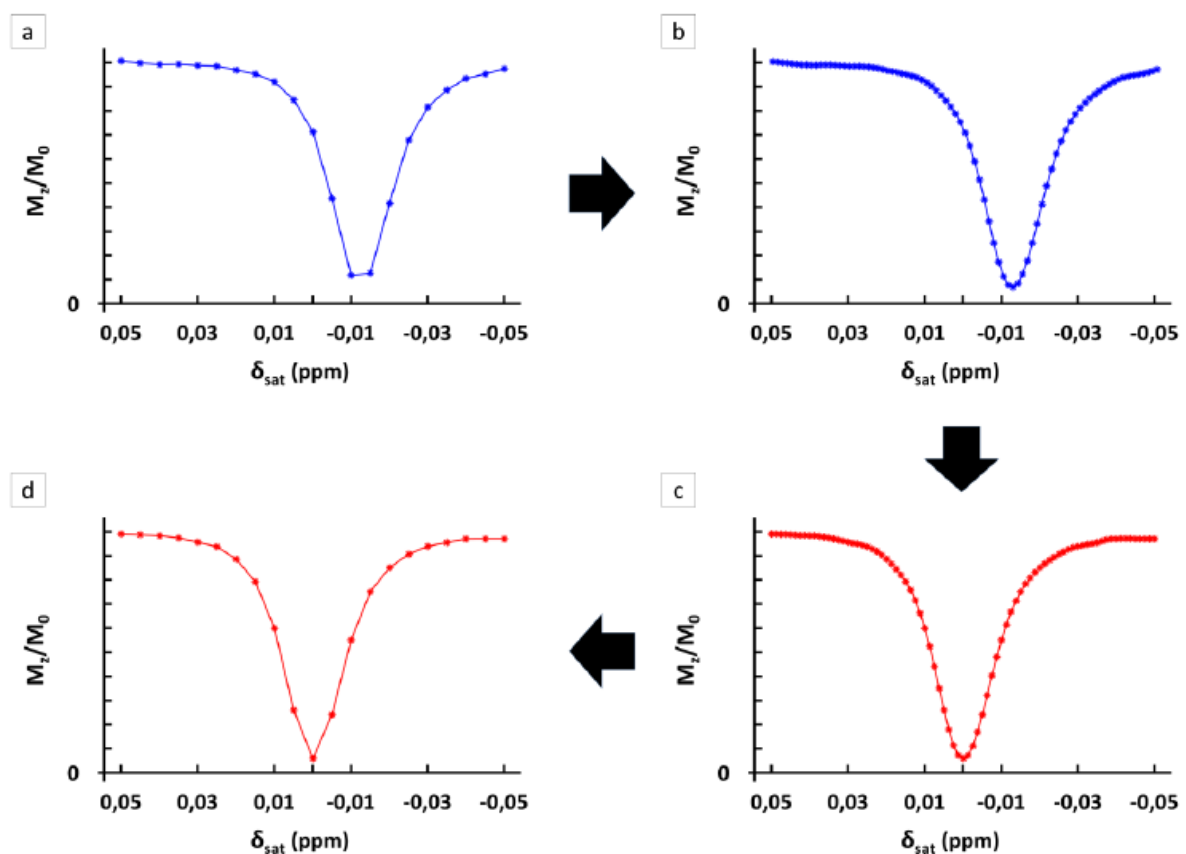


Figure 42 : Correction des inhomogénéités de B_0 par la méthode WASSR. a) Un Z-spectrum est acquis avec une haute résolution fréquentielle autour de la fréquence de résonance de l'eau libre. b) Le Z-spectrum est interpolé par une fonction spline cubique. c) Le décalage fréquentiel pour centrer le pic de saturation directe est calculé. d) La correction est appliquée au Z-spectrum

Après correction des inhomogénéités de B_0 , les MTRasyms ont été calculés à partir des Z-spectra corrigés. Les images CEST ont ensuite été exportées en format NIFTII pour recalage avec Sammba-MRI.

VII.3.c Traitement des spectres métaboliques

Les spectres métaboliques obtenus par spectroscopie RMN ont été traités avec LCMoDel, un outil MATLAB de modélisation du signal permettant une quantification des différents métabolites d'intérêt¹⁹⁶. Une base de métabolites, incluant un spectre des macromolécules acquis au laboratoire, est générée afin de modéliser leurs pics. LCMoDel recherche alors la meilleure combinaison linéaire des pics de chaque métabolite de la base pour interpoler au mieux les spectres acquis. L'analyse délivre les concentrations relatives des métabolites à partir de la solution optimale, avec un indice de confiance (bornes de Cramér-Rao) caractérisant la qualité de l'interpolation. Ainsi, seules les valeurs de concentration avec une borne de Cramér-Rao inférieure à 5% ont été prises en compte.

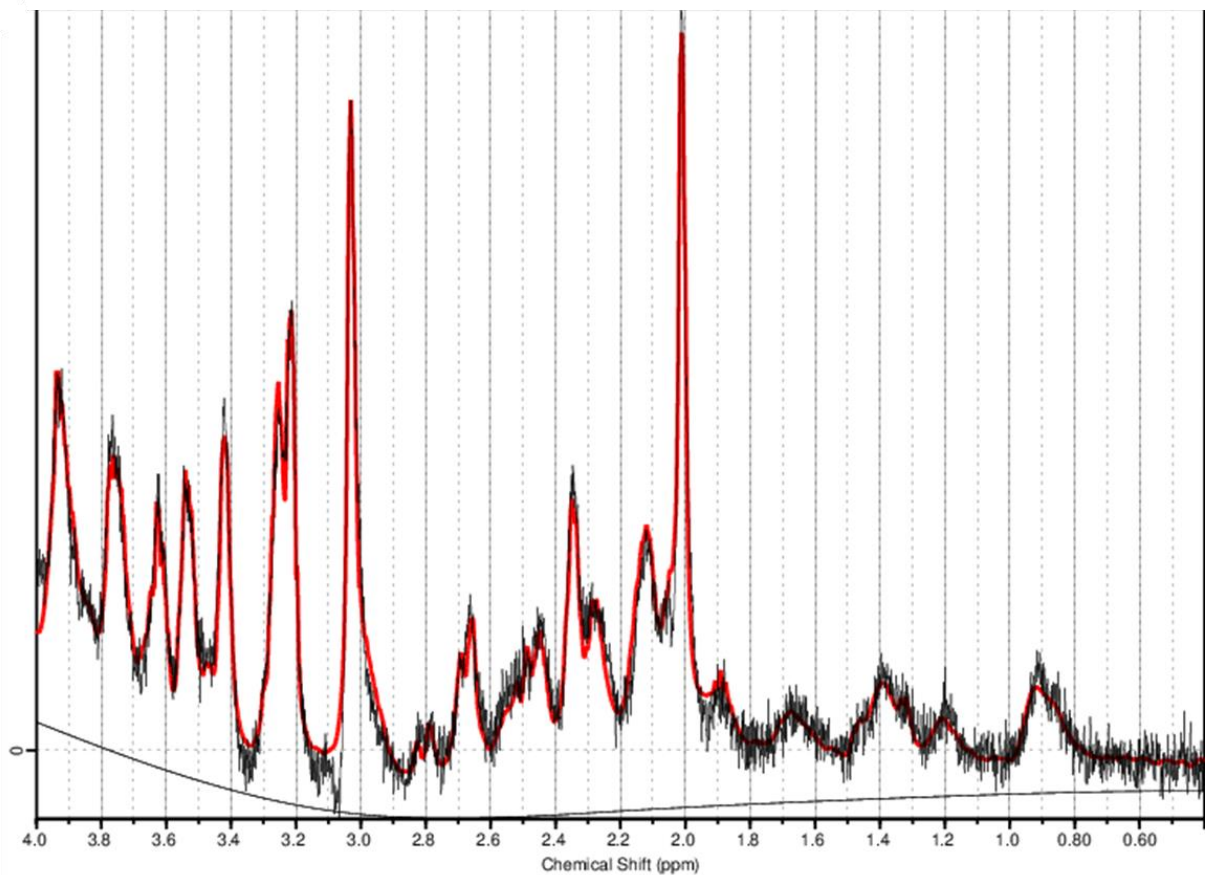


Figure 43 : Exemple d'interpolation de spectre délivrée par LCMoDel.

VII.3.d Traitement des images DTI

VII.3.d.i. Problème rencontré

Une autre difficulté rencontrée au cours de cette thèse concerne la segmentation des images issues de l'imagerie du tenseur de diffusion. En effet, le contraste des images de FA, la mesure la plus utilisée dans cette modalité, marque une grande différence entre la matière grise et la matière blanche. Or, c'est justement la valeur de FA dans la matière blanche qui est d'un intérêt particulier. La segmentation précise de cette dernière, notamment du corps calleux, est donc très importante car chaque voxel de matière grise pris en compte altère fortement la mesure de FA de cette structure.

De plus, la séquence utilisée pour l'acquisition de ces données, nommée *Echo Planar Imaging (EPI)*, est une séquence d'imagerie rapide qui génère des artefacts de distorsion dans l'image. Pour éviter cela, l'acquisition est découpée en plusieurs segments, mais l'augmentation du nombre de segments peut également augmenter la sensibilité aux artefacts de mouvement (*ghosting*), cette séquence y étant très sensible. La séquence EPI que nous avons utilisée contenait 8 segments, ce qui a permis de s'affranchir des artefacts de distorsion mais qui a généré des artefacts de mouvement sur un nombre important d'images (figure 44).

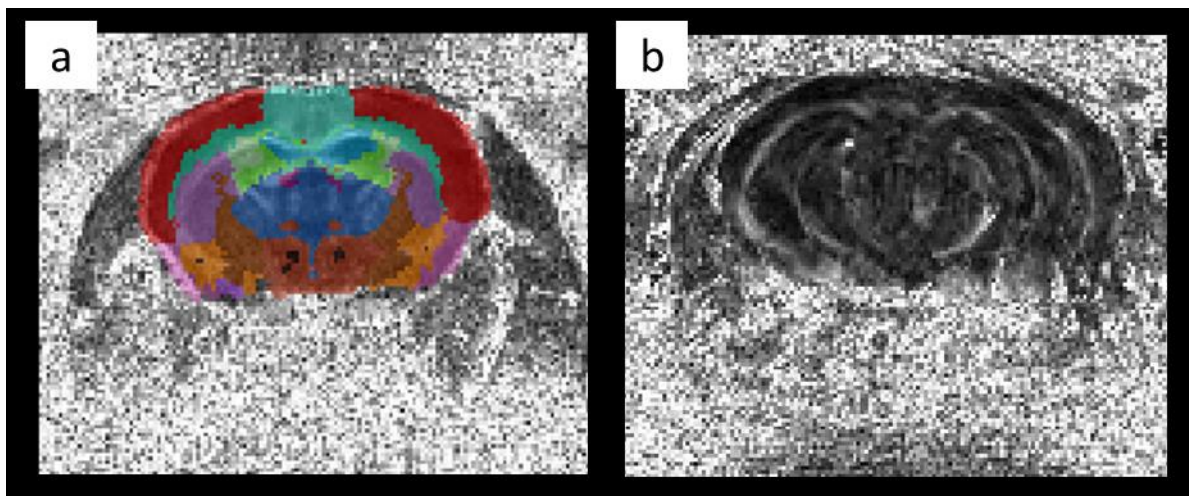


Figure 44 : a) Segmentation d'une image de FA. L'atlas ne se superpose pas bien avec la matière blanche dans le CC latéral. b) Image de FA montrant un artefact de mouvement.

C'est pourquoi la segmentation par atlas telle que décrite plus haut n'a pas donné de résultats significatifs dans l'analyse des biomarqueurs de diffusion, les mesures montrant une dispersion élevée en partie à cause de la segmentation et en partie à cause des artefacts. Pour pallier cette difficulté, plusieurs solutions ont été proposées.

Tout d'abord, un seuil de ratio contraste sur bruit a été défini pour éliminer de façon objective les images pour lesquelles les artefacts de mouvement étaient trop problématiques. Ce ratio est défini comme ceci :

$$CNR = \frac{S(\text{matière blanche}) - S(\text{matière grise})}{\sigma(\text{Bruit})}$$

, où $\sigma(\text{Bruit})$ est l'écart-type dans un échantillon représentatif de voxels pris à l'extérieur du cerveau sur l'image. Après avoir calculé ce ratio pour chaque image, nous nous sommes aperçu qu'un seuil fixé à 1,5 permettait de s'affranchir des artefacts de mouvement en retirant majoritairement les images remplies d'artefacts. Selon les sessions d'imagerie, entre 10 et 30% des images ont ainsi été écartées.

VII.3.d.ii. Approche voxel-à-voxel

A partir des images sélectionnées sur la base du ratio contraste-sur-bruit, il a été décidé d'utiliser une approche basée sur l'analyse voxel-à-voxel plutôt que par atlas afin de se libérer des limites de la segmentation. L'analyse TBSS, mentionnée au chapitre précédent, a été justement développée chez l'homme pour répondre à ce problème de segmentation de la matière blanche, critique en imagerie du tenseur de diffusion ¹⁷³(figure 45). Intégré à la librairie d'outils d'analyse d'images IRM FSL ¹⁹⁷, le procédé TBSS comprend un recalage des images de FA, suivi du calcul d'un modèle de matière blanche. Ce modèle, moyenne de la matière blanche des images individuelles, est ensuite « squelettisé » afin d'obtenir une image avec des faisceaux de matière blanche d'un seul voxel d'épaisseur. Cette opération est répétée sur les images individuelles et leurs squelettes sont projetés vers le squelette du modèle. Cette opération permet une superposition parfaite de la matière blanche pour toutes les images. Après projection, une analyse statistique voxel-à-voxel est réalisée. Afin de limiter le risque de fausse significativité liée à la comparaison multiple, une correction *Threshold Free Cluster Enhancement* (TFCE) est appliquée. Cette correction permet de ne retenir que les clusters de voxels montrant une différence significative de FA. L'analyse TBSS est aussi applicable aux autres paramètres de diffusion tels que l'AD ou la RD. Dans ce cas les paramètres de projection calculés avec les images de FA seront appliqués aux images d'AD ou de RD et seule la dernière étape de statistiques reste à faire. Le procédé de TBSS a été adapté pour sauter le recalage initial des images de FA, déjà réalisé avec plus de précision par Samba-MRI.

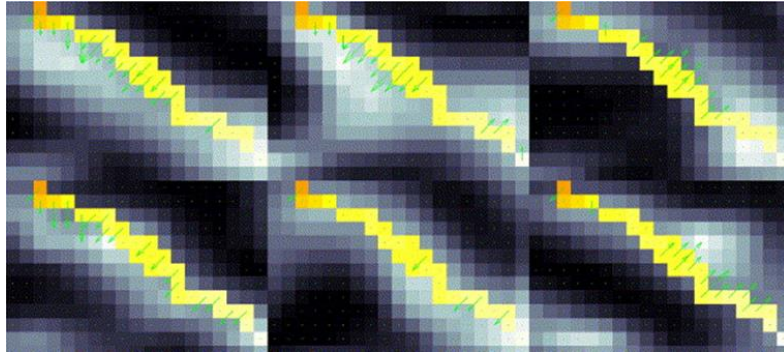


Figure 45 : Projection du squelette de FA de chaque individu vers le modèle généré par TBSS. Tiré de Smith et al. 2006 ¹⁷³

VII.3.e Traitement des images rs-fMRI

Le recalage des images d'IRMf à l'état de repos a été réalisé à l'aide de la fonction `fmri_sessions_to_template` de Samba-MRI. Cette fonction intègre un nettoyage du signal temporel, c'est-à-dire que les images successives qui ne coïncident pas sont corrigées, ainsi qu'une correction des artefacts de mouvement (appelant certaines fonctions de la librairie `nilearn`). Après recalage des images fonctionnelles, une analyse *Dictionary Learning* (DL) a été utilisée ¹⁹⁸. Cette technique analyse les corrélations entre chaque voxel, sans segmentation initiale, et définit des régions de voxels dont l'activation est hautement corrélée (figure 46). Le nombre et la signification de la sortie du DL sont définis par le nombre de composantes donné en entrée. Par exemple, une analyse DL à 20 composantes va donner 20 régions qui vont correspondre à peu près aux régions anatomiques, alors qu'une analyse DL à 6 composantes va donner en sortie 6 réseaux regroupant plusieurs régions anatomiques dont l'activation semble corrélée.

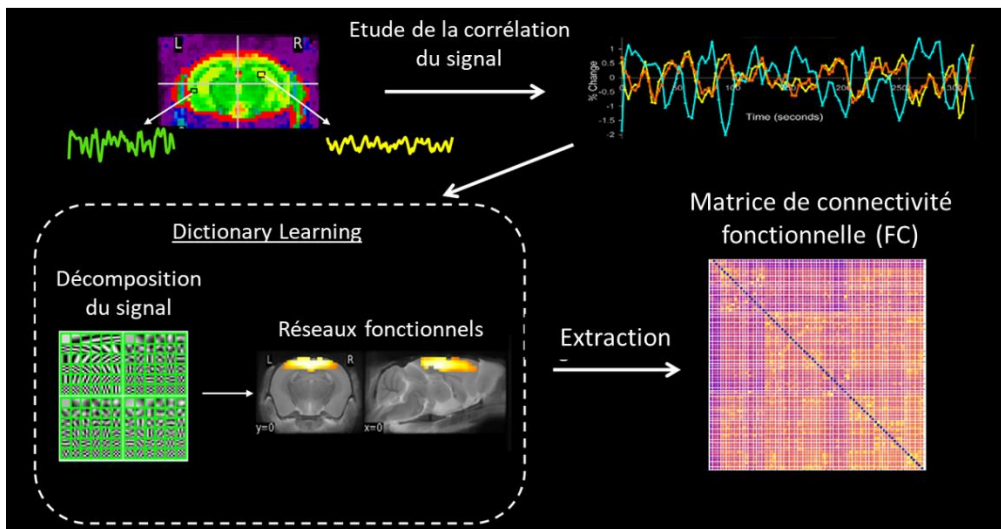


Figure 46 : Traitement des images d'IRMf par Dictionary Learning

A partir du résultat de ces analyses, les corrélations entre les régions définies par l'analyse DL ont été calculées et comparées entre les groupes. La correction de Bonferroni pour comparaison multiple a été appliquée. Les résultats se présentent sous forme d'une matrice de corrélation différentielle.

VII.3.f Cartes de variation

Après segmentation et extraction des valeurs des paramètres de volume, CEST, MT ou diffusion dans chaque région du cerveau des animaux, des cartes de variation moyenne ont été générées pour comparer les groupes. Pour cela, la valeur moyenne d'un paramètre a été calculée dans chaque région pour chaque groupe. La variation entre un groupe pathologique et le groupe témoin est ensuite calculée par la formule :

$$Var (\%) = \frac{Paramètre (groupe pathologique) - Paramètre (groupe témoin)}{Paramètre (groupe témoin)} * 100$$

Les valeurs de variation de chaque région sont ensuite rapportées dans un atlas pour obtenir une carte de variation telle qu'illustrée dans la figure 35 b (chapitre VI). Ces cartes permettent une bonne visualisation des régions affectées.

Après l'introduction des concepts importants des maladies à PolyQ et des biomarqueurs d'IRM et après avoir décrit la méthodologie générale utilisée lors de cette thèse, nous allons maintenant présenter les résultats de cette dernière. Ces résultats vont être développés dans trois chapitres correspondants aux trois études longitudinales réalisées sur les modèles CAG140, BACHD et SCA7^{140Q/5Q}.

Chapitre VIII: Étude de la pathogénèse de la MH dans le modèle souris CAG140

VIII.1. Introduction

La compréhension des mécanismes de pathogénèse est un enjeu majeur de la recherche contre la MH. Les récentes études réalisées sur des porteurs présymptomatiques du gène muté de la *HTT* et dans des modèles animaux montrent que les atteintes de la matière blanche représentent une facette non négligeable dans le développement de la MH et une piste intéressante pour la découverte de leviers thérapeutiques. Dans cette optique, la recherche de biomarqueurs non invasifs précoces présente un double intérêt : permettre la caractérisation de la progression de la maladie afin d'en comprendre les mécanismes, mais également pouvoir évaluer l'efficacité de potentiels thérapies. Chez l'homme comme chez l'animal, les études portant sur la matière blanche et incluant de l'imagerie se sont jusqu'ici concentrées sur l'étude de la microstructure par imagerie de diffusion^{113,116}, de l'intégrité de la myéline par imagerie MT¹¹⁷, ou bien de l'atrophie des structures cérébrales⁵⁷. De précédents résultats du laboratoire ont montré également une baisse du signal gluCEST dans le CC de souris CAG140 hétérozygotes âgées de 12 mois (voir chapitre VI), montrant ainsi un potentiel de cette mesure comme biomarqueur de la MH¹³⁶. Cependant, ces modalités sont rarement acquises conjointement, dans une étude longitudinale permettant le suivi temporel de plusieurs biomarqueurs. Par ailleurs, ces études ne portent pas toujours sur des modèles progressifs comme le modèle CAG140 reprenant les caractéristiques de la phase présymptomatique de la maladie.

Dans l'objectif d'élucider les mécanismes de pathogénèse, ce chapitre présente une étude multiparamétrique et longitudinale réalisée sur une cohorte de souris CAG140 hétérozygotes et leurs témoins issus des mêmes portées. Suite aux précédents résultats et à la littérature, l'accent a été mis sur l'imagerie de l'intégrité de la matière blanche, à travers des acquisitions anatomiques, du tenseur de diffusion, gluCEST, MT et fonctionnelles.

VIII.2. Matériels et Méthodes

VIII.2.a Souris CAG140 et témoins

Les souris CAG140 (voir chapitre IV) utilisées sont issues de la reproduction de souris CAG140 hétérozygotes avec des souris sauvages. Au total, 11 souris mâles CAG140 hétérozygotes ont été comparées à 11 souris mâles sauvages issues des mêmes portées.

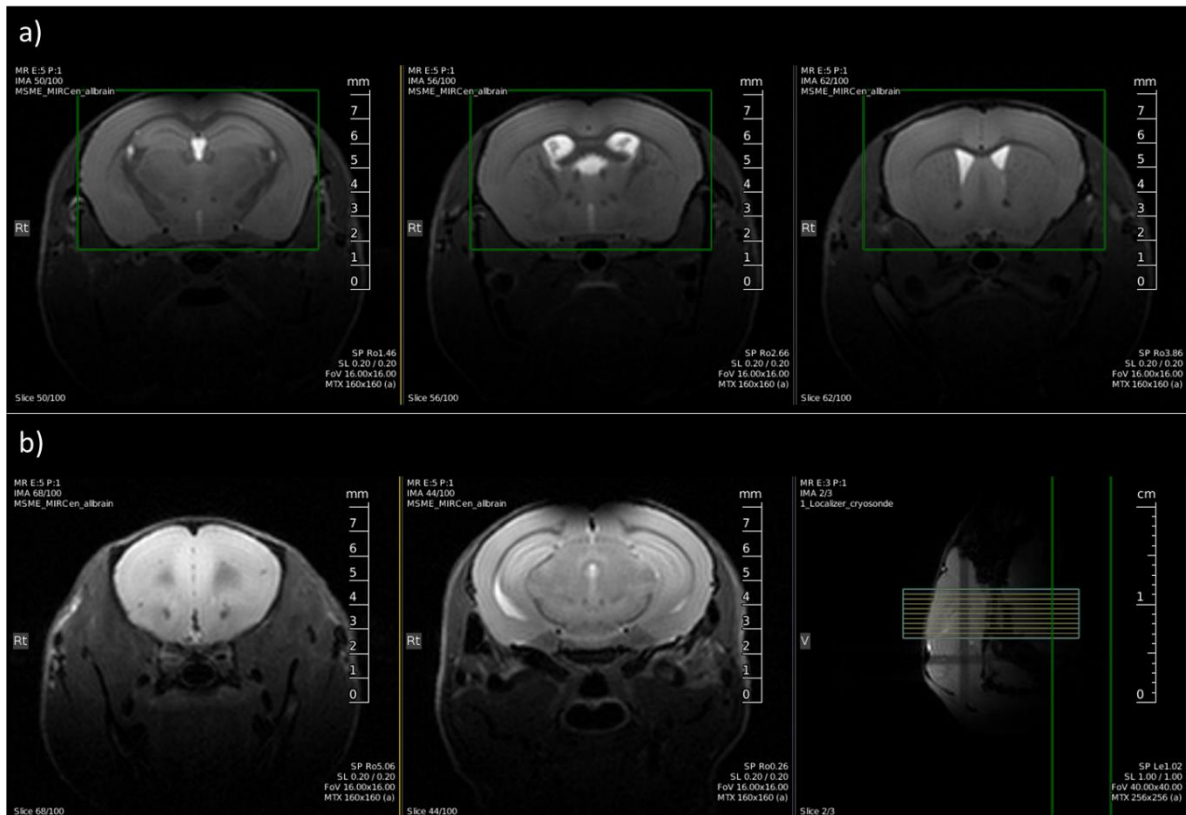
VIII.2.b Anesthésie

Le protocole d'anesthésie utilisé comprend une première induction à 3% d'isoflurane, suivie d'un flux continu par masque d'environ 1,5% d'isoflurane dans un mix 1 : 1 d'air : O₂, ajusté en permanence pour garder le rythme respiratoire de la souris entre 60 et 80 respirations par minute.

VIII.2.c Protocole d'IRM

Les animaux ont subi 5 passages à l'IRM, à l'âge de 2,5, 5, 8, 12 et 18 mois, pour étudier longitudinalement la progression des différents paramètres d'imagerie mesurés. L'appareil utilisé est un aimant 11,7T Bruker (Bruker, Ettlingen, Allemagne) horizontal dédié au petit animal. Les images ont été acquises à l'aide d'une cryosonde émission/réception Bruker (voir chapitre VII). Après installation de l'animal dans un cadre stéréotaxique équipé de barres d'oreille et d'un mord pour limiter au maximum les mouvements durant l'acquisition, l'animal est placé de telle façon que son cerveau soit au centre de l'aimant, au contact de la cryosonde. Après vérification du bon positionnement du cerveau, l'image anatomique du cerveau entier est acquise (Séquence Turbo Spin Echo, TE/TR = 5/10 000 ms, Facteur Turbo = 10, TE effectif = 45 ms, résolution dans le plan = 100 x 100 μm^2 , 200 μm d'épaisseur de coupe, 100 coupes, 20 min). Cette séquence est suivie de l'acquisition des images DTI (séquence EPI, 8 segments, TE/TR = 30/3 200 ms, résolution dans le plan = 112 x 112 μm^2 , 500 μm d'épaisseur de coupe, 10 coupes, b-value = 1000 s/mm², 30 directions, 12 min) dans une sélection de coupes commençant à l'extrémité antérieure du corps calleux et terminant dans l'hippocampe (voir figure 47 b). Après optimisation du shim dans un voxel englobant les régions d'intérêt, les images gluCEST (séquence spin-écho, TE/TR = 6/5 000 ms, 10 échos, TE effectif = 30 ms, résolution dans le plan = 150 x 150 μm^2 , 600 μm d'épaisseur de coupe, 3 coupes non continues, 23 min), comprenant un module de saturation ($T_{\text{sat}} = 10 \times 100$ ms, $B_1 = 5 \mu\text{T}$, $\delta = [-20 ; -5; 0,5; 5 ; 20]$ ppm) sont acquises. Un Z-spectrum supplémentaire est également acquis pour correction des inhomogénéités de B_0 par la méthode WASSR ($B_1 = 0,2 \mu\text{T}$, $\delta = [-1; 0,1; 1]$ ppm, 11 min). Les coupes sont placées avec un écart de 600 μm , de sorte que la coupe centrale soit placée à l'extrémité antérieure de l'hippocampe (voir figure 47 a). La même séquence est utilisée pour l'imagerie MT, avec une impulsion de saturation modifiée pour saturer sélectivement les macromolécules ($T_{\text{sat}} = 800$ ms, $B_1 = 10 \mu\text{T}$, $\delta = [-16 ; 16]$ ppm, 8 min). Cette séquence a été ajoutée lors du deuxième point de passage à 5 mois. Enfin, la séquence d'IRMf à l'état de repos (séquence EPI, TE/TR = 10/1 000 ms, 1 segment, résolution dans le plan = 250 x 250 μm^2 , 500 μm d'épaisseur de coupe, 12 coupes, 8 min) a été ajoutée à 18 mois, sans modification du protocole d'anesthésie.

Ce protocole IRM a permis un compromis intéressant entre couverture du cerveau, résolution, rapport signal sur bruit et durée d'acquisition afin de faire rentrer toutes les séquences souhaitées en 2h, durée limite que nous nous sommes fixée pour l'anesthésie des animaux et l'utilisation de l'appareil.



VIII.2.d Traitement d'images

Toutes les images ont été recalées avec la librairie Python Samba-MRI tel que décrit dans le chapitre VII. Les images CEST ont été corrigées avec la méthode WASSR et calculées à partir de programmes MATLAB internes au laboratoire. Les images FA, AD et RD ont été calculées à partir de l'imagerie pondérée en diffusion et le procédé TBSS a été appliqué.

VIII.2.e Théorie des graphes

Les données de projections axonales normalisées issues de l'Atlas de Connectivité d'Allen¹⁹⁹ ont été traitées à l'aide de la théorie des graphes (Voir chapitre VI). Un seuil arbitraire a été appliqué pour ne garder que les projections avec une force supérieure à 1, dans le but de retirer les connexions de faible intensité, considérées superflues. La recherche de clusters à partir des données de connectivité entre les régions a ensuite été réalisée à l'aide du logiciel Gephi (v 0.9.2) et de l'algorithme de spatialisation

Force Atlas. L'association entre les régions de l'atlas d'Allen et celles, plus larges, utilisées pour la segmentation IRM a été faite manuellement à partir de l'atlas du cerveau de la souris d'Allen ²⁰⁰

VIII.2.f Tractographie

Les images pondérées en diffusion ont été reconstruites par la méthode GQI²⁰¹ (*generalized q-sampling imaging*) par Marco Palombo, collaborateur du projet, pour la tractographie. Cette méthode permet de modéliser la diffusion dans plusieurs directions à l'intérieur de chaque voxel grâce à une fonction de distribution de l'orientation. La tractographie a alors été réalisée à l'aide d'un algorithme de suivi déterministe de DSI Studio²⁰². Après vérification de la qualité de l'analyse par tractographie du cerveau entier avec 100 000 tracts, des contraintes locales ont été appliquées dans la région d'intérêt, située dans le corps calleux antérieur. Les tracts isolés sont le tract cortico-striatal, défini par une ROI de départ dans le cortex moteur et une ROI d'arrivée dans le striatum dorsal, et le tract interhémisphérique, défini par les extrémités latérales du corps calleux. Les paramètres utilisés incluent un seuil de FA de 0,15, une longueur maximale de 20 mm, un angle maximum aléatoire et une interpolation trilineaire.

VIII.3. L'imagerie anatomique montre que le modèle CAG 140 est un modèle progressif

La mesure des volumes striataux et corticaux sont les marqueurs les plus utilisés de la progression de la MH. A ces deux structures s'ajoute le volume du corps calleux, qui a été montré atrophié dès la phase présymptomatique de la maladie chez l'homme, et rapidement dans certains modèles animaux. Afin de caractériser le modèle CAG140 et de pouvoir situer sa sévérité comparativement à d'autres modèles, les images anatomiques haute résolution du cerveau entier ont été acquises.

VIII.3.a Résultats

Le volume de chaque région cérébrale a été extrait à partir des images anatomiques segmentées. La figure 48 présente les variations de volume moyens entre souris CAG140 et témoins (voir chapitre VII). Les régions en rose sont hypertrophiées chez les souris CAG140 tandis que les régions en vert sont atrophiées. On observe une atrophie progressive globale du cerveau chez les souris CAG140. A 18 mois, cette atrophie est significative pour le striatum (-4,3%, $p < 0,05$), le cortex frontal (-5,3%, $p < 0,05$) et le cortex moteur (-3,3%, $p < 0,05$).

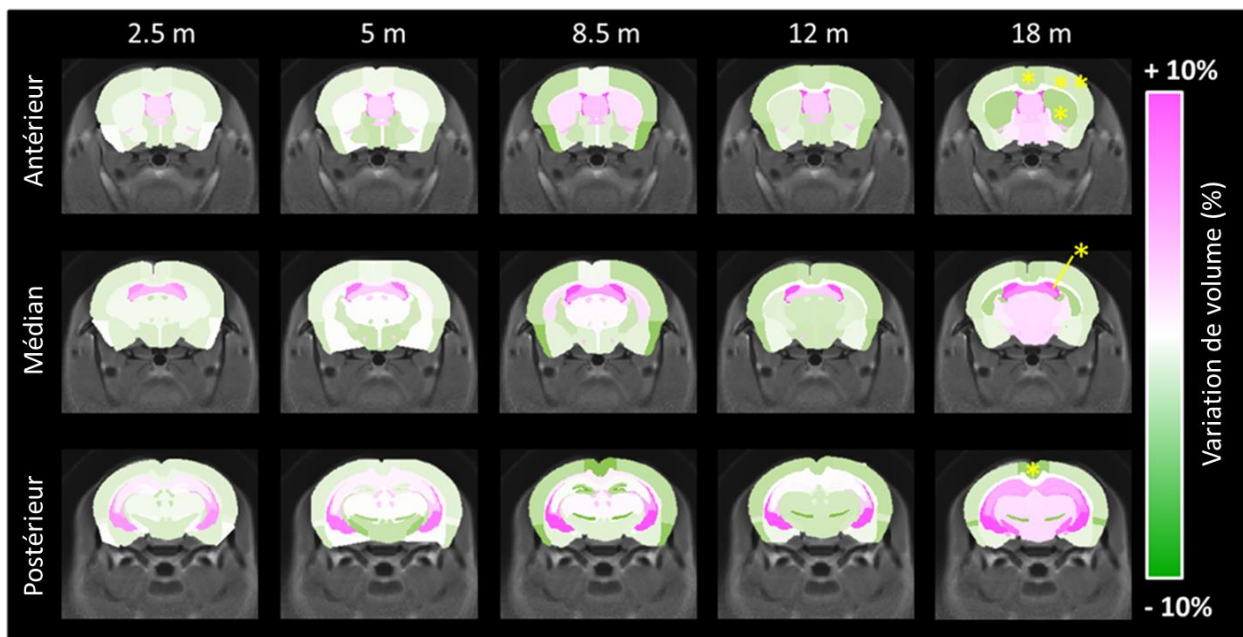


Figure 48 : Cartes de variation de volume entre souris CAG140 et témoins, à chaque point de passage, sur trois différentes coupes du cerveau de la souris. Les régions en vert et en rose représentent respectivement une diminution et une augmentation du volume chez les souris CAG140 comparées aux souris sauvages. Les étoiles jaunes représentent une différence significative de volume (ANOVA à mesures répétées + test post-hoc de Bonferroni, $p < 0,05$)

VIII.3.b Discussion

Comme expliqué dans le chapitre IV, les modèles knock-in de la MH sont des modèles exprimant la Huntingtine endogène avec l'expansion CAG insérée. Ces modèles sont donc idéaux pour reproduire la pathogénèse de la maladie selon les mêmes mécanismes que chez l'homme. Ils sont caractérisés par une progression lente et légère des symptômes moteurs et cognitifs et une espérance de vie normale.

Le biomarqueur le plus utilisé pour le suivi de la progression de la MH, et la première mesure à laquelle nous nous sommes intéressés est l'atrophie du striatum. Celle-ci est seulement significative à l'âge de 18 mois, bien qu'une tendance soit visible à 12 mois. Un calcul de puissance statistique basé sur nos résultats montre qu'avec un seuil de significativité fixé à 5% et une puissance statistique de 80%, 120 animaux par groupe seraient nécessaires pour obtenir une différence significative à 12 mois. De même, chez l'homme, il est nécessaire d'inclure de nombreux sujets pour observer une atrophie du striatum chez des porteurs du gène présymptomatiques.

L'atrophie du corps calleux, pourtant rapportée dans plusieurs modèles et chez l'homme comme survenant rapidement dans la progression de la MH, n'est pas significative dans cette étude. Cela peut s'expliquer par une perte de volume plus tardive mais également par une sensibilité plus faible pour cette structure très fine, pour laquelle les erreurs de segmentation sont plus impactantes.

L'apparition tardive des atrophies striatales et corticales ainsi que l'absence d'atrophie de la matière blanche montre le côté très progressif du modèle CAG140. La mort neuronale ne semble survenir que tardivement dans la vie de ces souris, ce qui pourrait expliquer l'apparition tardive des symptômes cliniques et moteurs.

VIII.4. Des altérations métaboliques précoces dans la matière blanche sont détectées par imagerie CEST

Bien que la mort neuronale semble survenir tardivement dans la vie des souris CAG140, il n'est pas exclu qu'au niveau cellulaire des défauts apparaissent plus tôt, notamment dans le métabolisme cellulaire. Ces atteintes peuvent nous éclairer sur les mécanismes de pathogénèse de la MH. Dans une étude précédente du laboratoire, Jérémy Pépin a montré que les souris CAG140 hétérozygotes et homozygotes âgées de 12 mois montraient un spectre métabolique altéré dans le striatum. De plus, l'imagerie gluCEST a révélé une diminution généralisée du signal dans le cerveau de ces souris, avec une atteinte particulière de la matière blanche. Chez les souris hétérozygotes, le CC est ainsi la seule structure à atteindre le seuil de significativité. Cette étude s'est cependant concentrée sur les souris âgées de 12 mois, alors que nous avons vu dans le chapitre VI que les études longitudinales permettent de mieux comprendre les mécanismes de pathogénèse, les marqueurs métaboliques ne montrant pas une dynamique constante avec le vieillissement des animaux. La présente étude a donc été conçue en conséquence pour évaluer de manière longitudinale l'évolution du niveau de gluCEST dans le cerveau, en particulier dans le CC.

VIII.4.a Résultats

La figure 49 présente la variation des niveaux moyens de gluCEST entre CAG140 et témoins. Les régions en rouge présentent un signal gluCEST plus élevé chez les souris modèles de la MH, tandis que les régions en bleu présentent un signal diminué chez ces souris. Le corps calleux montre une vulnérabilité dans cette modalité avec une baisse du niveau de gluCEST significative dès 8 mois chez les CAG140 comparativement aux témoins (-10,8%, $p < 0,05$). A 12 mois, on retrouve cette baisse dans le CC (-19,0%, $p < 0,01$), mais également dans les cortex frontal (-7,3%, $p < 0,05$) et piriforme (-16,7%, $p < 0,05$), ainsi que dans le pallidum (-21,0%, $p < 0,05$).

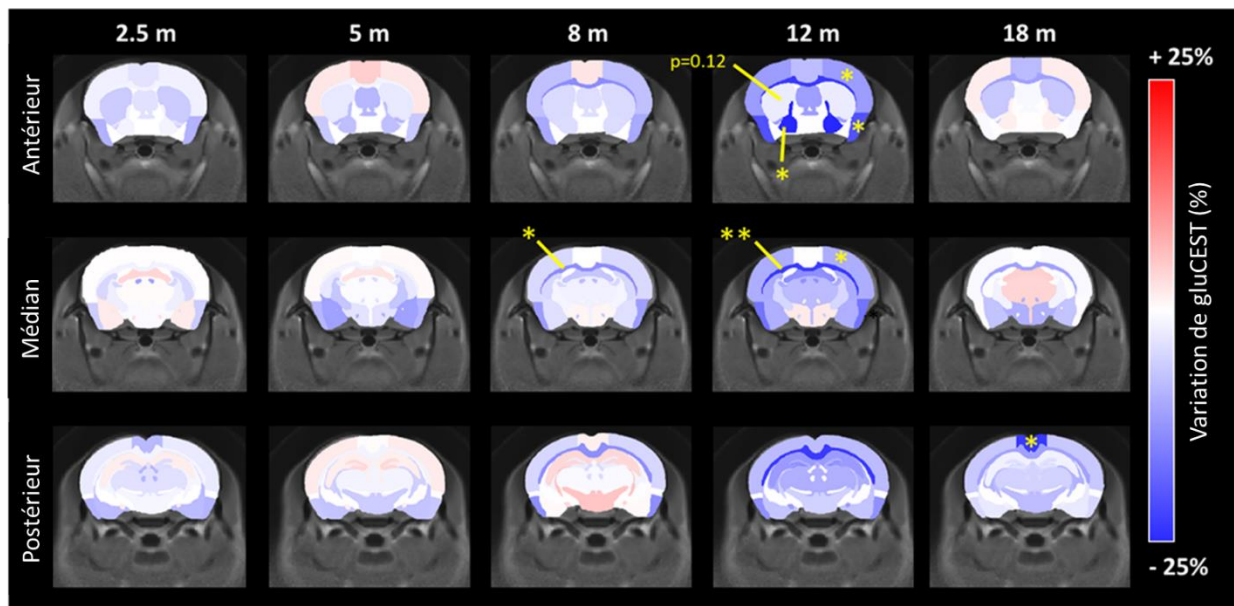


Figure 49 : Cartes de variation de gluCEST entre souris CAG140 et témoins, à chaque point de passage, sur trois différentes coupes du cerveau de la souris. Les régions en bleu et en rouge représentent respectivement une diminution et une augmentation du signal gluCEST chez les souris CAG140 comparativement aux souris sauvages. Les étoiles jaunes représentent une différence significative de gluCEST (ANOVA à mesures répétées + test post-hoc de Bonferroni, $p < 0,05$)

VIII.4.b Discussion

Comme décrit dans le chapitre V, l'imagerie gluCEST est très intéressante dans le cadre des maladies neurodégénératives puisqu'elle permet l'accès à un biomarqueur directement impliqué dans le métabolisme et la neurotransmission, la concentration en glutamate [Glu]. La [Glu] a déjà été montrée altérée dans le striatum et le cortex de patients atteints de la MH^{167,203}. Dans les modèles animaux, une baisse de [Glu] a été observée dans le striatum des souris zQ175 et R6/2^{139,204}. De même, le modèle CAG140 montre une concentration réduite dans le striatum¹³⁶. Dans la même étude, une diminution de 21,8% du signal gluCEST a été montrée dans le CC des souris CAG140 hétérozygotes âgées de 12 mois. Cette technique est en effet bien plus sensible que la spectroscopie RMN et permet l'imagerie pondérée en [Glu] dans toutes les structures du cerveau, avec une spécificité d'environ 70%¹⁵⁷. La présente étude confirme ce résultat, avec une réduction du signal gluCEST de 18,8% dans le CC des souris CAG140 à 12 mois. Ce chiffre, proche de celui obtenu lors de la précédente étude, démontre la robustesse de la mesure gluCEST ainsi que la stabilité du modèle CAG140. Par ailleurs, la présente étude révèle que cette réduction est déjà présente à 8 mois, avec une baisse de 10,8% mesurée dans le corps calleux antérieur. A cet âge, aucune atrophie significative chez les souris CAG140 n'est présente pour expliquer cette diminution du signal gluCEST par effet de volume partiel. A 12 mois, le signal gluCEST est réduit dans plusieurs autres régions cérébrales aux alentours du corps calleux, à savoir les cortex frontal et moteur, le pallidum et le striatum.

A partir de ces résultats, nous soulevons l'hypothèse que le niveau de gluCEST réduit dans le CC antérieur est symptomatique d'une défaillance des projections axonales des NCPs du cortex moteur vers les NEMs striataux. Afin de tester cette hypothèse, nous avons voulu mesurer la proportion de fibres cortico-striatales dans cette région du corps calleux. Pour ce faire, nous avons pu tirer profit des acquisitions de diffusion pour réaliser une analyse de tractographie avec l'aide de Marco Palombo. La figure 50 a) montre les tracts cortico-striatal et inter-hémisphérique isolés par tractographie sur des données issues de cette étude. Parmi les 100 000 tracts définis dans la tractographie, 8 575 constituent le CC antérieur, tandis que parmi ces dernières, 5320 sont également constitutives du tract cortico-striatal. Au total, on estime donc à 62% le nombre de tracts du CC qui passent par le tract cortico-striatal. Ce pourcentage non-négligeable montre qu'une altération de ce tract peut donner lieu à une baisse de gluCEST mesurable dans le CC. La figure 50 b) illustre également ce tract tiré cette fois de l'Atlas de Connectivité d'Allen. On remarque une bonne corrélation avec les tracts montrés dans la figure 50 a).

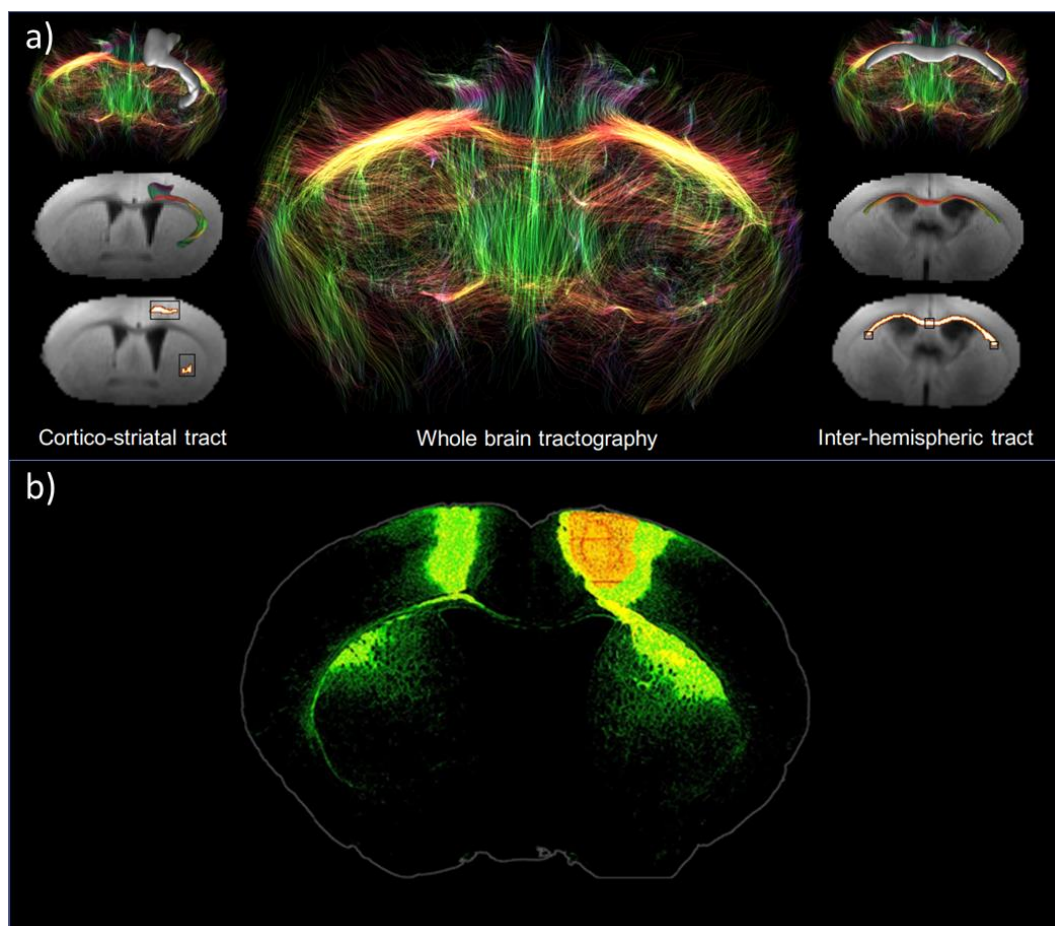


Figure 50 : a) Tracts de matière blanche isolés à partir de la tractographie du cerveau entier, issue de données de cette étude. Les carrés noirs représentent les zones de départ et d'arrivée données comme contrainte pour la définition des tracts. Les voxels blancs montrent les fibres satisfaisant ces conditions. b) Projections axonales

en provenance du cortex moteur primaire. Données extraites de l'Atlas de Connectivité d'Allen (<https://connectivity.brain-map.org/projection>)

VIII.5. Atteintes microstructurales dans le corps calleux des souris CAG140

Au vu de l'importance manifeste du CC, et de l'intérêt des imageries de diffusion et MT pour évaluer l'intégrité de la matière blanche, ces modalités ont été intégrées dans le protocole.

VIII.5.a Résultats

VIII.5.a.i. Imagerie MT

L'analyse par cartes de variations appliquée aux images MT (figure 51) montre une baisse significative du signal MT dans le septum (-21,7%, $p < 0,05$) à 12 mois, ainsi qu'une tendance dans le striatum (-12,5%, $p = 0,12$). Contre nos attentes, à 18 mois aucune des deux modalités gluCEST et MT ne montrent de différence significative entre les deux groupes. Cela pourrait être dû au vieillissement des animaux témoins dont les niveaux de gluCEST et MT chuteraient pour se rapprocher de ceux des souris pathologiques.

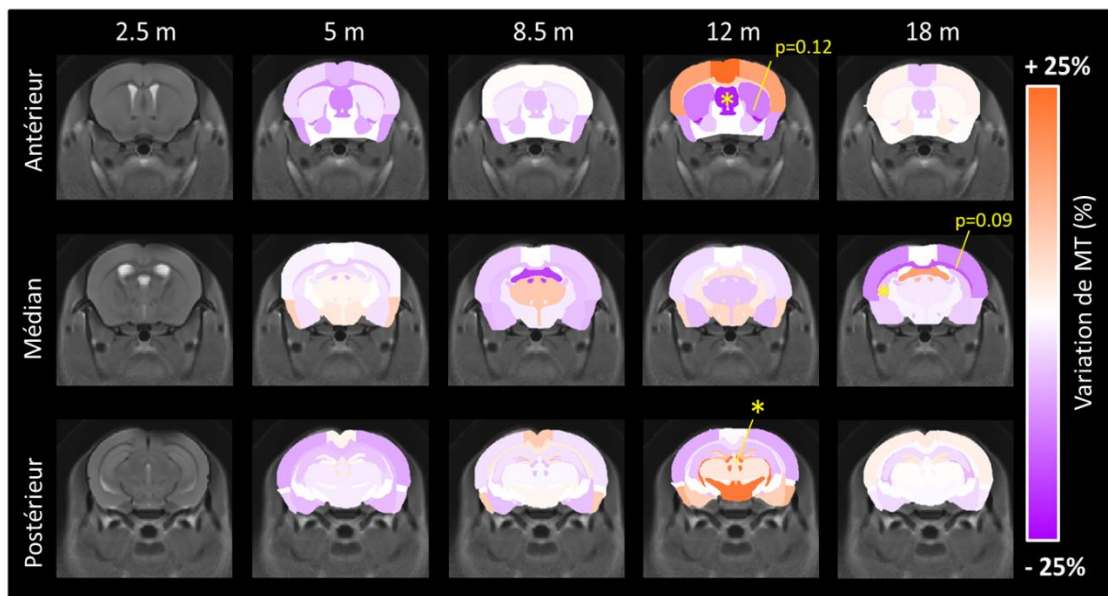


Figure 51 : Cartes de variation de MT entre souris CAG140 et témoins, à chaque point de passage, sur trois différentes coupes du cerveau de la souris. Les régions en violet et en orange représentent respectivement une diminution et une augmentation du signal MT chez les souris CAG140 comparativement aux souris sauvages. Les étoiles jaunes représentent une différence significative de MT (ANOVA à mesures répétées + test post-hoc de Bonferroni, $p < 0,05$)

VIII.5.a.ii. Imagerie du tenseur de diffusion

La figure 52 montre les cartes de variation de FA, AD et RD entre souris CAG140 et témoins, sur une coupe antérieure du cerveau. Les régions colorées en cyan représentent une diminution des paramètres de diffusion, tandis que les régions en bordeaux représentent une augmentation. Malgré

une tendance nette à la baisse de la FA et de l'AD avec le vieillissement chez les souris CAG140 comparativement aux souris sauvages, aucune différence n'atteint le seuil de significativité.

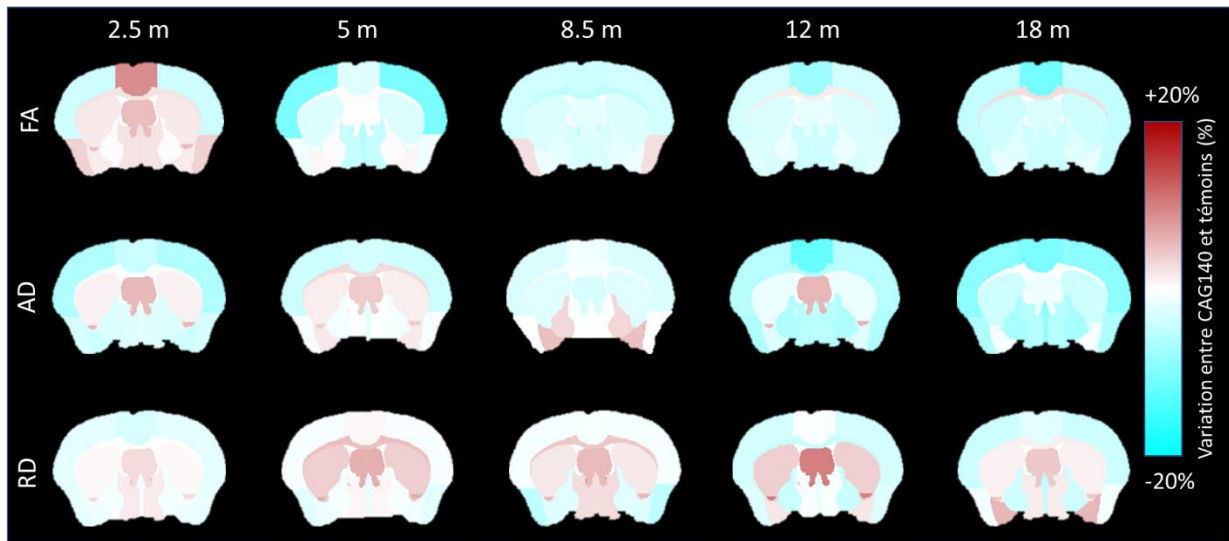


Figure 52 : Cartes de variation de FA, AD et RD entre souris CAG140 et témoins, à chaque point de passage, sur une coupe antérieure du cerveau de la souris. Les régions en cyan et en bordeaux représentent respectivement une diminution et une augmentation des paramètres de diffusion chez les souris CAG140 comparativement aux souris sauvages.

La figure 53 a) montre l'évolution temporelle de la FA dans le corps calleux des souris CAG140 et sauvages. Étonnamment, une augmentation de la FA avec le temps est observée dans les deux groupes, cependant un retard semble être visible chez les souris CAG140. Afin de s'affranchir des erreurs de segmentation du CC inhérentes à l'approche par atlas, une analyse TBSS a été réalisée afin de mieux comprendre les altérations de diffusion dans la matière blanche. Cette approche voxel-à-voxel (figure 53 b) a montré des clusters de voxels avec une FA significativement diminuée dans le CC antérieur dès l'âge de 5 mois. Des clusters similaires sont également retrouvés à 8 et 12 mois bien que moins répandus. La localisation précise des clusters montre que l'approche par atlas n'était pas adaptée à l'analyse des paramètres de diffusion. En revanche, l'analyse TBSS appliquée à l'AD et la RD n'a montré aucune différence significative entre les deux groupes.

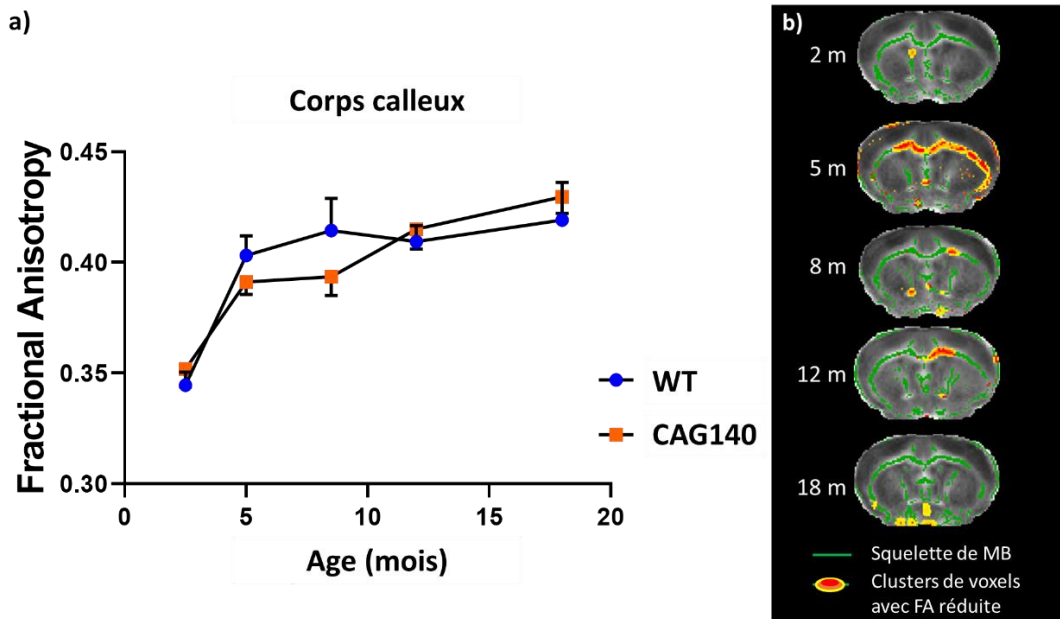


Figure 53 : a) FA moyenne (\pm erreur standard) en fonction du temps dans le corps calleux des souris CAG140 (en orange) et sauvages (en bleu). b) Résultats de l'analyse TBSS sur les cartes de FA. Les régions en vert montrent le squelette de matière blanche utilisé lors de l'analyse TBSS. Les régions rouges et jaunes montrent les clusters de voxels avec réduction significative de FA chez les souris CAG140 (Threshold-free cluster enhancement, $p < 0.05$).

VIII.5.b Discussion

Le contraste MT, basé sur le même principe que l'imagerie CEST, reflète la concentration en macromolécules, comme des protéines de grande taille. En particulier, une baisse de MT a été montrée comme signe d'une altération des feuillettes de myéline. Une telle baisse a été observée dans la matière blanche et la matière grise de patients atteints de la MH ainsi que chez des porteurs présymptomatiques^{54,169}. Chez les souris CAG140, nous montrons une diminution du contraste MT dans le septum, ainsi qu'une tendance dans le striatum des souris âgées de 12 mois. Cette baisse pourrait ainsi être interprétée comme une perte de myélinisation de ces structures. Si l'absence de cette baisse dans le CC ne semble pas cohérente avec l'altération précoce de la matière blanche observée dans les autres modalités, il est possible qu'une perte de myéline ne soit présente que dans les NEMs du striatum. Nous ne pouvons pas non plus négliger la piste d'un effet non spécifique de la myéline, qui montrerait alors peut-être une perte de protéines totales liée à la mort neuronale dans les ganglions de la base.

L'hypothèse d'une vulnérabilité de la matière blanche dans le modèle CAG140 est également supportée par les résultats de l'imagerie de diffusion. La FA est le paramètre de diffusion le plus utilisé pour évaluer l'intégrité de la microstructure cérébrale. On observe une réduction de ce marqueur dans le CC antérieur des souris CAG140 dès l'âge de 5 mois. L'interprétation de cette baisse n'est pas triviale, cependant une baisse de FA a déjà été montrée dans le corps calleux des patients atteints de la MH et

porteurs présymptomatiques, en corrélation avec une atrophie de cette structure²⁰⁵. Une telle baisse a également été rapportée dans le modèle souris YAC128 de la MH¹⁸⁹.

Dans la présente étude, la perte de FA semble cependant très localisée et se réduit au cours du temps. De plus, aucun autre paramètre de diffusion n'a montré de différence significative, que ce soit avec l'approche par atlas ou voxel-à-voxel. Ces résultats semblent en désaccord avec la littérature. Cela est possiblement dû à la qualité des données de diffusion qui pourrait être améliorée. En effet on observe une dispersion importante des valeurs, probablement à cause des artefacts de mouvement, malgré le seuil de CNR appliqué (voir chapitre VII). Par ailleurs, l'application de ce seuil diminue le nombre d'animaux pris en compte, réduisant la puissance statistique de l'étude.

La réduction de la différence de FA au cours du temps fait cependant écho à l'hypothèse développementale de la MH. En effet, dans le chapitre III, nous avons vu que la myélinisation était impactée de façon précoce dans la MH. En particulier, le développement du tract cortico-striatal est affecté dans le modèle souris CAG111, proche du modèle utilisé dans cette étude^{122,206}. La division cellulaire est défaillante dans les progéniteurs des neurones corticaux issus de ce même modèle mais également du nouveau-né^{122,207}. Bien que ces phénomènes aient été observés bien plus tôt dans le développement du cerveau, il est possible que les conséquences de ces défauts entraînent une vulnérabilité de ce tract et expliquent les atteintes microstructurales et métaboliques observées à 5 et 8 mois.

VIII.6. Identification d'un réseau vulnérable dans le modèle CAG140

Dans le but d'explorer davantage le rôle des connexions cérébrales, conduites par la matière blanche, nous avons souhaité représenter nos résultats dans le réseau des connexions neuronales tel que décrit par l'Atlas de Connectivité d'Allen. Pour cela, la matrice de force de projections axonales normalisées, comprenant l'ensemble des régions du cerveau selon la segmentation d'Allen, a été extraite d'Oh et al.¹⁹⁹ (2014) et représentée par la théorie des graphes (figure 54). Après identification des structures correspondantes à la segmentation utilisée pour le traitement des images IRM (figure 54, régions encadrées), il apparaît que le striatum est central dans le graphe et fortement connecté aux cortex moteur et frontal et au pallidum. Or, ces régions sont justement affectées dans ce modèle selon notre étude (figure 54, points verts pour les régions atrophiées, bleus pour celles affectées en gluCEST, violet pour MT). Les flèches colorées représentent des projections axonales partant de régions affectées dans une modalité. Ces dernières semblent relier les régions corticales, notamment des cortex frontal et moteur, au striatum. Cette représentation peut aider à révéler un réseau anatomique vulnérable dans ce modèle de la MH.

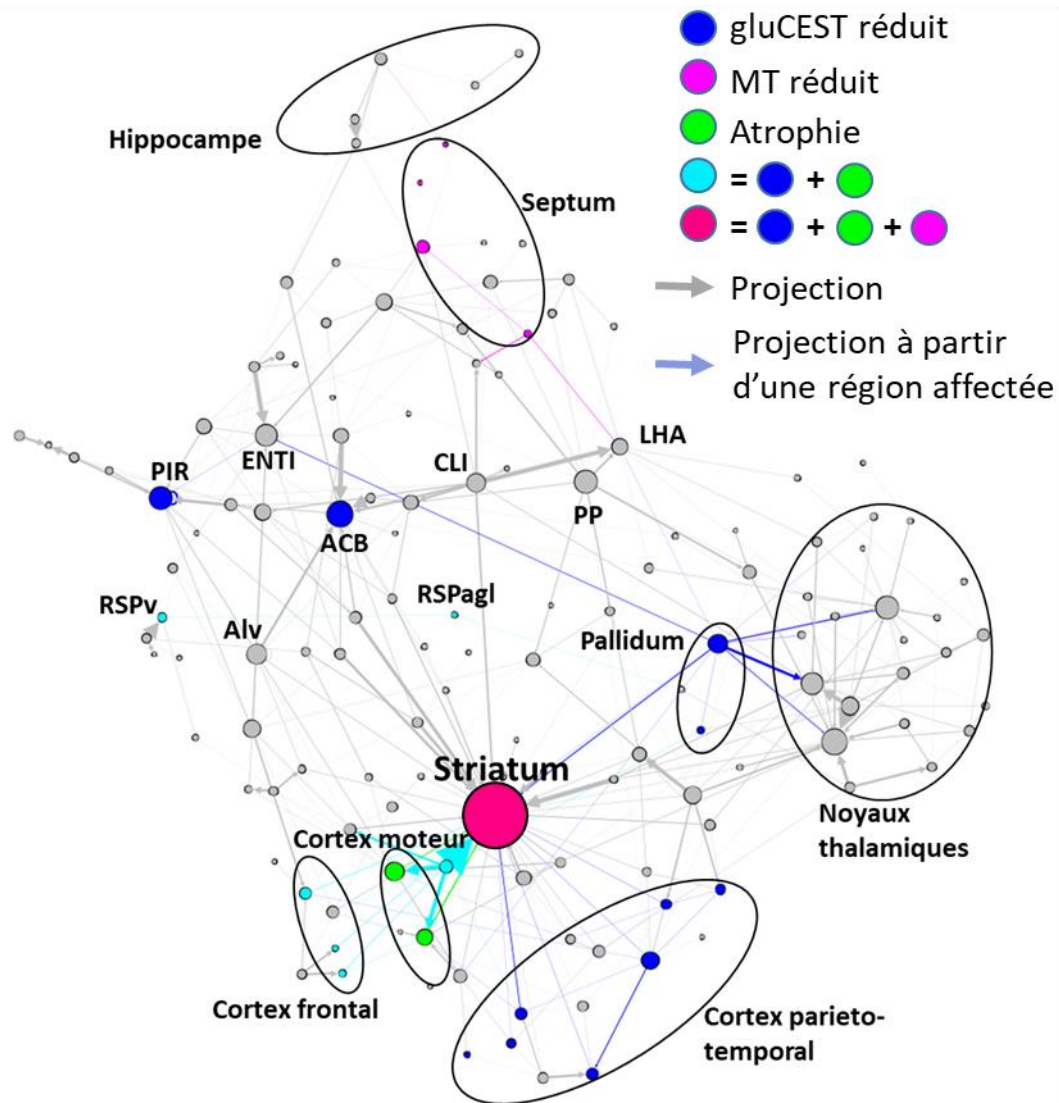


Figure 54 : Résumé des résultats de l'étude. Le graphe représente le réseau des projections axonales normalisées du cerveau de la souris, après spatialisation par algorithme de Force Atlas. La taille des nœuds représente la centralité de la région correspondante dans le réseau. Les cercles noirs entourent les régions constituant les structures définies dans l'atlas utilisé pour la segmentation des images IRM. Les nœuds colorés mettent en surbrillance les régions affectées dans notre étude. ENT1 : Cortex entorhinal latéral, PIR : Cortex piriforme, ACB : Noyaux accumbens, CLI : Noyau central linéaire, LHA : Aire hypothalamique latérale, Alv : Alveus, PP : noyau péripédonculaire, RSPv : Aire rétrospénielle ventrale, RSPagl : Aire rétrospénielle latérale agranulaire.

VIII.6.a Lien avec la connectivité fonctionnelle du cerveau de la souris

Lors du dernier point de passage à 18 mois, il a été décidé d'ajouter une séquence d'IRMf pour imager la connectivité fonctionnelle des structures cérébrales et éventuellement lier des défauts de connectivité fonctionnelle aux structures vulnérables dans les autres modalités. L'analyse DL à 20 composantes appliquée aux deux groupes séparément a fait ressortir les mêmes structures fonctionnelles. L'analyse a donc été relancée en prenant en compte tous les animaux. La connectivité fonctionnelle entre les régions ainsi identifiées a été comparée entre les souris CAG140 et témoins. La

connectivité du striatum avec les autres régions d'intérêt identifiées montre une tendance à la baisse chez les souris CAG140 (figure 55), cependant aucune différence significative n'est observée. Cela est en grande partie explicable par le protocole d'anesthésie utilisé. En effet, afin de conserver un protocole homogène sur tous les points de passage, l'anesthésique utilisé est l'isoflurane. Or, cet anesthésique n'est pas adapté à l'imagerie BOLD car c'est un vasodilatateur. Il augmente la circulation sanguine basale et diminue ainsi la dynamique de contraste BOLD.

En dépit des limites du protocole d'acquisition, la tendance à la baisse de la connectivité du striatum avec les autres structures semble justifier du rôle central de cette structure dans la pathologie et appuyer l'hypothèse d'une vulnérabilité des connexions axonales la reliant aux circuits neuronaux cérébraux. Il serait intéressant dans une future étude d'approfondir cet aspect fonctionnel en incluant une séquence d'IRMf plus tôt avec un protocole d'anesthésie adapté.

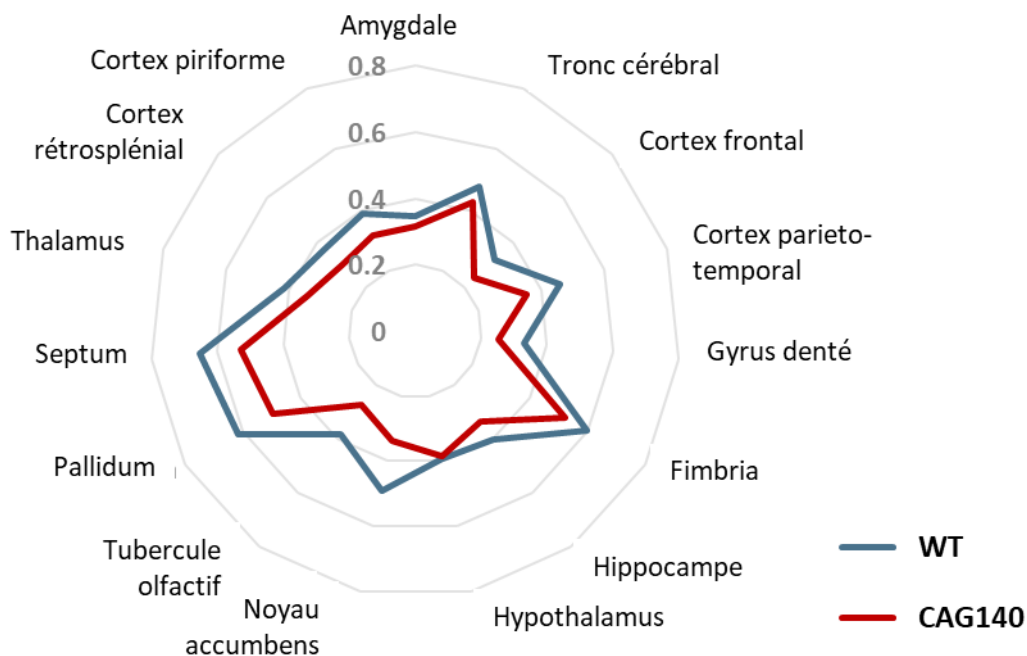


Figure 55 : Connectivité fonctionnelle du striatum avec les autres régions d'intérêt identifiées par IRMf, chez les souris CAG140 (en rouge) et témoins (en bleu).

VIII.7. Discussion

L'un des intérêts principaux de cette étude réside dans son aspect multiparamétrique et longitudinal. En effet, plutôt que de discuter les atteintes métaboliques, microstructurales et morphométriques séparément, il peut être intéressant de les regrouper pour proposer un modèle de la pathogénèse dans le modèle CAG140. En effet, de façon globale, on observe une vulnérabilité des régions corticales et striatales, que ce soit avec l'imagerie gluCEST, MT ou anatomique. On remarque également des atteintes assez précoces de la matière blanche dans le CC antérieur. Or les projections cortico-striatales

passent justement par cette région, comme montré dans la figure 50. La figure 54 permet également de visualiser cette relation grâce à la théorie des graphes. On y remarque la centralité du striatum ainsi que la forte interaction avec les régions corticales atteintes dans le modèle. À partir de ces observations, il semble que le protocole d'IRM utilisé dans cette étude a été capable d'imager la vulnérabilité connue de la voie glutamatergique cortico-striato-thalamique. Ces altérations pourraient ainsi être liées aux mécanismes de pathogénèses décrits dans le chapitre III, notamment de dysfonctionnements au niveau des synapses entre NCPs et NEMs. Ces mécanismes incluent le mauvais transport du BDNF, la dérégulation de la neurotransmission glutamatergique et des récepteurs NMDA et la perte de fonction des mitochondries qui mènent à la mort neuronale des NEMs par excitotoxicité. Cependant il serait nécessaire de valider ces hypothèses par immunohistochimie pour explorer l'intégrité de la matière blanche.

Les résultats présentés dans la présente étude ont démontré l'intérêt d'une étude longitudinale et multiparamétrique pour le suivi de biomarqueurs dans un modèle murin de la MH. L'analyse volumétrique des cerveaux des souris CAG140 hétérozygotes a confirmé l'aspect progressif de ce modèle et sa pertinence pour la modélisation de la phase présymptomatique de la maladie. L'imagerie gluCEST a permis d'exposer une défaillance des projections cortico-striatales, qui pourrait bien prendre son origine dans le développement de ces tracts. De façon générale, en regroupant les informations volumiques, métaboliques et microstructurales, notre étude semble mettre en évidence la vulnérabilité de la matière blanche et plus particulièrement de la voie glutamatergique cortico-striato-thalamique. La translation du protocole à une étude clinique pourrait permettre d'imager la défaillance de ce réseau de manière précoce et de fournir des biomarqueurs robustes durant la phase présymptomatique. Ces biomarqueurs pourraient ainsi être utilisés pour l'évaluation de thérapies géniques administrées de façon précoce. Dans le prochain chapitre, nous allons présenter les résultats d'une seconde étude sur le modèle rat BACHD de la MH, comprenant un essai thérapeutique.

Chapitre IX: Evaluation de l'efficacité d'Oligonucléotides Antisens dans un modèle rat de la MH

IX.1. Introduction

Les récents développements en thérapie génique apportent un espoir pour les patients atteints des maladies à PolyQ. En effet, en supprimant directement la cause de la maladie, à savoir l'expression de la protéine mutée, il serait possible de bloquer sa progression. Notamment, les ASO, de courtes séquences d'acides nucléiques conçues pour promouvoir la dégradation de l'ARN, montrent des résultats prometteurs (voir chapitre II). Malgré tout, le récent échec de l'étude clinique de phase III Roche/Ionis portant sur des ASO supprimant la HTT, sans spécificité allélique, démontre qu'il reste du chemin à parcourir pour proposer une thérapie efficace. La HTT sauvage est une protéine ubiquitaire nécessaire au développement du cerveau et impliquée dans de nombreux mécanismes cellulaires (voir chapitre III). La suppression de l'expression des deux allèles est donc probablement au moins en partie la cause de cet échec et le développement de thérapies géniques avec spécificité allélique devient un enjeu majeur pour le traitement des maladies à PolyQ. La fenêtre d'injection, c'est-à-dire le stade de la maladie auquel la thérapie est administrée, est également une question importante dans la conception des études cliniques. En effet, la littérature scientifique semble montrer que plus tôt est bloquée l'expression, meilleurs seront les résultats en termes de ralentissement des symptômes. Cependant, l'âge des patients recrutés est également conditionné par la possibilité de suivre la progression de la maladie et d'évaluer l'efficacité de la thérapie. La recherche de biomarqueurs non invasifs capables de décrire cette progression dans la phase présymptomatique est donc de première importance.

Dans ce chapitre, nous présentons une étude longitudinale et multiparamétrique avec un essai thérapeutique d'ASO, réalisée sur le modèle rat BACHD. Ce modèle exprimant la protéine HTT humaine mutée nous permet d'imiter la spécificité allélique à l'aide d'un ASO spécifique de la HTT humaine. De plus, de précédents résultats obtenus au laboratoire ont montré que ce modèle progressif était, au même titre que le modèle souris CAG140, un modèle adapté à l'étude de la phase présymptomatique de la MH¹⁴⁹. Au cours d'une étude longitudinale, une diminution de la concentration de lactate a en effet été observée chez les rats BACHD dans un voxel placé dans le striatum. Cette baisse est visible à la fois au cours du temps chez les rats BACHD et en comparaison avec les rats témoins. De plus, l'étude

longitudinale des niveaux de gluCEST dans les différentes régions du cerveau du rat a montré un signal significativement plus faible dans le striatum, le cortex, le CC et le septum des rats BACHD en comparaison des animaux témoins (figure 56).

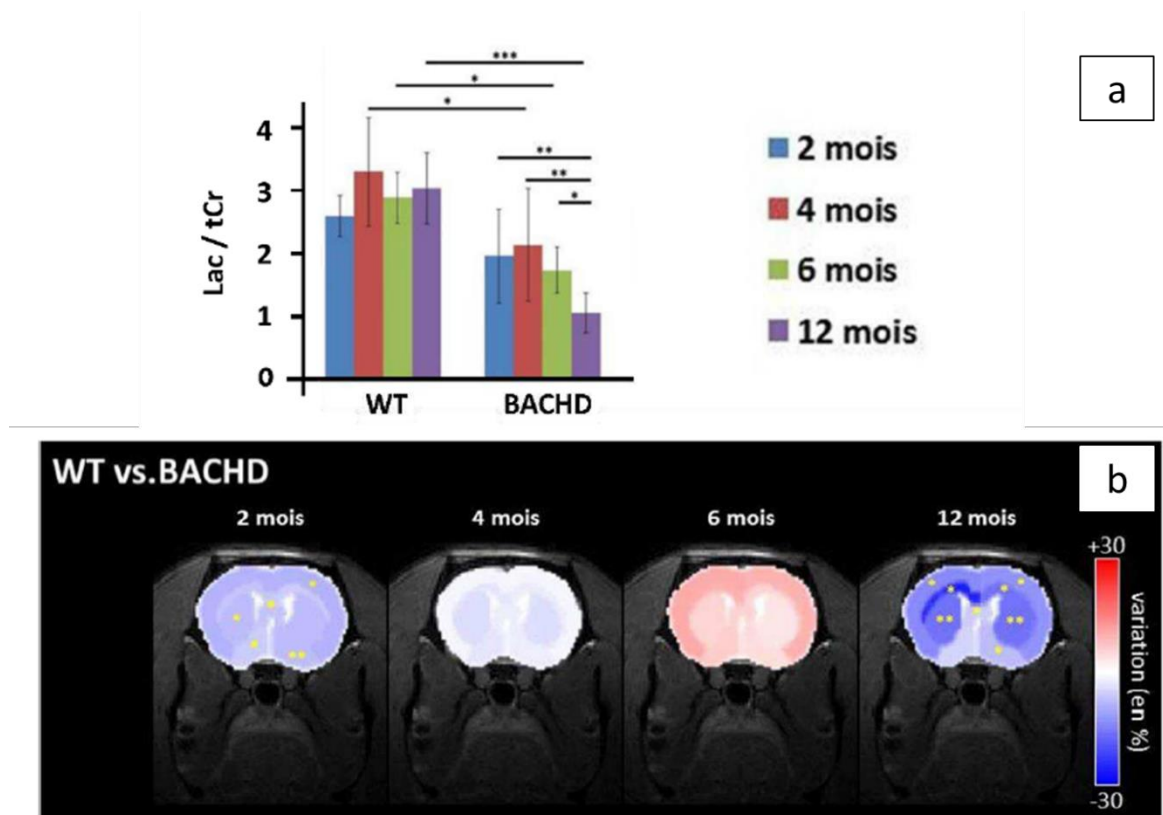


Figure 56 : a) Mesures de lactate normalisée par la créatine totale dans le striatum des rats sauvages et BACHD au cours du temps. b) Cartes de variation de gluCEST entre rats BACHD et témoins au cours du temps. Les régions en bleu montrent une baisse du signal gluCEST chez les rats BACHD. Les étoiles jaunes mettent en surbrillance les régions montrant une baisse significative (ANOVA à mesures répétées + Bonferroni). Adapté de la thèse de Jérémy Pépin ¹⁴⁹.

Les variations de glutamate pourraient montrer une atteinte du compartiment neuronal, ce métabolite étant essentiellement présent dans les neurones. Cependant, la stabilité de la mesure de NAA au cours du temps et entre les animaux malades et témoins ne va pas dans ce sens. Dans ce cas, il semble que les variations de gluCEST observées reflètent des changements métaboliques, également en cause dans la baisse de lactate mesurée dans le striatum. La thèse de Jérémy Pépin a ainsi mis en évidence des mécanismes de compensation durant lesquels la consommation du glucose serait altérée, engendrant une réorganisation du métabolisme énergétique.

Sur la base de ces résultats, l'étude présentée dans ce chapitre reprend le protocole utilisé par Jérémy Pépin pendant sa thèse pour évaluer le potentiel des biomarqueurs identifiés comme indicateurs de l'efficacité d'une thérapie génique avec spécificité allélique et pour observer si cette thérapie permet la réorganisation du métabolisme énergétique.

IX.2. Matériels et Méthodes

IX.2.a Conception de l'étude

IX.2.a.i. Thérapie

La thérapie testée est un ASO développé par l'équipe de Michael Hayden au *Centre for Molecular Medicine and Therapeutics* de l'Université de Colombie-Britannique, partenaire du projet TreatPolyQ²⁰⁸. Cet ASO a été conçu pour être spécifique de la HTT humaine. Bien qu'il ne présente pas de spécificité allélique chez l'Homme, chez le rat BACHD il imite la spécificité allélique en ne reconnaissant que la HTTm humaine exprimée à l'aide du chromosome artificiel bactérien. Il fonctionne sur le principe de promotion de la dégradation du pré-ARN messager par RNase H (voir chapitre II). L'injection de l'ASO se fait en une fois par voie intra-cérébro-ventriculaire (ICV).

IX.2.a.ii. Rats BACHD et témoins

Les rats BACHD (voir chapitre IV) utilisés lors de cette étude sont issus de la reproduction de mâles BACHD avec des femelles sauvages. Au total, 24 rats ont été utilisés pour l'étude préliminaire et 36 rats pour l'étude longitudinale. Les animaux ont initialement eu accès à la nourriture *ad libitum* puis un régime de 10 croquettes par rat et par jour a été imposé à partir de l'âge de 6 mois pour limiter la prise de poids des rats mâles, problématique pour le passage à l'IRM.

IX.2.a.iii. Étude préliminaire

Afin de déterminer la dose optimale pour l'extinction de la HTTm avant l'étude longitudinale d'imagerie, une étude préliminaire a été réalisée sur un groupe de rats BACHD. Les 24 rats BACHD mâles ont été répartis entre 4 groupes de 6, injectés avec des doses différentes d'ASO (9 µL à 1 µL/min) par voie ICV dans le ventricule gauche :

- Un groupe témoin injecté avec tampon PBS
- Un groupe injecté avec 50 µg d'ASO
- Un groupe injecté avec 250 µg d'ASO
- Un groupe injecté avec 500 µg d'ASO

Pour maintenir un volume d'injection constant entre chaque groupe, la concentration des solutions d'ASO injectées a été variée. Les tissus cérébraux ont par la suite été prélevés 3 semaines post-injection pour analyse des niveaux d'expression de la HTT par *Western Blot* et RT-qPCR (*Reverse Transcriptase quantitative Polymerase Chain Reaction*, réaction de polymérisation en chaîne quantitative à transcriptase inverse).

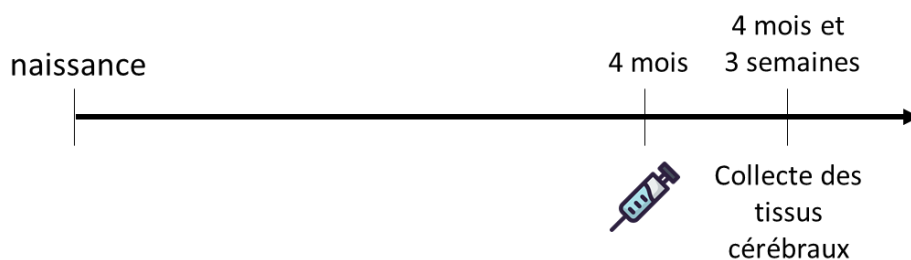


Figure 57 : Déroulé temporel de l'étude préliminaire.

IX.2.a.iv. Étude longitudinale

Pour l'étude longitudinale, les rats ont été répartis en 3 groupes de 12 rats (6 mâles et 6 femelles par groupe, également injectés par voie ICV dans le ventricule gauche ($9 \mu\text{L}$ à $1 \mu\text{L}/\text{min}$) :

- Un groupe de rats sauvages injecté avec tampon PBS
- Un groupe de rats BACHD injecté avec tampon PBS
- Un groupe de rats BACHD injecté avec $350 \mu\text{g}$ d'ASO.

Les rats ont subi deux injections au cours de leur vie à l'âge de 5 et 13 mois, avec un passage à l'IRM un mois avant et un mois après chaque injection. Le tissu cérébral a également été récupéré après le dernier passage à l'IRM pour analyse des niveaux de HTT.

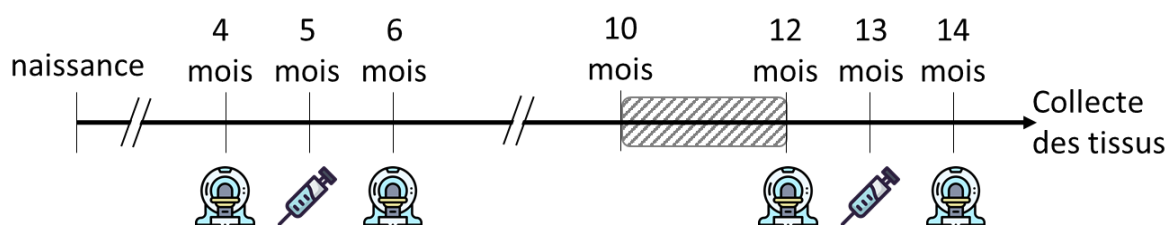


Figure 58 : Déroulé temporel de l'étude longitudinale. La zone hachurée représente la durée de fermeture du laboratoire due à la crise sanitaire du Covid-19

IX.2.a.v. Imagerie

Le protocole d'imagerie utilisé comporte une séquence d'imagerie anatomique, une séquence de spectroscopie RMN et l'acquisition d'une image gluCEST. Compte-tenu du grand nombre d'animaux inclus dans l'étude, il était nécessaire de garder le temps d'acquisition aux alentours de 1h30 par animal. Les biomarqueurs choisis sont basés sur les résultats précédents obtenus durant la thèse de Jérémy Pépin.

IX.2.b Protocole expérimental

IX.2.b.i. Anesthésie

Pour les deux premiers points de passage en imagerie, le protocole d'anesthésie utilisé comprend une induction à 3,5% d'isoflurane, suivi d'un bolus de médétomidine (0,05 mg/kg). Après stabilisation de l'anesthésie et installation sur le lit de l'IRM, les rats ont été perfusés en continu par voie sous-cutanée avec une solution de médétomidine (0,1 mg/kg/h) et maintenus en anesthésie par inhalation d'isoflurane à 0,5% dans un mélange 1 : 1 d'air : O₂.

Après analyse des résultats de ces deux premiers passages, il a été décidé que ce protocole n'était pas adapté à la mesure des biomarqueurs choisis (voir sous-partie IX.5.a). Le protocole a donc été modifié pour retirer la médétomidine. Après l'induction de l'anesthésie, celle-ci a donc été maintenue par inhalation d'isoflurane à 1,5% dans un mélange 1 : 1 d'air : O₂.

IX.2.b.ii. Protocole d'IRM

Les images ont été acquises à l'aide d'une sonde volumique et d'une sonde surfacique conçue pour le cerveau du rat, utilisée en réception. Les animaux ont été placés en stéréotaxie avec barres d'oreille et mord, dans le but de limiter les mouvements durant l'acquisition. Le lit est ensuite avancé dans l'appareil d'IRM afin que le cerveau du rat soit au centre de l'aimant. Après vérification du bon positionnement du cerveau, l'image anatomique du cerveau entier est acquise (Séquence Turbo Spin Echo, TE/TR = 5/5 000 ms, Facteur Turbo = 17, TE effectif = 45 ms, résolution dans le plan = 250 x 250 μm^2 , 500 μm d'épaisseur de coupe, 48 coupes, 8 min). Suite à cette séquence, la routine MAPSHIM est utilisée pour optimiser le shim dans le voxel d'acquisition de la séquence de spectroscopie RMN (LASER, TE/TR=20/5 000 ms, dimensions 3,5 mm isotrope). Le repère anatomique utilisé pour le positionnement antéro-postérieur du voxel est la séparation du chiasma optique. Le voxel est ensuite centré sur le striatum gauche, de façon que les ventricules se trouvent à l'extérieur du volume d'acquisition et que le voxel ne déborde pas à l'extérieur du cerveau (figure 59). Après vérification de la qualité de shim sur une acquisition sans suppression de l'eau, le spectre métabolique est moyenné sur 128 acquisitions avec suppression de l'eau par méthode VAPOR. Lors du premier passage des animaux à l'IRM, une seconde séquence de spectroscopie a été ajoutée afin d'acquérir un spectre du signal des macromolécules chez les rats, afin de permettre une meilleure modélisation des données (LASER, TE/TR=20/4 000 ms, dimensions 3,5 mm isotrope). À la suite de cette acquisition, le shim a été de nouveau optimisé sur un voxel centré sur le cerveau du rat pour l'acquisition gluCEST (séquence spin-écho, TE/TR = 6/6 700 ms, 10 échos, TE effectif = 30 ms, résolution dans le plan = 300 x 300 μm^2 , 1,5 mm d'épaisseur de coupe, 5 coupes, 23 min). Les paramètres du module de saturation pour cette séquence sont les suivants : $T_{\text{sat}} = 10 \times 100$ ms, $B_1 = 5$ μT , $\delta = [-20 ; -5:0,5:5 ; 20]$ ppm. La méthode WASSR

est également appliquée via l'acquisition d'un autre Z-spectrum ($B_1 = 0,2 \mu\text{T}$, $\delta = [-1:0,1:1]$ ppm, 11 min). La première coupe est placée au niveau de l'extrémité antérieure du CC.

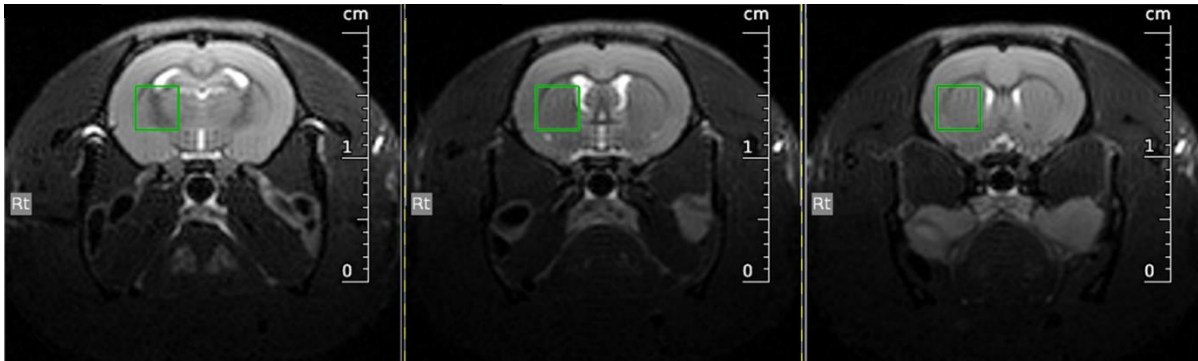


Figure 59 : Positionnement du voxel d'acquisition de spectroscopie RMN dans le striatum gauche. De gauche à droite, coupe la plus postérieure, coupe centrale, coupe la plus antérieure.

IX.2.c Traitement d'images

Toutes les images ont été recalées avec la librairie Python Samba-MRI tel que décrit dans le chapitre VII ¹⁹⁵. Une nouvelle base a été créée pour la modélisation des données de spectroscopie RMN à partir de l'acquisition du spectre des macromolécules réalisé lors du premier scan (figure 60). Les images CEST ont été corrigées avec la méthode WASSR et calculées à partir de programmes MATLAB développés dans l'équipe.

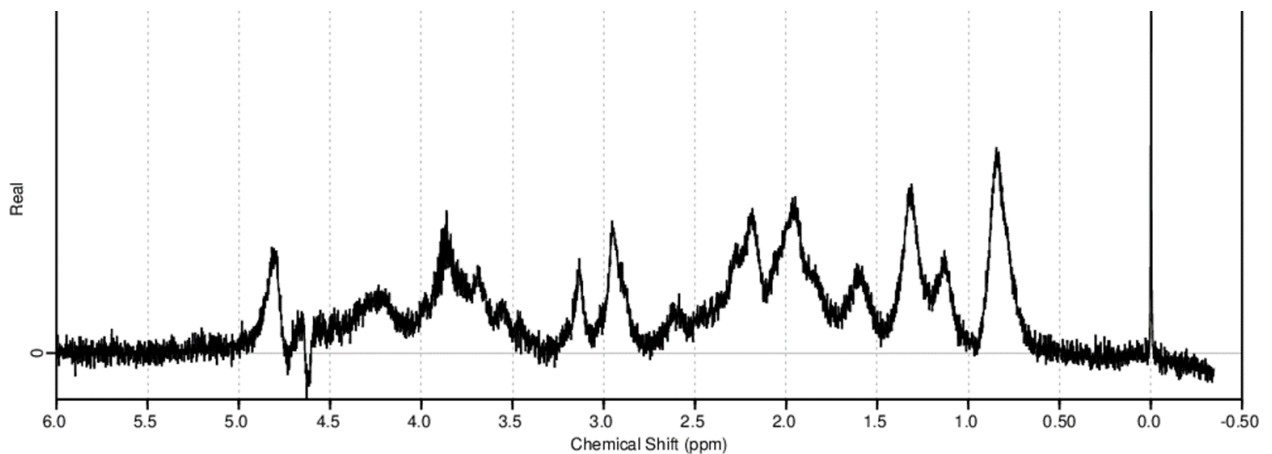


Figure 60 : Spectre des macromolécules acquis sur les rats inclus dans cette étude et ajouté dans la base LCMoDel.

IX.2.d Collecte des tissus cérébraux.

Après euthanasie des animaux par dose létale de pentobarbital, des échantillons ont immédiatement été prélevés dans le striatum, le cortex et le cervelet. Les échantillons ont ensuite été placés dans un tube de lyse (Precellys) et plongés dans l'azote liquide, avant d'être conservés à $-80 \text{ }^\circ\text{C}$.

IX.2.e Western Blot

Les échantillons ont été décongelés dans la glace. 500 μ L de tampon de lyse ont été ajoutés dans chaque tube de lyse puis la lyse a été réalisée par broyeur de tissus Precellys (5 000 rpm, 2 x 10 s). Le surnageant a été récupéré après centrifugation 10 min à 15 000 g. Le dosage des protéines dans chaque solution a ensuite été opéré par la méthode de Buriel avec kit de dosage BCA (ThermoFischer). Les échantillons ont alors été préparés pour contenir 50 μ g de protéines dans 10 μ L, auxquels ont été ajoutés 2,5 μ L de solution de dénaturation. Après dénaturation 5 min à 95°C, les échantillons ont été placés dans un gel Tris-Acetate 3-8% (Bio-Rad) avec un marqueur de poids moléculaire et mis à migrer à 200 V jusqu'à sortie de la bande correspondant à 50 kDa. Le transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose a ensuite été réalisé à l'aide de l'appareil Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad). Après vérification de la qualité de migration et de transfert par marquage réversible rouge Ponceau, le blocage des sites spécifique a été réalisé par incubation de la membrane pendant 45 min dans une solution de lait écrémé à 5% masse/volume dans tampon TBS + Tween20 0,1% (TBS-T). La membrane a par la suite été incubée une nuit avec l'anticorps primaire dilué avec un rapport 1 : 1000 dans une solution de TBS-T avec 5% de lait écrémé. Les anticorps primaires utilisés sont le 1C2, qui reconnaît la forme humaine de la HTT mutée, le HU4C8, qui reconnaît les formes mutées et sauvages chez l'homme et le rat, et un mélange d'anticorps spécifiques de la tubuline et de l'actine pour normaliser l'expression des protéines HTT à ces protéines de ménage. Après lavage au TBS-T, la membrane a été incubée avec l'anticorps secondaire pendant 45 min à température ambiante. La révélation a ensuite été réalisée à l'aide du kit de chimioluminescence Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad). La quantification a été réalisée à l'aide du logiciel ImageJ en rapportant l'intensité de la bande d'intérêt sur l'intensité de la bande de la protéine de ménage Actine.

IX.2.f RT-qPCR

De façon analogue à l'extraction des protéines, les échantillons ont été lysés à l'aide de l'appareil Precellys (5 000 rpm, 2 x 10 s) dans un tampon RLT Plus (Qiagen) contenant 1% de β -mercaptoéthanol. La purification de l'ARN a été réalisée en suivant le protocole du kit RNeasy PLUS (Qiagen) puis les échantillons d'ARN ont été dosés avec l'appareil NanoDrop (ThermoFischer). Après contrôle de la qualité de purification à l'aide de l'appareil RNA Nano 6000 (Agilent Technologies), les échantillons d'ARN ont été dilués à la concentration de 25 ng/ μ L. L'ADN génomique a alors été éliminée par enzyme gDNA Eraser du kit PrimeScript RT (Takara). La transcription inverse de l'ARN en ADN complémentaire a ensuite été réalisée avec le kit PrimeScript RT. 3 μ L de chaque échantillon ont été placés en triplicats dans une plaque 384 puits et 4 μ L de mix SYBRGreen iTaq (Bio-Rad), ainsi que 0,24 μ L d'amorces sens et antisens (300 nM finale) et 0,52 μ L d'eau ont été ajoutés à chaque puit. Un témoin sans transcription inverse et un témoin sans ARN ont été ajoutés pour chaque couple d'amorces testé. La PCR

quantitative a finalement été effectuée sur un appareil Bio-Rad CFX384. La quantification de l'expression des gènes d'intérêt a été réalisée en comparant leur cycle de sortie avec le cycle de sortie du gène de ménage PPIA.

IX.3. L'étude préliminaire démontre la réduction sélective de l'expression de la HTT mutée humaine dans le cerveau des rats BACHD

Une étude préliminaire a été réalisée afin de caractériser la relation dose-effet de l'ASO utilisé et de déterminer la dose optimale à injecter pour une extinction efficace du gène. Les rats BACHD injectés avec des doses croissantes d'ASO ont été euthanasiés 3 semaines après l'injection pour analyse des niveaux de HTT mutée et de htt sauvage endogène.

IX.3.a Résultats

La figure 61 présente les résultats de RT-qPCR réalisée sur les échantillons d'ARN extraits du striatum des animaux injectés. Le couple d'amorces utilisé est spécifique de la HTT humaine mutée. Pour chaque groupe, l'expression est calculée en normalisant par rapport au gène de référence PPIA. Les résultats sont montrés sous forme de ratio entre l'expression mesurée pour chaque animal et l'expression moyenne du groupe témoin injecté avec du tampon PBS. On observe une diminution de 60% de l'expression dans le groupe ayant reçu la dose la plus faible de 50 µg d'ASO. Cette réduction est amplifiée à plus de 80% avec l'augmentation de la dose à 250 µg. En revanche, aucune différence significative d'expression n'est visible entre les deux doses les plus élevées, bien que la dispersion des valeurs semble diminuée dans le groupe ayant reçu la dose la plus élevée de 500 µg.

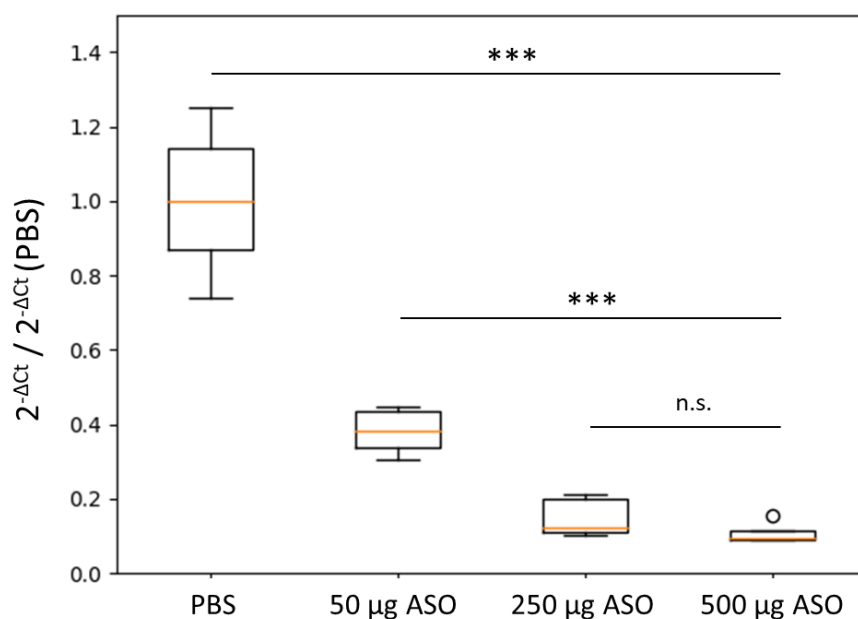


Figure 61 : Résultats de la RT-qPCR réalisée sur les rats inclus dans l'étude préliminaire avec une amorce spécifique de la HTT humaine. *** : $p < 0.001$ (ANOVA à un facteur + Bonferroni).

Afin de vérifier que cette réduction de l'expression de l'ARN codant pour la HTT mutée humaine se traduisait bien par une diminution de la protéine, une analyse Western Blot des tissus striataux a également été réalisée. La figure 62 présente les résultats de la quantification réalisée sur la bande de la htt sauvage, et de la bande de la HTT mutée, normalisées par la bande de l'actine. Les résultats sont montrés sous forme de ratio entre la quantification pour chaque animal et la quantification moyenne du groupe injecté avec du PBS. On remarque une diminution de 20% du niveau de la protéine endogène dans le groupe ayant reçu la dose la plus faible. Cette réduction passe à 40% avec la dose de 250 µg. Le groupe ayant reçu la plus haute dose, en revanche, ne présente aucune différence significative avec les trois autres groupes, bien qu'il semble qu'une tendance à la baisse de 40% apparaisse. La quantification du marquage à l'anticorps 1C2, quant à elle, montre un niveau 40% plus bas que le groupe non traité avec la dose de 50 µg, et 80% plus faible avec les deux groupes ayant reçus la plus haute dose. Comme pour l'expression de l'ARN, ces deux groupes ne présentent pas de différence significative mais on observe une diminution de la dispersion avec la dose de 500 µg.

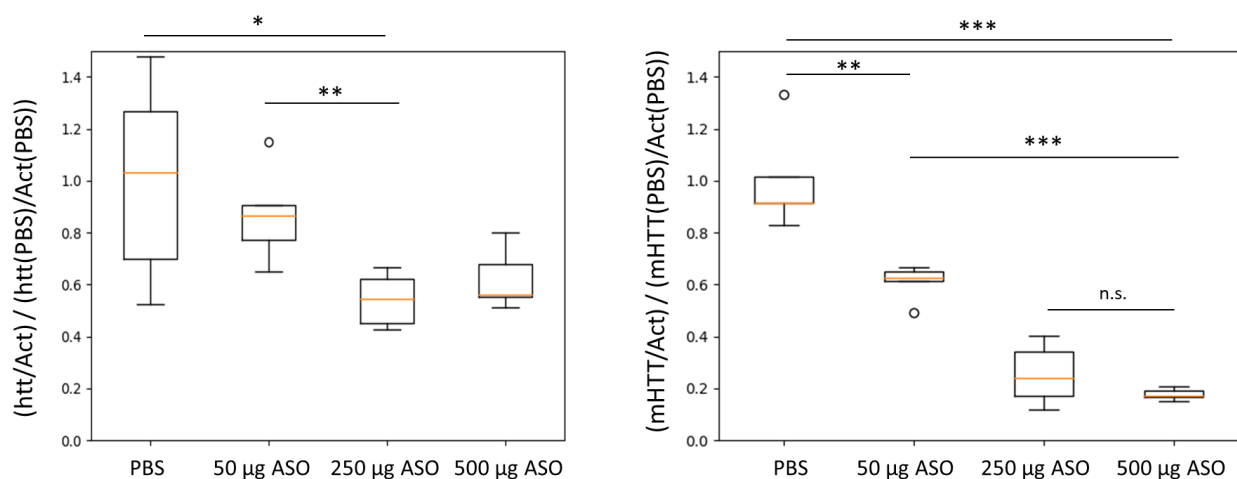


Figure 62 : Résultats de la quantification de l'analyse Western Blot avec les bandes de la htt sauvage (à gauche, anticorps 4C8) et de la HTT mutée (à droite, anticorps 1C2). * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$ (ANOVA à un facteur + Bonferroni).

IX.3.b Discussion

Les ASO sont de petites séquences d'acides nucléiques conçues pour s'accrocher spécifiquement à une séquence d'ARN et supprimer son expression par différents mécanismes détaillés dans le chapitre II. Le mécanisme d'extinction de l'ASO utilisé dans cette étude est la promotion de la dégradation de l'ARN par RNase H. Le site de reconnaissance de cet ASO est situé au niveau de l'intron 1 de l'ARN pré-messager de la HTT humaine. Ce site de reconnaissance est spécifique à la HTT humaine et les légères différences affichées par la séquence de la htt endogène sont supposées empêcher une reconnaissance non spécifique de l'ASO. Cet ASO a déjà montré une réduction de la HTT mutée

humaine chez les souris BACHD et une amélioration des symptômes cognitifs chez les souris YAC128 traitées^{208,209}.

L'étude préliminaire présentée ici a pour objectif de vérifier l'extinction spécifique de la HTT mutée et de déterminer la dose optimale pour traitement des rats inclus dans l'étude longitudinale. Les résultats de RT-qPCR et de Western Blots réalisés sur les tissus striataux 3 semaines post-injection concordent pour montrer une forte diminution de l'expression de la HTT mutée, avec un effet dépendant de la dose mais montrant un palier à 80% de réduction. Étonnamment, cette réduction est également observée pour la htt sauvage, bien que plus faible d'un facteur deux. Cette diminution est possiblement liée à une affinité faible de l'ASO, due à une haute similitude entre les séquences de la HTT humaine et endogène du rat.

Sur la base de ces résultats, il a été décidé d'administrer une dose de 350 µg aux rats inclus dans le groupe traité de l'étude longitudinale. Cette dose correspond à un effet situé au palier de 80% d'extinction de l'expression. Si ce palier est déjà atteint avec une dose de 250 µg, il a été décidé d'augmenter légèrement cette dose pour réduire la dispersion dans l'extinction. Par ailleurs, cette dose a permis d'injecter deux fois les rats. En effet, les ASO finissant par être dégradés dans les neurones, et leur population n'étant pas renouvelée, il a été montré qu'après 16 semaines, l'extinction n'est plus efficace²¹⁰. Il a donc été décidé d'injecter une seconde fois pour une extinction efficace sur la durée d'une étude longitudinale. Cependant, la fermeture du laboratoire due à la crise sanitaire du Covid-19 a obligé à repousser de deux mois cette seconde injection. C'est pourquoi nous nous sommes adaptés pour diviser cette étude en deux injections à 5 et 13 mois, avec passage à l'IRM un mois avant et un mois après chaque injection.

IX.4. L'imagerie anatomique montre une diminution de l'atrophie cérébrale avec la thérapie génique

IX.4.a Résultats

Le modèle rat BACHD est un modèle qui montre une progression lente des symptômes moteurs et cognitifs. Ces troubles du comportement ont été très bien caractérisés dans ce modèle. En revanche, cette caractérisation manque pour l'évolution temporelle de la morphométrie des structures cérébrales. Les images anatomiques acquises à chaque scan lors de la présente étude longitudinale ont été recalées et segmentées à l'aide de Samba-MRI (voir chapitre VII) pour en extraire les informations de volume des régions cérébrales. La figure 63 a) montre les résultats de cette analyse morphométrique sous forme de cartes de variation du volume au cours de temps. La partie haute montre la variation du volume de chaque structure au cours du temps chez les rats sauvages. On observe que dans ce groupe, le volume reste relativement constant jusqu'à l'âge de 12 mois. A 14 mois

en revanche on observe une tendance à l'atrophie dans le cortex et le striatum. En comparant cette évolution à celle dans le groupe BACHD injecté avec PBS, ce dernier montre une atrophie plus précoce du cortex, du striatum et du CC, avec une perte de volume significativement plus importante à 12 mois. En comparant l'évolution temporelle du volume entre les rats sauvages et le groupe BACHD traité cette fois, aucune différence significative n'est observée. Une tendance semble plutôt apparaître vers une perte de volume moins importante chez les rats traités. La figure 63 b) montre les courbes de volume du striatum, cortex moteur et corps calleux, normalisé par le volume mesuré avant la première injection, dans les trois groupes. On observe bien une perte de volume plus précoce chez les rats BACHD non traités, tandis que les rats BACHD traités se comportent comme les rats sauvages.

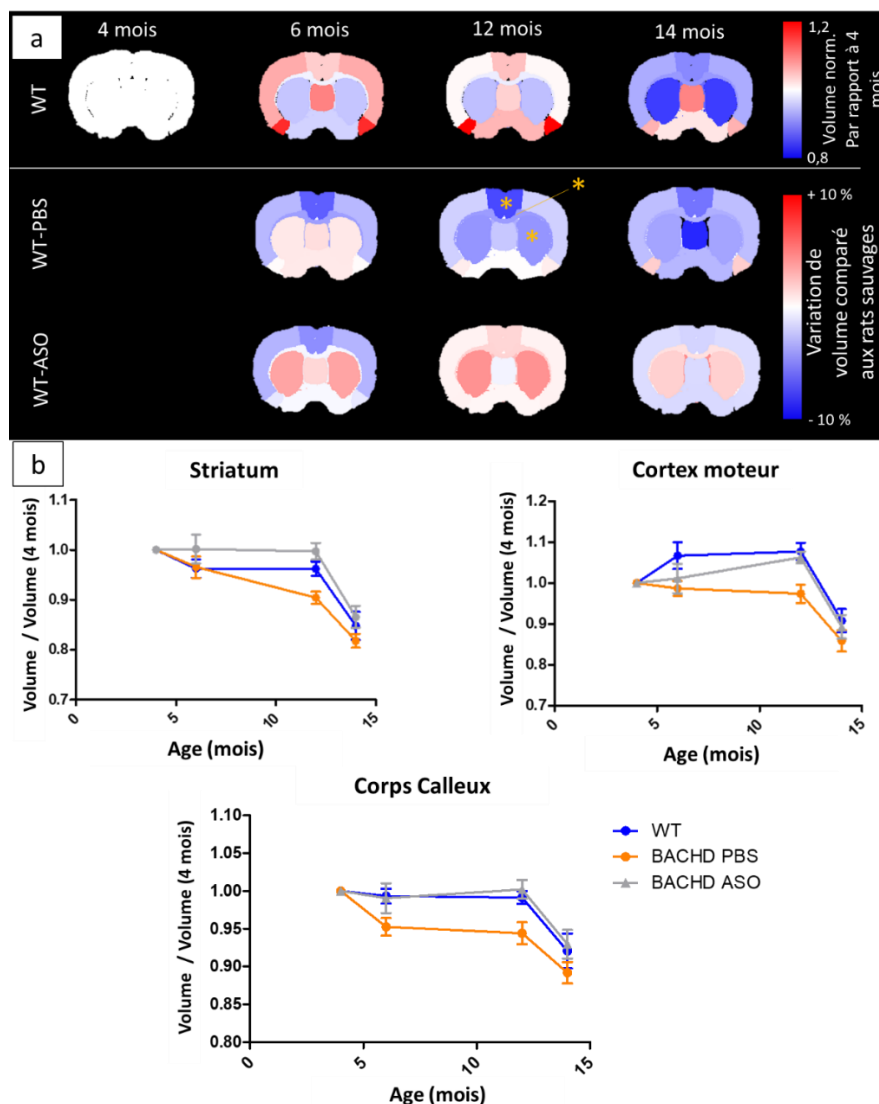


Figure 63 : Résultats de l'analyse volumétrique longitudinale. a) En haut : variation du volume des structures cérébrales au cours du temps par rapport au volume mesuré à 4 mois chez les rats sauvages. En bas : Variation de volume entre les rats sauvages et les groupes BACHD non traité (ligne supérieure) et traité (ligne inférieure), par rapport au volume mesuré à 4 mois. Les étoiles jaunes illustrent les régions avec une perte de volume significativement plus importante chez les rats non traités. b) Variation du volume au cours du temps par

rapport au volume mesuré à 4 mois dans le striatum, le cortex et le corps calleux (ANOVA à mesures répétées + Bonferroni).

IX.4.a.i. Discussion

La variation du volume au cours du temps dans les trois groupes montre un comportement différent entre le groupe BACHD non traité et les deux autres groupes. Il semble ainsi que l'injection des ASO à 5 mois ait un effet bénéfique sur les rats BACHD du groupe traité en secourant la perte de volume du striatum, du cortex et du CC. Il est intéressant de remarquer que l'effet des ASO semble surtout survenir avec la première injection. En effet, c'est entre les passages à l'IRM à 4 et 6 mois qu'on observe une perte de volume de l'ordre de 5% chez les rats non traités, stoppée possiblement par le traitement dans le groupe traité. En revanche, entre les sessions d'imagerie acquises à 12 et 14 mois, la seconde injection n'empêche pas la perte de volume de près de 10% observée chez les rats traités. Cette atrophie est cependant également observée chez les rats sauvages, ce qui laisse supposer une origine due au vieillissement normal des rats. Afin de valider l'extinction de la HTT mutée dans le striatum des rats BACHD traités, une analyse Western Blot a été réalisée sur les tissus cérébraux de ces derniers. La figure 64 montre les résultats de quantification du marquage à l'anticorps 1C2, normalisés par le groupe BACHD non traité. On observe bien une diminution de la HTT mutée chez le groupe traité, ainsi qu'une valeur très faible chez les rats sauvages, dû au marquage non spécifique de la membrane. Cependant, la bande de la HTT entière est très faible et difficile à quantifiée, ce qui mène à une dispersion importante et il est intéressant d'observer une autre bande, à un poids moléculaire de 50 kDa, qui montre également une forte diminution chez le groupe traité. Cette bande pourrait correspondre à un produit de dégradation de la HTT. Comme expliqué dans le chapitre III, ces fragments sont toxiques pour les cellules et participent à la pathogénèse. La réduction de leur présence pourrait donc expliquer l'efficacité de l'ASO utilisé.

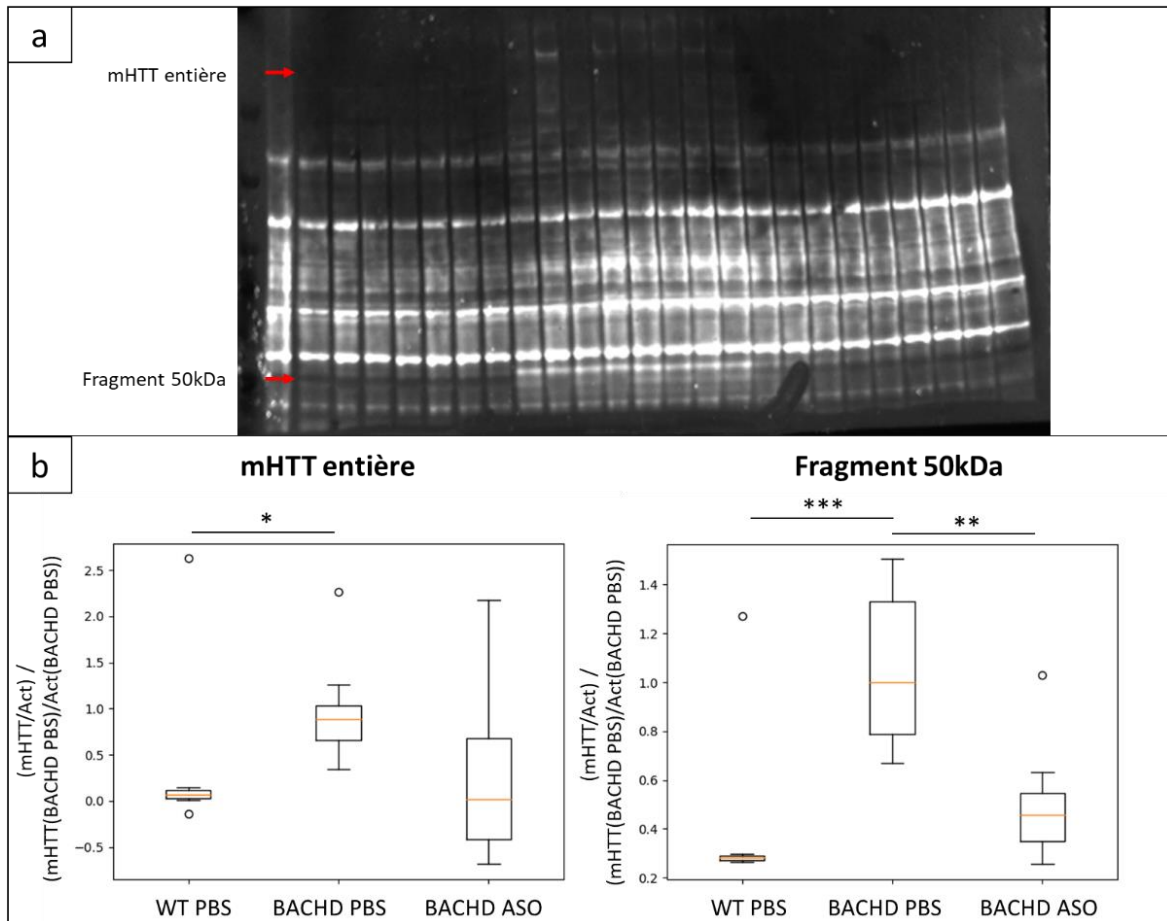


Figure 64 : a) Révélation du western blot avec anticorps 1C2. On observe la bande de la HTT mutée entière et la bande d'un fragment de HTTm à 50 kDa. b) Quantification réalisée à partir de ces bandes, normalisée par la bande de l'actine. Les résultats sont présentés sous forme d'un ratio avec le groupe BACHD non traité. * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$ (ANOVA à un facteur + Bonferroni).

IX.5. Les résultats de spectroscopie RMN montrent l'importance du choix de l'anesthésie dans la conception d'une étude longitudinale

IX.5.a Résultats

Si l'analyse volumétrique des cerveaux de rats inclus dans l'étude longitudinale a permis l'évaluation de la thérapie par ASO, il est intéressant de regarder si d'autres modalités pourraient permettre d'obtenir des biomarqueurs donnant plus d'informations sur le fonctionnement des cellules cérébrales avec et sans traitement. Sur la base des précédents résultats montrant une diminution du lactate dans le striatum de rats BACHD par spectroscopie RMN, laissant supposer une réorganisation du métabolisme énergétique chez ces derniers, cette modalité a été incluse dans le protocole. Cependant, contrairement au protocole utilisé par Jérémie Pépin, il a été décidé d'utiliser ici une anesthésie réduite en isoflurane. En effet, il a été montré qu'au-delà de 1%, l'isoflurane augmente la concentration de lactate dans le cerveau ²¹¹. Dans le but d'obtenir un résultat plus robuste, n'altérant pas la

concentration de lactate, il a donc été décidé de réduire l'isoflurane inhalé à 0,5% et d'ajouter une perfusion sous cutanée de médétomidine. Cette modification du protocole a en effet diminué le niveau de lactate mesuré par rapport aux résultats précédents. Cependant, cette réduction a été tellement importante qu'il n'était plus possible de quantifier le lactate dans la limite de la borne de Cramér-Rao. Le protocole a donc été modifié pour la deuxième partie de l'étude longitudinale avec une anesthésie à l'isoflurane identique à celle utilisée par Jérémy Pépin. La figure 65 montre un spectre acquis avec anesthésie à l'isoflurane et un spectre acquis avec une anesthésie à la médétomidine pour illustrer cette baisse sensible du lactate qui a posé problème pour sa quantification.

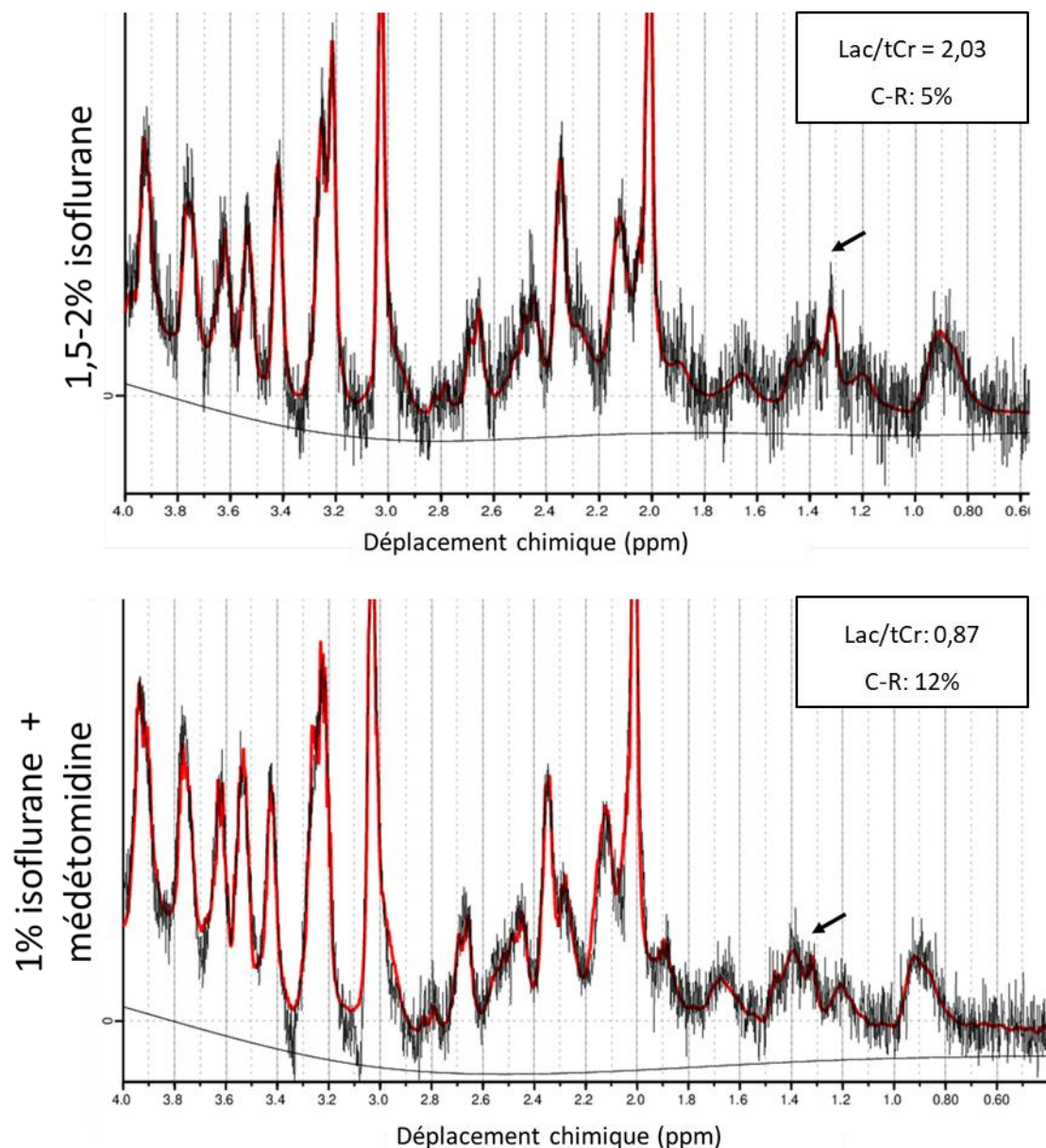


Figure 65 : Spectres métaboliques acquis avec anesthésie à l'isoflurane seulement (en haut) ou à l'isoflurane réduit et accompagné de médétomidine (en bas). Les flèches montrent le pic du lactate.

Suite au changement de protocole, les résultats de spectroscopie seront montrés indépendamment entre les passages à l'IRM à 4 et 6 mois et ceux à 12 et 14 mois. La figure 66 montre les résultats de la quantification moyenne des métabolites pour chaque groupe à partir des spectres obtenus lors des deux premiers points de passage. La quantification du lactate n'est pas montrée car ce dernier n'a pas atteint le seuil de 5% de borne de Cramér-Rao. Aucun autre métabolite d'intérêt ne montre une différence significative entre les groupes. Cependant, après l'injection on constate une légère tendance à la baisse du glutamate striatal dans le groupe BACHD non traité en comparaison avec les rats sauvages. Cette baisse n'est pas visible dans le groupe traité. Par ailleurs, on observe également une tendance à la hausse du myo-inositol dans le groupe traité avec des ASO, en comparaison avec les deux autres groupes.

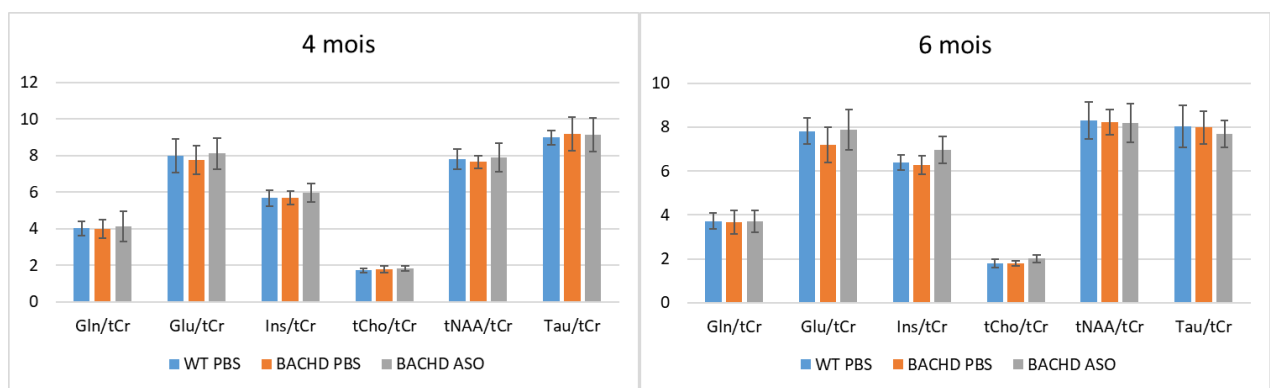


Figure 66 : Résultats de la quantification des métabolites réalisée à partir des spectres acquis dans le striatum des animaux à 4 et 6 mois

La figure 67 montre les mêmes résultats pour les spectres acquis à 12 et 14 mois. On observe une augmentation du niveau de lactate chez les rats BACHD traités à 14 mois. De plus, une augmentation du myo-inositol et de la choline totale sont également visibles, à 12 et à 14 mois.

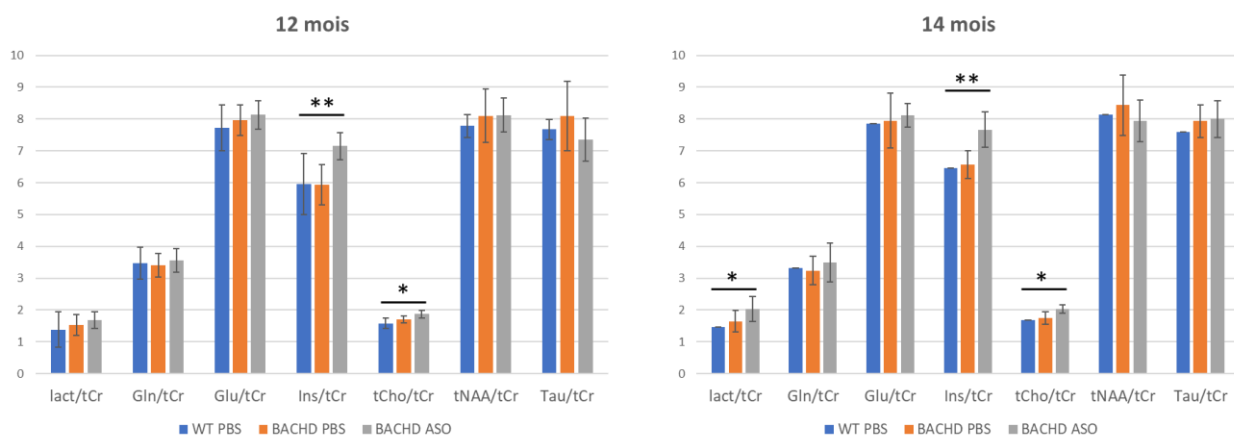


Figure 67 : Résultats de la quantification des métabolites réalisée à partir des spectres acquis dans le striatum des animaux à 12 et 14 mois. * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$ (ANOVA à un facteur + Bonferonni).

IX.5.b Discussion

Ces résultats montrent l'importance du choix de l'anesthésie dans le protocole d'IRM. Afin d'obtenir une valeur plus juste de la concentration de lactate, nous avons décidé de réduire le niveau d'isoflurane. Cependant cela a eu pour conséquence de réduire la concentration de lactate, ce qui a empêché la quantification fiable de ce métabolite. Le protocole a donc été rectifié pour les deux derniers temps d'observation par spectroscopie RMN. Étonnamment, aucune différence dans la concentration de lactate n'a été observée entre les rats sauvages et BACHD non traités à 12 et 14 mois, en contradiction avec les résultats précédemment obtenus au laboratoire. Cela pourrait être expliqué par le régime alimentaire des rats. En effet, les rats utilisés par Jérémie Pépin étaient au régime de 10 croquettes par jour. Les rats utilisés dans cette étude ont subi le même régime à partir de l'âge de 6 mois, cependant en raison de la fermeture du laboratoire il a été impossible de le poursuivre et les rats avaient accès à la nourriture ad libitum au moment du passage à l'IRM. Une autre possibilité est une hétérogénéité entre les deux cohortes qui pourrait être due à la dérive génétique. À 14 mois, on observe une augmentation du lactate dans le groupe traité. Cette information, bien que difficile à interpréter au plan mécanistique, semble témoigner d'un réarrangement du métabolisme cérébral dans ce groupe.

De plus, les spectres métaboliques acquis à 12 et 14 mois ont montré une augmentation nette du myo-inositol et de la choline dans le striatum des rats BACHD traités. Une tendance à la hausse du myo-inositol apparaît en fait dès la première acquisition post-injection chez ces rats. Ces deux métabolites sont considérés comme des marqueurs astrocytaires, en raison de leur présence importante dans ces cellules. Ces résultats pourraient donc être interprétés comme signes d'une réactivité astrocytaire dans ce groupe. Cette information est importante car elle pourrait également signifier qu'une inflammation est en cours dans les tissus cérébraux. Une telle inflammation pourrait faire gonfler les tissus et diminuer la perte de volume mesurée en IRM. On ne saurait alors dire si cette amélioration est vraiment due à la diminution de la HTT mutée ou à une inflammation provoquée par le traitement. Afin de vérifier cette hypothèse, l'expression de GFAP a été mesurée dans le striatum des rats par RT-qPCR. La figure 68 montre les résultats de cette analyse. On n'observe aucune différence significative entre les trois groupes, ce qui suppose qu'il n'y a pas de réactivité astrocytaire majeure dans le groupe traité.

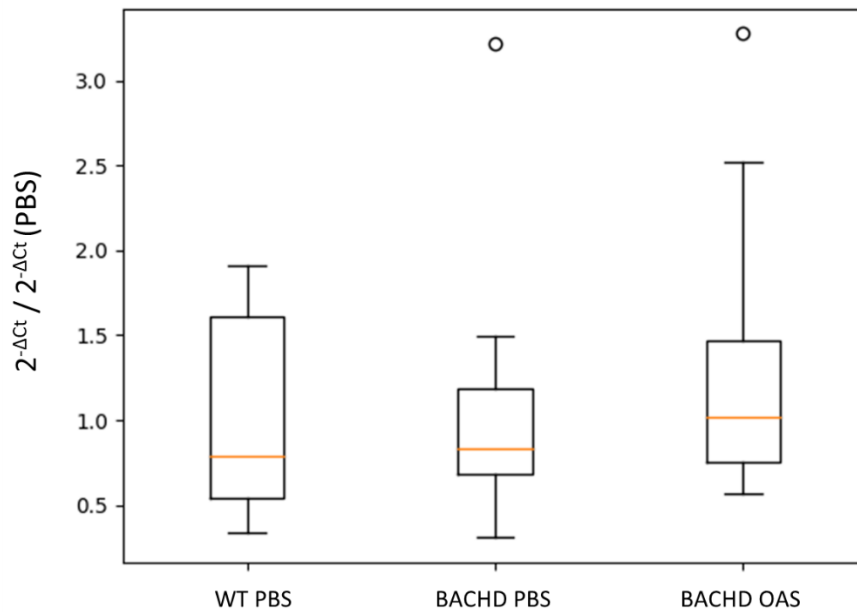


Figure 68 : Résultats de la RT-qPCR réalisée sur les rats inclus dans l'étude longitudinale avec un couple d'amorces spécifique de la GFAP.

IX.6. L'imagerie CEST du cerveau entier nécessite des améliorations

IX.6.a Résultats

Les images gluCEST du cerveau de rat ont été acquises dans l'objectif d'obtenir un biomarqueur du métabolisme permettant de décrire l'effet de la thérapie. Les précédents résultats obtenus par Jérémy Pépin ont montré un contraste gluCEST réduit chez les rats BACHD âgés de 12 mois, dans le striatum, le cortex et le corps calleux. La figure 69 montre les courbes de gluCEST acquises au cours de la présente étude en fonction du temps sur une sélection de régions d'intérêt. Aucune différence significative n'est observée entre les groupes de rats sauvages, BACHD non traités ou BACHD traités. On observe une dispersion très importante à l'intérieur de chaque groupe, qui peut expliquer cette absence de résultats.

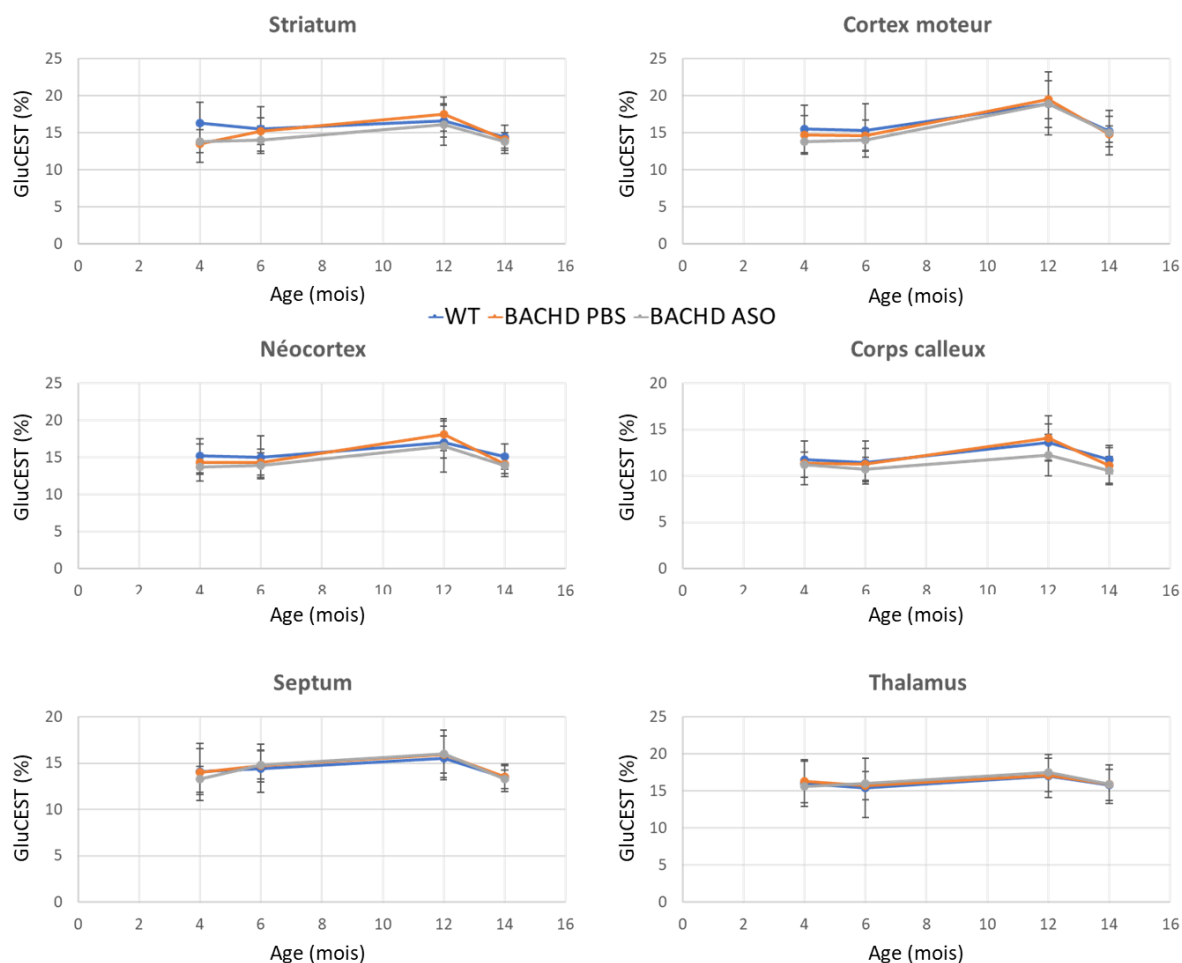


Figure 69 : Signal gluCEST moyen par groupe en fonction de l'âge des animaux sur une sélection de structures cérébrales d'intérêt. Les barres d'erreur représentent l'écart-type.

IX.6.b Discussion

Les résultats de l'imagerie gluCEST acquises lors de cette étude sont en contradiction avec les résultats obtenus par Jérémie Pépin et ne permettent pas de décrire l'effet du traitement. Plusieurs pistes peuvent permettre de comprendre cette contradiction et de donner des pistes d'amélioration. Tout d'abord, on constate que les résultats de gluCEST dans le striatum sont en accord avec les résultats de spectroscopie RMN acquis dans la même structure, puisqu'aucune différence de [Glu] n'est visible entre les groupes. Il semble donc que cette cohorte d'animaux ne montre pas les mêmes troubles métaboliques que la cohorte utilisée au cours de la précédente thèse. Cela peut être dû à la dérive génétique de la colonie ou bien aux conditions expérimentales. En effet, comme décrit plus haut, le régime alimentaire et le protocole d'anesthésie ont été modifiés pendant l'étude longitudinale. Ces facteurs peuvent avoir un impact majeur sur les effets mesurés et il sera important à l'avenir de mieux les contrôler. La réaction des animaux aux changements de protocoles peut différer d'un animal à l'autre, ce qui pourrait expliquer la dispersion importante observée dans cette étude. Un autre facteur

pouvant expliquer cette dispersion est l'utilisation de mâles et de femelles dans chaque groupe. Enfin, la séquence gluCEST utilisée peut probablement être améliorée. En effet, l'acquisition sur 5 coupes couvrant une large portion du cerveau du rat demande un compromis sur la résolution spatiale et le rapport signal sur bruit. Une acquisition plus ciblée, sur un nombre de coupes réduit, sélectionnées pour imager les structures d'intérêt, pourrait permettre d'accroître le contraste et/ou la résolution et d'obtenir des résultats plus robustes.

Les résultats de l'étude présentée dans ce chapitre complètent les résultats précédemment obtenus durant la thèse de Jérémie Pépin avec l'essai thérapeutique d'un ASO spécifique de la HTTm humaine. Une étude préliminaire a permis de confirmer l'extinction sélective de cette dernière chez les rats BACHD. La dose déterminée à partir de cette première étude s'est montrée efficace pour secourir la perte de volume du striatum, du cortex et du corps calleux mesurée chez les rats BACHD par IRM anatomique longitudinale. L'analyse des niveaux de HTTm dans le cerveau de ces rats a montré une réduction importante d'un fragment de HTTm qui pourrait expliquer ces effets bénéfiques en bloquant les mécanismes de pathogénèse décrits dans le chapitre III et impliquant ces fragments toxiques. Néanmoins, les résultats d'imagerie CEST et de spectroscopie RMN n'ont pas permis de conclure sur une réorganisation du métabolisme chez les rats BACHD qui serait altérée par le traitement. Afin d'espérer utiliser ces observations comme biomarqueurs précoces du métabolisme énergétique, il sera nécessaire à l'avenir de mieux contrôler les conditions expérimentales, notamment au niveau de l'anesthésie et du régime alimentaire des animaux. Des améliorations peuvent également être apportées à la séquence d'IRM CEST. Ces points seront discutés dans le chapitre XI de ce manuscrit.

Chapitre X : Évaluation de l'efficacité d'ARN interférant dans un modèle souris d'ASC7

X.1. Introduction

Le projet TreatPolyQ avait également pour objectif d'étudier d'autres maladies à PolyQ telles qu'ASC7, qui présente des particularités dans la pathogénèse (voir chapitre I). Elle se distingue de la MH par sa symptomatologie, ses caractéristiques anatomopathologiques et les mécanismes physiopathologiques déclenchés par la mutation du gène ATXN7. En effet, les patients présentent deux sites principaux de dégénérescence : le cervelet mais également la rétine. Comme pour la MH, la recherche de biomarqueurs non-invasifs capables d'offrir des informations fonctionnelles dans la phase présymptomatique de la maladie est un enjeu majeur pour la compréhension des mécanismes de pathogénèse induisant cette double dégénérescence et l'évaluation de l'efficacité de thérapies géniques. Cependant, les modèles animaux pertinents manquent pour modéliser cette pathologie. Plusieurs modèles transgéniques ont été développés, mais aucun ne récapitule à la fois la rétinopathie et l'ataxie cérébelleuse²⁵. Un modèle knock-in avec 266 répétitions CAG insérées dans le gène murin de *atxn7* montre des caractéristiques des deux aspects de la pathologie mais les souris hétérozygotes développent la maladie très rapidement²¹². L'espérance de vie des animaux ne dépassant pas 19 semaines, il est difficile d'observer la progression de la pathologie avant l'apparition des symptômes. Ce modèle n'est donc pas pertinent pour l'étude de la phase présymptomatique et l'évaluation de thérapies géniques, malgré les avancées prometteuses réalisées dans ce domaine. L'administration de shRNA sélectifs de l'allèle muté de *ATXN7* à des cellules dérivées de patients a montré une réduction d'ATXN7m⁴⁶. Cependant, à ce jour aucune étude *in vivo* n'a montré une restauration des fonctions motrices ou visuelles suivant l'injection d'une telle thérapie dans un modèle murin.

Dans ce chapitre, nous introduirons un nouveau modèle knock-in d'ASC7 dérivé du modèle SCA7^{266Q/5Q} avec 140 répétitions CAG. Ce modèle a été caractérisé en partie au laboratoire et présente toutes les caractéristiques principales de cette pathologie, avec un développement plus progressif. Ce modèle SCA7^{140Q/5Q} a donc été un modèle de choix pour une étude longitudinale visant à évaluer une thérapie génique par IRM. La thérapie sélectionnée est un vecteur viral exprimant des shRNA spécifiques de *ATXN7* mutée (voir chapitre II). Le vecteur AAV témoin est conçu pour exprimer un ARN composé des mêmes bases mais qui en théorie ne s'associe à aucun ARN endogène.

X.2. Matériels et Méthodes

X.2.a Caractérisation ex vivo du modèle

Les cerveaux de 6 souris SCA7^{140Q/140Q}, 9 souris SCA7^{140Q/5Q} et 8 souris témoins issues des mêmes portées ont été imagés. Les souris étaient âgées de 6 mois au moment de l'euthanasie. Les cerveaux toujours contenus dans la boîte crânienne ont été incubés 5 jours dans une solution de gadolinium (Dotarem, concentration finale 0,05 mmol/mL) pour augmentation du contraste de l'image anatomique. La boîte crânienne a été laissée afin de garder intacte la structure cérébrale. Les cerveaux ont été imagés dans l'IRM 11,7T du laboratoire en utilisant la crysonde et une séquence EPI (TE/TR=28/3000 ms, 8 segments, 2 averages, 35 coupes, résolution dans le plan = 100 x 100 µm², épaisseur de coupe 200 µm).

X.2.b Étude d'imagerie longitudinale avec essai thérapeutique

X.2.b.i. Souris SCA7^{140Q/5Q} et témoins

Les souris SCA7^{140Q/5Q} utilisées sont issues des animaleries de l'IGBMC (Illkirch, France). La cohorte a été envoyée à MIRCen à l'âge de 3 mois, 1 mois après injection rétro-orbitale des vecteurs viraux exprimant les shRNA. Au total, 28 souris femelles ont été incluses dans le protocole d'IRM longitudinale, réparties en 4 groupes :

- SCA7^{140Q/5Q} traitées avec AAV-shRNA (n=7) dont l'efficacité a été vérifiée par l'équipe d'Yvon Trottier à l'IGBM.
- SCA7^{140Q/5Q} traitées avec un AAV témoin, exprimant une séquence d'ARN non spécifique de l'ATXN7 (n=6)
- SCA7^{140Q/5Q} non traitées (n=6)
- Souris témoins sauvages non traitées (n=9)

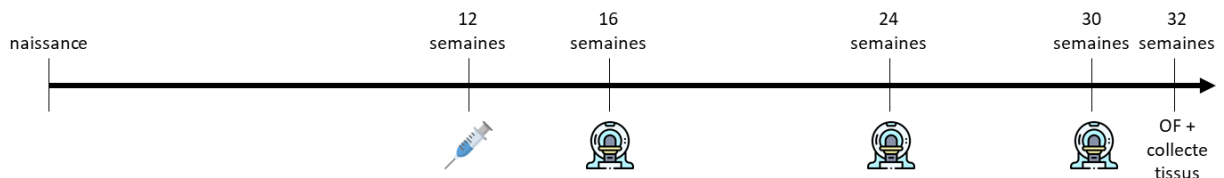


Figure 70 : Déroulé temporel de l'étude longitudinale d'imagerie sur le modèle SCA7^{140Q/5Q}.

X.2.b.ii. Protocole d'IRM

Les animaux ont été soumis à 3 sessions d'imagerie à l'âge de 16, 24 et 30 semaines pour étudier longitudinalement la progression des modifications cérébrales. Comme pour l'étude du modèle knock-in de la MH, les images ont été acquises à l'aide d'une crysonde émission/réception Bruker sur

l'aimant 11,7T Bruker (Bruker, Ettlingen, Allemagne) horizontal du laboratoire. Le protocole, très similaire à celui utilisé pour les souris modèles de la MH CAG140, a débuté par l'acquisition d'une image anatomique du cerveau entier (Séquence Turbo Spin Echo, TE/TR = 5/10 000 ms, Facteur Turbo = 10, TE effectif = 45 ms, résolution dans le plan = 100 x 100 μm^2 , 200 μm d'épaisseur de coupe, 100 coupes, 20 min). Cette séquence a été suivie de l'acquisition des images d'IRMf à l'état de repos (séquence EPI, TE/TR= 10/1 000 ms, 1 segment, résolution dans le plan = 250 x 250 μm^2 , 500 μm d'épaisseur de coupe, 12 coupes, 8 min). S'en est suivi la séquence DTI (séquence EPI, 8 segments, TE/TR = 30/3 200 ms, résolution dans le plan = 112 x 112 μm^2 , 500 μm d'épaisseur de coupe, 10 coupes, b-value = 1000 s/mm², 30 directions, 12 min) placée à l'aide du repère anatomique illustré dans la figure 47 (chapitre VIII). Les spectres métaboliques ont ensuite été acquis dans l'hippocampe des souris (LASER, TE/TR=20/1 000 ms, dimension 6 x 1,5 x 2 mm³). Le voxel d'acquisition a été placé de sorte à maximiser la portion d'hippocampe à l'intérieur du voxel et à minimiser la portion de liquide céphalo-rachidien (LCR). Après optimisation de l'homogénéité du champ magnétique (shim) dans un voxel englobant les régions d'intérêt, les images gluCEST (séquence spin-écho, TE/TR = 6/5 000 ms, 10 échos, TE effectif = 30 ms, résolution dans le plan = 150 x 150 μm^2 , 600 μm d'épaisseur de coupe, 3 coupes non continues, 23 min), comprenant un module de saturation ($T_{\text{sat}} = 10 \times 100$ ms, $B_1 = 5 \mu\text{T}$, $\delta = [-20 ; -5; 0; 5; 5 ; 20]$ ppm) ont été acquises. Un Z-spectrum a également été acquis pour correction des inhomogénéités de B_0 par la méthode WASSR ($B_1 = 0,2 \mu\text{T}$, $\delta = [-1; 0; 1; 1]$ ppm, 11 min). Les coupes ont été placées de la même façon que montré sur la figure 47 (chapitre VIII).

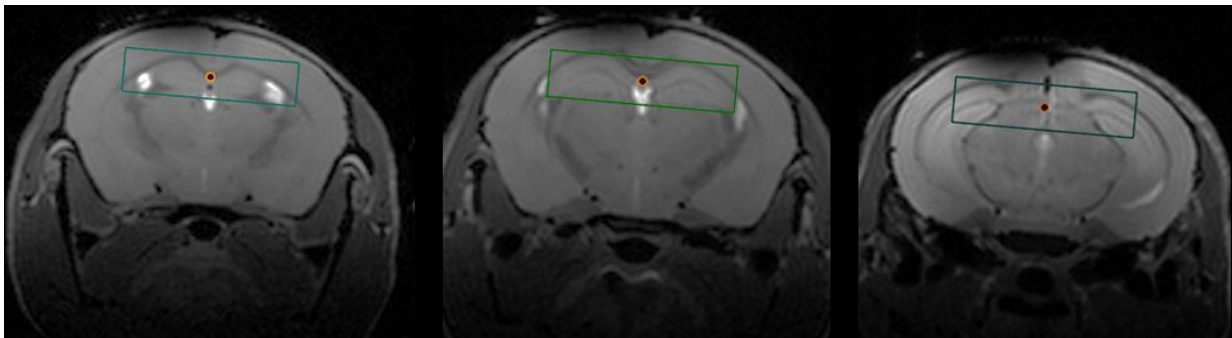


Figure 71 : Positionnement du voxel d'acquisition de spectre RMN dans l'hippocampe.

X.2.b.iii. Anesthésie

Le protocole d'anesthésie a été adapté à l'acquisition d'images d'IRMf à l'état de repos. Après induction à 3% d'isoflurane, un bolus de médétomidine (0,025 mg/kg) a été administré aux souris par voie sous-cutanée. Après stabilisation de l'anesthésie et installation sur le lit de l'IRM, les souris ont été perfusées en continu par voie sous-cutanée avec une solution de médétomidine (0,05 mg/kg/h). La concentration d'isoflurane dans le mélange 1 : 1 d'air : O₂ inhalé par la souris a initialement été réglée à 1% pour stabiliser l'anesthésie lors de la séquence anatomique. 10 min avant la fin de cette

séquence, la concentration d'isoflurane a été diminuée à 0,5% pour approcher au maximum des conditions d'état de repos. Après la séquence d'IRMf, la concentration a été remontée à 1% pour garantir une bonne anesthésie tout au long du protocole.

X.2.b.iv. Test de comportement

Les souris ont été soumises au test de l'*Open Field*. Pour réaliser ce test, les souris ont été positionnées dans une arène carrée de 50 cm de côté et filmées 30 min. Leur mouvement a été analysé a posteriori à l'aide du logiciel Ethovision XT (Noldus). Une zone centrale et une zone périphérique ont été définies pour analyser le temps passé au centre de l'arène et les redressements des souris ont été comptabilisés manuellement.

X.3. Caractérisation du modèle SCA7^{140Q/5Q}

X.3.a Résultats

L'analyse volumétrique des cerveaux ex-vivo de souris âgées SCA7^{140Q/5Q} et SCA7^{140Q/140Q} âgées de 6 mois révèle une atrophie des structures cérébrales chez les souris hétérozygotes et homozygotes. La figure 72 montre les résultats de cette analyse volumétrique. On observe une atrophie générale du cerveau avec une vulnérabilité du CC, des régions corticales et de l'hippocampe.

L'atrophie des structures cérébrales est plus importante chez les souris homozygotes, montrant une progression du phénotype avec le génotype. Le modèle SCA7^{140Q/5Q} a ainsi été évalué idéal pour une étude longitudinale ayant pour objectif l'évaluation d'une thérapie génique à l'aide de biomarqueurs obtenus par IRM. La thérapie sélectionnée est un vecteur viral exprimant des shRNA spécifiques de l'ATXN7 mutée.

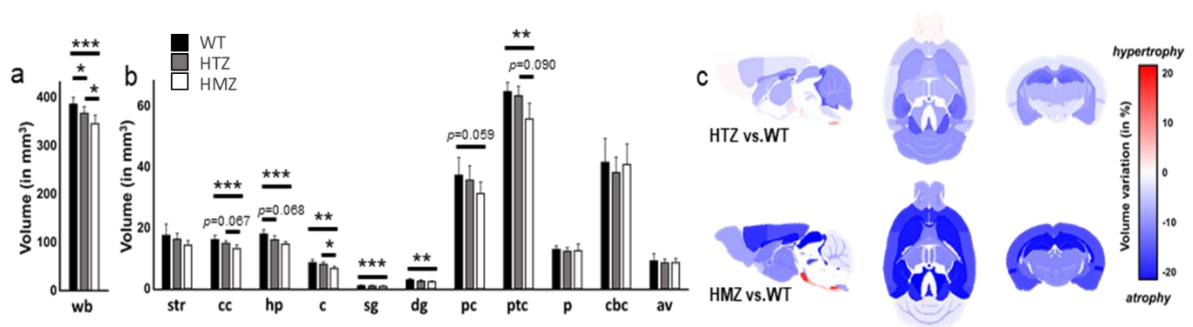


Figure 72 : Analyse volumétrique sur les cerveaux ex-vivo de souris SCA7^{140Q/140Q} et SCA7^{140Q/5Q}. a) Volume cérébral total b) volumes des structures d'intérêt. Str= striatum, cc= corps calleux, hp= hippocampe, c= cortex, sg= stratum granulosum, dg= gyrus denté, pc= cortex piriforme, ptc= cortex pariéto-temporal, p= pont, cbc= cortex cérébelleux, av= arbor vitae. c) Cartes de variation de volume entre souris témoins et hétérozygotes (en haut) ou homozygotes (en bas). * : p < 0.05, ** : p < 0.01, *** : p < 0.001 (ANOVA à un facteur + Bonferroni). Tiré de Niewiadomska et al. 2021¹⁴⁵.

X.3.b Discussion

Dans une récente publication, Anna Niewiadomska et al., membre de l'équipe d'Yvon Trottier à l'IGBMC à Illkirch, partenaire du projet TreatPolyQ, décrivent en détails le phénotype d'un modèle knock-in d'ASC7 avec 140 répétitions CAG¹⁴⁵. Les souris hétérozygotes SCA7^{140Q/5Q} montrent un phénotype moteur et cognitif progressif, reprenant les caractéristiques de la maladie chez l'homme. Les résultats de l'analyse volumétrique des cerveaux *ex vivo* de souris hétérozygotes et homozygotes âgées de 6 mois présentés ci-dessus viennent compléter cette caractérisation et ont été inclus dans la publication. L'atrophie progressive avec le génotype du cerveau entier illustre la pertinence de l'utilisation de souris SCA7^{140Q/5Q} pour observer la progression de la maladie. De plus, notre analyse a permis de mettre en évidence une vulnérabilité du CC, de l'hippocampe et du cortex dans ce modèle, en similitude avec ce qui a été observé chez des patients atteints d'ASC7²¹³. C'est pourquoi le voxel d'acquisition de la séquence de spectroscopie RMN a été placé dans l'hippocampe des souris pour l'étude longitudinale.

De même, sur la base de la caractérisation du modèle SCA7^{140Q/5Q} présentée par Niewiadomska et al.¹⁴⁵, montrant une grande sensibilité du test de l'*Open Field* (OF) comme marqueur de la progression de la pathologie dans ce modèle, il a été décidé de réaliser ce test sur les souris incluses dans le protocole d'IRM avant la collecte de leurs tissus cérébraux. Les souris montrent également une différence importante de masse corporelle, c'est pourquoi ce paramètre a été mesuré de façon hebdomadaire tout au long de l'étude longitudinale.

X.4. L'imagerie anatomique montre un effet de l'injection de vecteurs viraux sur l'atrophie cérébrale

X.4.a Résultats

Afin de poursuivre la caractérisation du modèle SCA7^{140Q/5Q} et d'évaluer l'efficacité du traitement, l'imagerie volumétrique a été ajoutée au protocole. Les volumes des régions cérébrales ont été extraits et sont présentés dans la figure 73. On observe dès 16 semaines une atrophie significative de plusieurs régions chez les souris modèles d'ASC7 non traités en comparaison aux souris sauvages. Ces régions incluent le cortex frontal, le cortex pariéto-temporal, le cortex moteur, le thalamus, et l'hypothalamus. A 24 mois, ces atrophies sont accentuées et le CC, l'hippocampe, le striatum et le pallidum présentent également un volume réduit chez les souris non traitées. Les souris traitées avec l'AAV exprimant les shRNA ou l'AAV témoin ne présentent en revanche aucune différence significative avec les souris sauvages et il semble que chez ces deux groupes le volume des structures reste au même niveau que les souris sauvages.

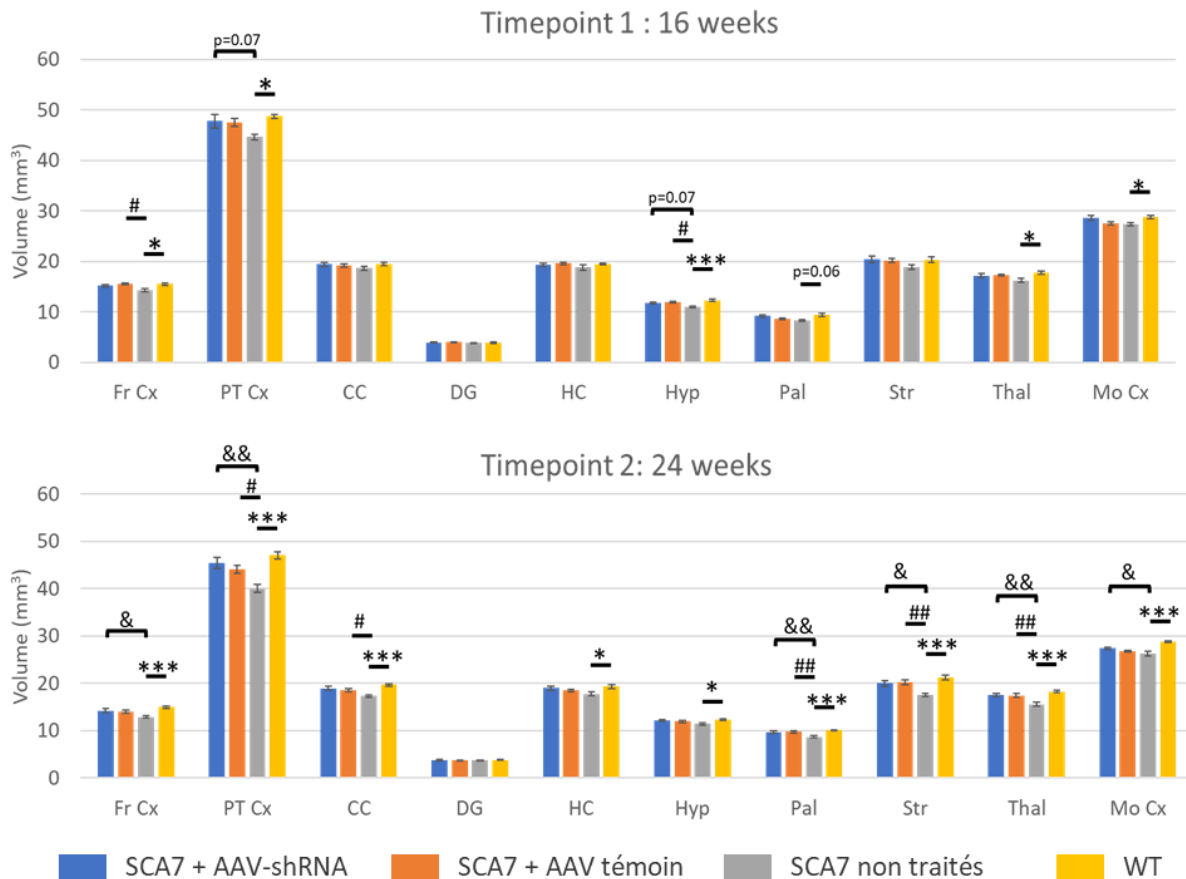


Figure 73 : Volume des structures d'intérêt dans le cerveau des souris SCA7^{140Q/5Q}. * : Différence significative entre groupes SCA7^{140Q/5Q} non traité et témoin (* : p<0,05 , ** : p<0,01 , *** : p<0,001) ; & : Différence significative entre groupes SCA7^{140Q/5Q} traité avec shRNA et SCA7^{140Q/5Q} non traité. # : Différence significative entre groupes SCA7^{140Q/5Q} traité avec AAV témoin et SCA7^{140Q/5Q} non traité. (ANOVA à mesures répétées + Bonferroni). Fr Cx = Cortex frontal, PT Cx= Cortex pariéto-temporal, CC= Corps calleux, DG= Gyrus denté, HC= Hippocampe, Hyp= Hypothalamus, Pal= Pallidum, Str= Striatum, Thal= Thalamus, Mo Cx = Cortex Moteur.

X.4.b Discussion

Ces résultats constituent la première étude longitudinale d'IRM réalisée sur un modèle murin d'ASC7. Ils permettent une caractérisation plus poussée de ce modèle avec un suivi du volume de chaque structure cérébrale au cours du temps. Il est intéressant de noter que dès le premier passage à l'IRM à 16 semaines, plusieurs de ces structures montrent une atrophie en comparaison aux souris sauvages. Cela signifie qu'il aurait été pertinent d'examiner des animaux plus jeunes pour pouvoir observer des troubles fonctionnels précédant la mort neuronale. Cependant, la généralisation et l'accentuation de l'atrophie observée à 24 semaines montrent que le processus dégénératif n'est qu'à son commencement lors du premier examen IRM.

Etonnamment, on constate une disparition de l'atrophie non seulement dans le groupe traité avec la thérapie génique, (AAV exprimant une séquence ciblant spécifiquement l'ATXN7) mais aussi avec

l'agent témoins (séquence ARN témoin). Il semble alors que ce soit l'injection d'un vecteur viral qui ait un effet bénéfique sur les souris SCA7^{140Q/5Q}. Cette hypothèse est supportée par les courbes de masse corporelle des souris, mesurée de façon hebdomadaire tout au long de l'étude. Ces courbes sont montrées dans la figure 74. On y constate la même différence entre les deux groupes injectés et le groupe de souris modèles d'ASC7 non traité.

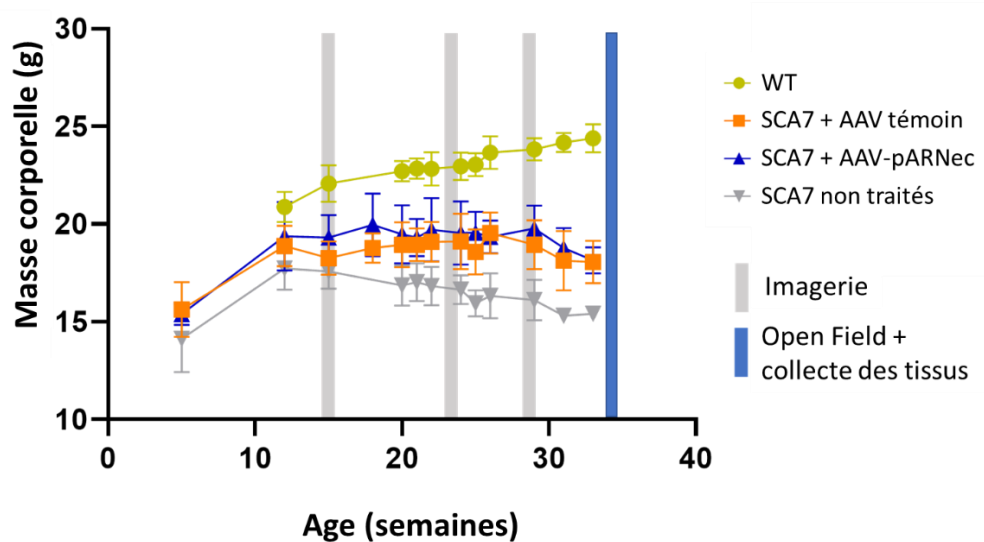


Figure 74 : Courbes de masse corporelle des souris incluses dans l'étude longitudinale en fonction du temps. De même, les résultats du test comportemental de l'OF montrent une différence significative de mobilité entre les souris sauvages et les souris modèles d'ASC7 injectées, mais aucune différence n'est visible entre les groupes ayant reçu la thérapie génique et le témoin (figure 75).

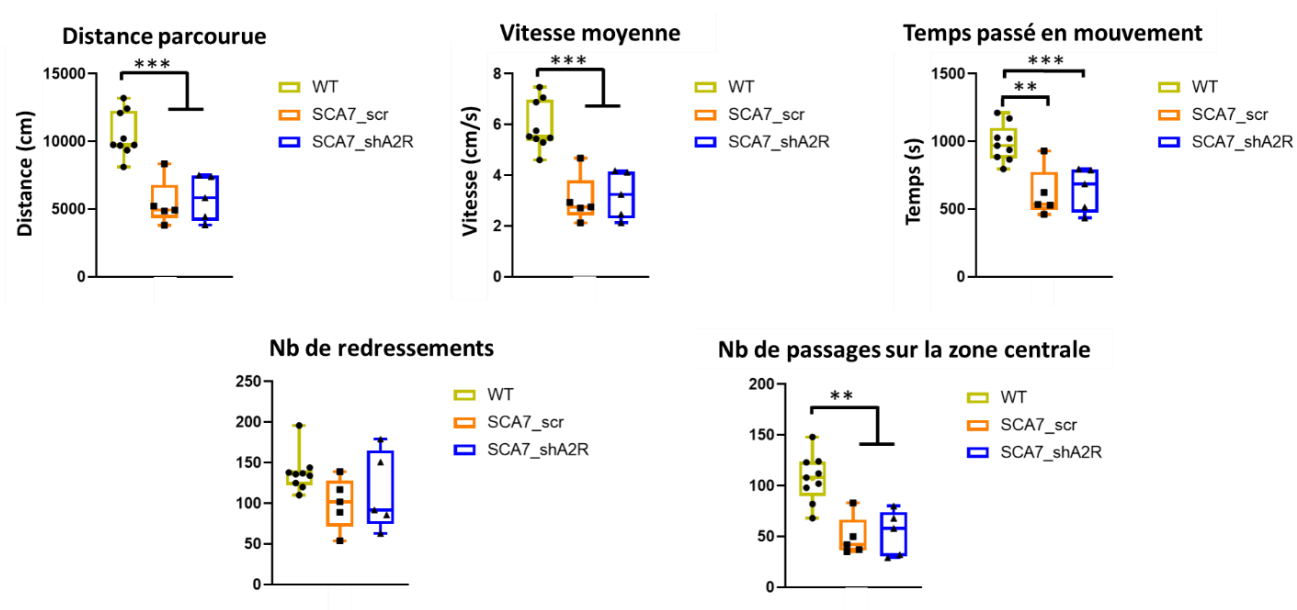


Figure 75 : Résultats du test d'Open-Field réalisé sur les souris après la dernière session d'IRM. A cet âge, une seule souris du groupe modèle d'ASC7 non traité demeurait vivante, c'est pourquoi ce groupe n'a pas été inclus dans ce test. * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$ (ANOVA à un facteur + Bonferonni).

La perte d'atrophie semble donc plutôt liée à l'injection de l'AAV plutôt qu'à un effet spécifique à l'extinction d'ATXN7 engendrée par les shRNA. Les pistes pouvant expliquer cet effet sont en cours d'exploration dans le laboratoire de nos collaborateurs à l'IGBMC. Parmi les pistes envisagées, celle d'une inflammation décuplant la protéolyse de l'ATXN7 mutée dans les neurones infectés est privilégiée. En effet, cela pourrait induire une diminution de l'ATXN7 de façon indirecte et ainsi freiner la progression de la pathologie.

X.5. La spectroscopie RMN et l'imagerie gluCEST montrent une altération du métabolisme chez les souris SCA7^{140Q/5Q}

X.5.a Résultats

X.5.a.i. Spectroscopie RMN

Afin d'aller plus loin dans la compréhension de la pathogénèse dans le modèle SCA7^{140Q/5Q}, et de détecter un potentiel effet du traitement sur le métabolisme, des spectres RMN ont été acquis dans un voxel placé dans l'hippocampe. Cette structure a été choisie car elle présente une morphologie adaptée au placement d'un voxel d'acquisition mais également car elle est fortement impactée dans la pathologie, chez l'homme comme dans le modèle étudié, comme le montrent les résultats préliminaires obtenus sur des cerveaux *ex vivo*. La figure 76 montre les résultats de la quantification des métabolites basée sur les spectres acquis à 16, 24 et 30 semaines.

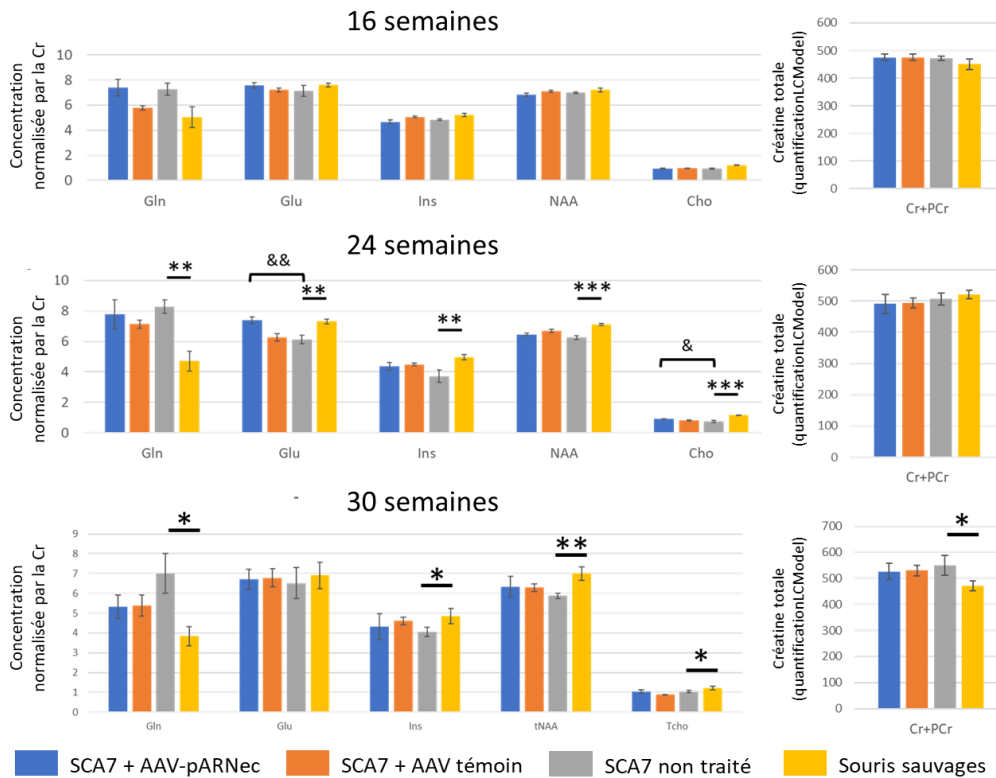


Figure 76 : A gauche : Concentration relative à la créatine des métabolites acquis par spectroscopie RMN dans l'hippocampe. A droite : Quantification par LCMoDel de la créatine totale, utilisée pour la normalisation. * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$ (ANOVA à mesures répétées+ Bonferonni).

Aucune différence significative n'est observée dans la quantification des métabolites d'intérêt chez les souris âgées de 16 semaines, 4 semaines après l'injection. En revanche, dès la session à 24 semaines, les souris SCA7^{140Q/5Q} non traitées affichent une concentration de Gln augmentée et une concentration de Glu, Ins, NAA et Cho diminuée en comparaison avec les souris témoins. Ces altérations sont également visibles à 30 semaines, mis à part la concentration en Glu qui a retrouvé un niveau similaire aux souris sauvages, indiquant un effet spécifique de l'AAV codant la séquence ciblant l'ATXN7. De façon analogue à ce qu'on observe au niveau des volumes des structures cérébrales et de la masse corporelle, aucune différence significative n'est observée entre le groupe traité avec shRNA et les souris sauvages, quel que soit l'âge des souris. Concernant le groupe traité avec un témoin, ce dernier montre une concentration réduite de Glu dans l'hippocampe à 24 semaines par rapport aux souris sauvages. En revanche, cette différence disparaît à 30 semaines et aucun autre métabolite ne montre de changements.

X.5.a.ii. Imagerie gluCEST

Afin d'explorer davantage les altérations du métabolisme énergétique, l'imagerie gluCEST a été ajoutée au protocole. La figure 77 montre les résultats des niveaux de contraste gluCEST relevés dans différentes régions d'intérêts à 16, 24 et 30 semaines. Aucune différence significative n'est visible entre

les groupes à 16 ou 24 semaines, bien qu'on observe une tendance à la hausse chez les souris SCA7^{140Q/5Q} non traitées, en particulier dans l'hypothalamus, le pallidum et le striatum. A 30 semaines, cette tendance s'efface mais un autre groupe, les souris SCA7^{140Q/5Q} injectées avec un vecteur exprimant un témoin, montre une augmentation significative du contraste gluCEST dans le cortex, l'hypothalamus, le striatum et le pallidum.

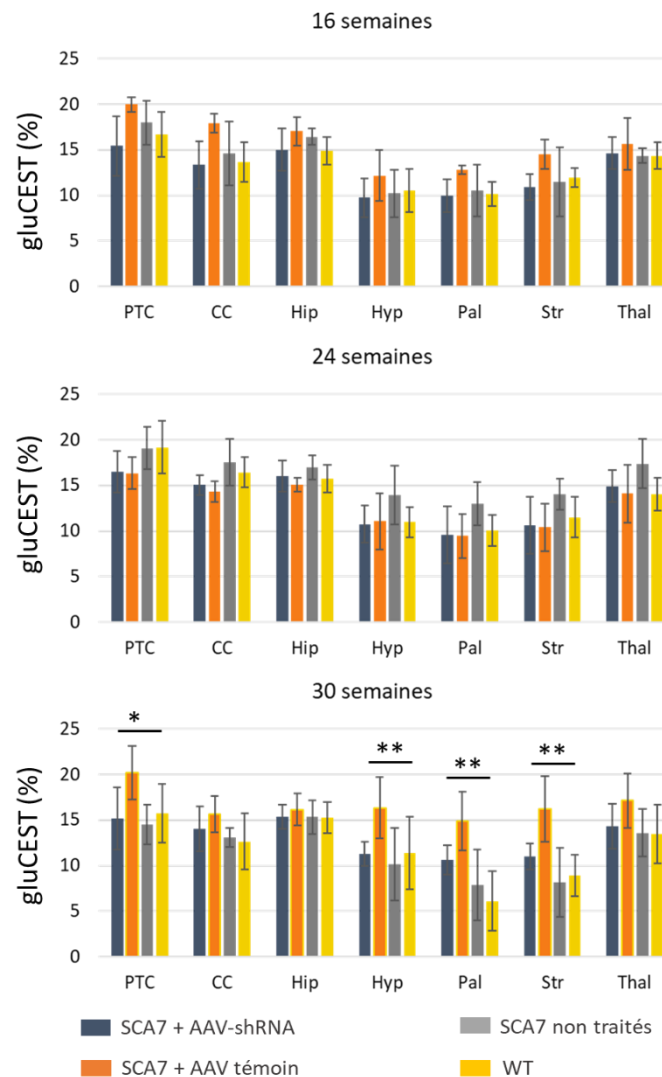


Figure 77 : Résultats de l'imagerie gluCEST dans certaines régions d'intérêt du cerveau de la souris. * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$ (ANOVA à mesures répétées+ Bonferonni). PTC = Cortex Parieto-temporal, CC= Corps calleux, HC= Hippocampe, Hyp= Hypothalamus, Pal= Pallidum, Str= Striatum, Thal= Thalamus.

X.5.b Discussion

Les résultats de spectroscopie RMN montrent une altération marquée du métabolisme, en particulier du cycle glutamine/glutamate chez les souris SCA7^{140Q/5Q} non traitées. Ce cycle dépend des interactions entre neurones et astrocytes, les neurones transformant la glutamine envoyée par les astrocytes en

glutamate, utilisé dans le métabolisme énergétique neuronale. La perturbation de ce cycle peut être indicatrice d'une perte neuronale ou bien d'un changement homéostatique du métabolisme dû par exemple à une réactivité astrocytaire. La perte de NAA totale observée dans le même groupe semble aller dans le sens d'une souffrance ou perte neuronale, tandis que la réduction des marqueurs astrocytaires Ins et Cho contredit l'hypothèse d'une réactivité astrocytaire. Au global ces résultats sont donc sûrement explicables par une réorganisation du métabolisme énergétique lié à une dysfonction ou mort neuronale.

L'injection de vecteurs viraux semble en tous les cas empêcher cette neurodégénérescence. Cependant, la baisse de glutamate observée dans le groupe traité avec un témoin montre une altération du métabolisme chez ces souris qui n'est pas présente chez le groupe traité par shRNA. Cette différence pourrait être le résultat de l'effet de la thérapie, l'extinction de l'ATXN7 permettant au métabolisme de retrouver des concentrations normales de glutamate.

La quantification des métabolites étant normalisée par la valeur de Cr totale mesurée par LCMoDel, cette mesure a également été observée pour vérifier l'absence de différence entre les groupes (figure 76). Bien qu'une modélisation plus complète serait nécessaire à la quantification exacte de la créatine, cette mesure peut être assumée précise dans la mesure où le voxel a bien été placé de façon similaire pour tous les animaux, sans augmenter la fraction de LCR. Aucune différence dans la mesure de la créatine n'est visible à 16 et 24 semaines. En revanche, une réduction est observée chez les souris sauvages à l'âge de 30 semaines. La normalisation par la Cr surestime donc légèrement les résultats pour ce groupe. Il est possible que la différence observée de Ins, NAA et Cho soit donc plus faible que montré, cependant ces altérations étant déjà visibles à 24 semaines, on peut penser qu'elles sont bien présentes.

Etonnamment, l'imagerie gluCEST n'a pas relevé la même différence de glutamate que la spectroscopie RMN dans l'hippocampe des souris modèles d'ASC7. Ces deux techniques se sont pourtant montrées concordantes sur de précédentes études ¹⁴⁶. L'augmentation du contraste gluCEST spécifique aux souris ayant reçu un vecteur exprimant un ARN témoin est également difficile à interpréter d'un point de vue métabolique. Une possibilité pour expliquer cette augmentation et l'absence de différence dans l'hippocampe serait l'entrée en compétition d'un autre effet CEST. En particulier, l'effet APT, sensible au pH des tissus cérébraux, pourrait intervenir (voir chapitre V). Si la conception de l'impulsion de saturation rend la séquence plus spécifique à l'effet CEST du glutamate, une variation très intense du pH pourrait tout de même se faire ressentir.

X.6. L'imagerie du tenseur de diffusion et l'imagerie fonctionnelle ne permettent pas de mettre en évidence d'effet significatif du traitement

X.6.a Résultats

Dans la recherche d'autres biomarqueurs permettant de décrire la pathogénèse dans le modèle SCA7^{140Q/5Q} et l'effet de la thérapie, une séquence d'IRMf à l'état de repos et une séquence d'imagerie du tenseur de diffusion ont été insérés dans le protocole. La figure 78 montre les résultats de l'analyse DL (voir chapitre VII) réalisée à partir des images d'IRMf. L'analyse a d'abord été lancée sur chaque groupe, à chaque session. Les résultats étant similaires, il a été décidé de regrouper toutes les images et de lancer l'analyse sur l'ensemble afin de segmenter plus précisément les régions fonctionnelles. Au total, 13 régions ont été extraites à partir des 20 composantes du DL. Sept de ces régions sont corticales et 6 montrent des constituants des ganglions de la base. Mis à part le cortex piriforme droit et le striatum gauche, toutes les régions sont identifiées bilatéralement. Les régions qui ne montrent pas de bilatéralité ont été écartées de l'analyse car considérées comme étant mal définies. Une analyse comparative de matrice de corrélation a été réalisée sur les autres régions. La corrélation entre chaque région fonctionnelle a été comparée entre les groupes. Aucune différence significative n'est ressortie de cette analyse.

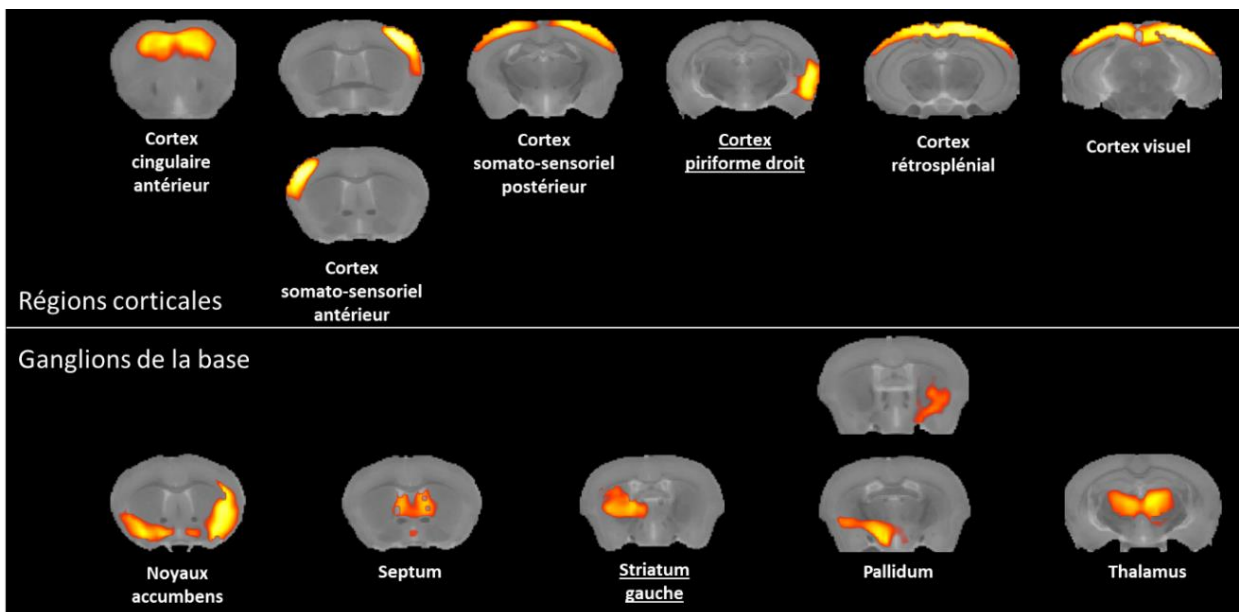


Figure 78 : Régions fonctionnelles extraites de l'analyse DL réalisée à partir de l'ensemble des images d'IRMf à l'état de repos de cette étude. Les régions soulignées ont été écartées de l'analyse car elles ne sont pas bilatérales.

De même, l'imagerie du tenseur de diffusion n'a pas permis de mettre en évidence de différence entre les groupes, quel que soit l'âge des souris. La figure 79 montre les résultats de FA, déterminés par analyse par atlas, dans une sélection de régions d'intérêt. On n'observe aucune différence significative

entre les différents groupes. L'analyse voxel-à-voxel a également été appliquée sans qu'aucun cluster de voxels montrant une différence significative de FA ne soit mis en évidence dans la matière blanche des souris.

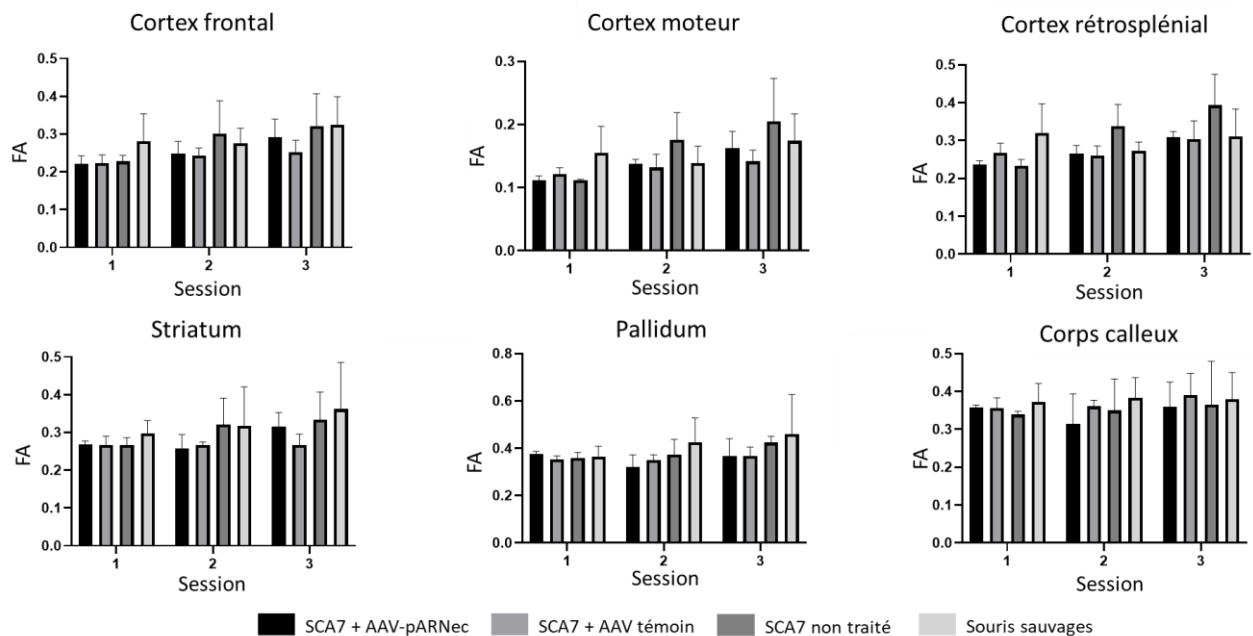


Figure 29 : Anisotropie fractionnelle mesurée dans une sélection de régions d'intérêt à chaque session d'imagerie.

X.6.b Discussion

Les résultats d'IRMf semblent montrer qu'il n'y a pas de perte majeure de connectivité fonctionnelle entre les structures cérébrales identifiées par DL. Il est également possible que la dispersion des valeurs entre sujets et la qualité des données empêchent la détection d'une altération de la connectivité. Cependant, la qualité des régions fonctionnelles extraites par analyse DL et la constance de ce résultat entre deux groupes ou deux sessions distincts montrent une bonne qualité des données. En revanche, il est possible que l'analyse, en se concentrant sur seulement 13 régions, ait manqué certaines perturbations. Plusieurs structures d'intérêt dans ASC7 ne sont pas représentées parmi les régions identifiées, comme le cervelet ou l'hippocampe. L'analyse de la connectivité fonctionnelle dans ces régions pourrait être informative. Pour ce faire, deux approches que nous n'avons pas eu le temps de mettre en œuvre pourraient être tentées. D'une part, l'analyse DL peut être paramétrée avec moins de composantes, dans le but de faire apparaître des réseaux comme le réseau du mode par défaut ou le réseau sensori-moteur qui peuvent faire intervenir l'hippocampe ou le cervelet. Ensuite une seconde analyse DL à l'intérieur de ces réseaux permettrait d'extraire ces régions et d'en mesurer la connectivité fonctionnelle. D'autre part, il est possible d'utiliser un atlas tel que celui utilisé pour la segmentation des images anatomiques pour mesurer la connectivité fonctionnelle des régions

anatomiques. Cependant, cette approche ne permet pas de délimiter précisément les régions activées simultanément comme le propose la méthode employée dans cette étude. Cela conduirait à une dispersion plus importante des valeurs en ajoutant des voxels moins corrélés au signal moyen de la région.

D'une manière générale, cette étude n'a pas permis d'observer d'altération du cervelet dans le modèle SCA7^{140Q/5Q}. Ce résultat est très étonnant quand on le compare à la caractérisation existante du modèle ¹⁴⁵. Il est probable que le positionnement des souris soit responsable de ce résultat non concordant. En effet, le cervelet est une structure très postérieure dans le cerveau de la souris. La configuration utilisée lors de l'acquisition avec l'antenne cryogénique ne permet pas d'avancer l'animal très loin, si bien que le cervelet est situé à plusieurs centimètres de la sonde cryogénique, mais également assez loin du centre de l'aimant (figure 80). Cette structure souffre donc d'inhomogénéités accrues de champ \vec{B}_0 mais aussi de mauvaise calibration de la puissance d'émission B_1 . L'accumulation de ces deux facteurs explique probablement l'absence de résultats pour cette structure. Pour résoudre ce problème, une sonde adaptée serait nécessaire. Cependant, en utilisant une sonde classique, l'apport de rapport signal sur bruit octroyé par la sonde cryogénique serait perdu.



Figure 30 : Coupe sagittale issue de l'image anatomique d'un cerveau de souris de cette étude. On observe la perte de sensibilité dans le cervelet dû à l'éloignement de la sonde (flèche orange).

Cette étude aura néanmoins permis une meilleure caractérisation du modèle SCA7^{140Q/5Q}. L'imagerie anatomique a montré un effet de l'injection de vecteurs viraux sur la perte de volume cérébral, de même que la masse corporelle des souris semble être un biomarqueur de l'efficacité de la thérapie. Pour une raison encore non élucidée, ces effets bénéfiques ont eu lieu également chez les souris injectées avec un AAV exprimant une séquence ARN témoin. La spectroscopie RMN a permis de mettre en évidence une réorganisation métabolique chez les souris SCA7^{140Q/5Q} non traitées en comparaison avec les souris sauvages. L'un des marqueurs de cette réorganisation, une baisse du glutamate de l'hippocampe, est restauré spécifiquement dans le groupe traité avec un shRNA spécifique de l'ATXN7.

En revanche, l'imagerie CEST du glutamate n'a pas été capable de confirmer cette mesure, montrant possiblement une altération du pH dans cette structure. De même, l'imagerie du tenseur de diffusion et l'IRMf ne sont pas parvenus à observer des variations chez les souris modèles d'ASC7. Encore une fois, cela peut être imputé au protocole utilisé qui présente des opportunités d'amélioration. Dans le prochain chapitre, nous nous attarderons sur les possibilités d'optimisation des protocoles utilisés pour cette étude et les précédentes, et proposerons des conseils pour la tenue d'une bonne étude longitudinale.

Chapitre XI: Discussion générale

Ce travail de thèse a eu pour objectif la recherche de biomarqueurs fonctionnels et précoces des maladies à PolyQ à l'aide de méthodes d'imagerie et de spectroscopie RMN. Ce sujet est d'une importance majeure pour comprendre les mécanismes de pathogénèse et pour pouvoir évaluer l'efficacité d'une thérapie administrée au plus tôt dans la progression de la maladie. Ainsi, la suppression de la protéine mutée avant l'apparition des symptômes moteurs offre un espoir de voir les perturbations subtiles du métabolisme et de la microstructure ralenties, voire revenir à la normale dans un processus réversible, au moment où la mort neuronale (par exemple des cellules striatales pour la MH ou des cellules du cervelet pour ASC7) est très peu avancée. L'aspect tardif de l'intervention thérapeutique pourrait possiblement expliquer en partie l'échec du premier essai clinique de phase III d'une thérapie génique visant à réduire l'expression du gène *HTT*⁴¹. En effet, l'intervention ne semble pas avoir conduit à une amélioration des symptômes chez des patients ayant reçu le traitement pendant la phase symptomatique.

De par la richesse des contrastes et des méthodes d'imagerie offerts ainsi que par son côté non-invasif, l'IRM est certainement la modalité la plus prometteuse pour l'identification de biomarqueurs précoces et pertinents dans le cadre des maladies à PolyQ. L'IRM offre une diversité d'utilisations permettant de mesurer non seulement le volume des structures cérébrales, indice communément admis de la progression des maladies à PolyQ^{15,164}, mais également d'autres paramètres contenant une information riche sur le plan fonctionnel. Ainsi, il est possible d'obtenir des marqueurs de la microstructure par imagerie du tenseur de diffusion ou MT, du métabolisme par spectroscopie RMN ou imagerie CEST, ou encore de la connectivité fonctionnelle par IRMf (voir chapitre V). De plus, la caractéristique non-invasive de l'IRM en fait une méthode de choix pour le suivi longitudinal de la progression des maladies à PolyQ chez l'homme et dans les modèles animaux. Dans la recherche de biomarqueurs pertinents des maladies à PolyQ, l'utilisation de modèles devrait permettre l'accélération des études physiopathologiques et des essais thérapeutiques. De plus, au plan méthodologique, la petite taille des cerveaux des modèles rongeurs donne accès à des champs magnétiques ultra-hauts, accordant une sensibilité très élevée associée une homogénéité de champs supérieure à celle des aimants utilisés en recherche clinique. Ainsi, bien que toutes les avancées méthodologiques obtenues chez les petits animaux ne soient pas immédiatement transférables vers des IRM cliniques, elles contribuent à plus ou moins court terme à faire progresser les outils permettant d'étudier le cerveau sain ou malade chez l'homme.

Le projet TreatPolyQ, dans lequel s'est inscrit cette thèse, s'est attaché à développer de nouvelles thérapies avec spécificité allélique pour les maladies à PolyQ, ainsi qu'à les évaluer à l'aide de biomarqueurs mesurés par IRM *in vivo* dans des modèles rongeurs. Dans ce cadre, cette thèse présente les résultats de trois études longitudinales réalisées sur des modèles souris et rat de la MH et d'ASC7. La première étude a permis l'identification d'un réseau vulnérable dans le cerveau de souris CAG140, ainsi qu'une meilleure compréhension de la progression de la pathologie dans ce modèle. Les deux autres études se sont intéressées à l'évaluation de thérapies géniques dans le modèle rat BACHD de la MH et le modèle SCA7^{140Q/5Q}, avec des résultats nuancés. En effet, si les paramètres mesurés ont permis de mettre en évidence des altérations du métabolisme dans ces deux modèles, ces dernières n'ont pas montré la pertinence souhaitée comme biomarqueurs pour l'évaluation de l'efficacité de la thérapie. De plus, l'imagerie du tenseur de diffusion et l'IRMf à l'état de repos ont échoué à déterminer des biomarqueurs permettant de caractériser des atteintes microstructurales ou fonctionnelles dans le modèle SCA7^{140Q/5Q}.

Dans ce chapitre, au regard des résultats positifs et négatifs obtenus au cours de cette thèse, nous allons analyser les améliorations qu'il aurait été possible de mettre en place. Par ailleurs, nous proposons également d'établir une série de préconisations qui pourraient être utiles à de futures études d'IRM longitudinales précliniques qui souhaiteraient s'appuyer sur ce travail.

XI.1. Choix d'un modèle animal

XI.1.a Recherche de biomarqueurs

Comme évoqué dans le chapitre IV, le choix d'un modèle animal pertinent est d'une importance capitale dans la conception d'une étude d'imagerie préclinique. En effet, selon la phase de la maladie et le type de paramètre que l'on souhaite observer, certains modèles seront plus adaptés que d'autres. Dans le cas de la recherche de biomarqueurs précoces des maladies à PolyQ, le modèle utilisé doit présenter une progression lente de la maladie pour que des atteintes structurelles, métaboliques, biochimiques ou fonctionnelles puissent être détectées avant la survenue des symptômes moteurs ou cognitifs. Par ailleurs il est souhaitable d'utiliser des modèles dont la cause première de la neurodégénérescence est induite par une anomalie génétique proche de celle causant la pathologie humaine. Même s'il est actuellement difficile d'écarter la possibilité que la séquence des événements moléculaires conduisant à la pathologie chez l'homme soit assez différente de celle produisant la maladie dans les modèles murins génétiques, une vaste littérature scientifique suggère que de nombreuses déficiences cellulaires et moléculaires communes sont retrouvées chez les patients et les modèles génétiques¹²³. Dans ce contexte, les modèles que nous avons pu étudier récapitulent de manière assez fiable les défauts génétiques des pathologies humaines. Les modèles knock-in

apparaissent comme le modèle le plus pertinent dans ce cas de figure et sont communément admis comme permettant de mimer au mieux les formes tardives des maladies à PolyQ¹³³.

Le modèle CAG140 de la MH présente une espérance de vie normale avec une apparition tardive des symptômes qui permet de suivre la progression de la pathologie de façon longitudinale entre les phases présymptomatique et symptomatique. En effet, la phase de transition semble être primordiale pour bien saisir les premiers signes de l'apparition de la maladie et pour identifier les événements menant à l'expression totale de la maladie. Par ailleurs, la construction génétique, chez les animaux hétérozygotes, est similaire à ce qu'on retrouve chez l'homme, puisque c'est directement l'un des allèles endogènes de la souris qui exprime la forme mutée complète de la protéine. La seule différence tient dans la longueur de l'expansion PolyQ, nécessairement plus élevée chez la souris pour obtenir un phénotype symptomatique dans l'espérance de vie de l'animal. Les animaux homozygotes en revanche développent des symptômes plus rapidement et ne reproduisent pas la version saine de la HTT qui est présente dans la grande majorité des patients, ces derniers étant très rarement homozygotes pour la HTT mutée. Il est donc important d'essayer d'inclure des animaux hétérozygotes. Comme nous le discuterons plus loin, ce modèle présente des particularités IRM, IRMf et MRS qui sont relativement proches de ce qui est observé chez l'homme, lorsque les méthodes sont disponibles en clinique.

Le modèle rat BACHD, utilisé dans la deuxième étude présentée dans le chapitre IX de cette thèse, présente une temporalité toute aussi intéressante que le modèle CAG140. En effet, bien que l'atrophie du striatum soit visible de façon plus précoce chez les rats BACHD, il reste possible de suivre la progression de cette dernière au cours d'une étude longitudinale comme nous l'avons montré. Ce modèle exprime la totalité du gène mutée de la *HTT* humaine par le biais d'un chromosome artificiel bactérien et son promoteur humain. Bien qu'intéressante, cette construction ne modélise pas parfaitement la pathologie humaine, puisque deux allèles expriment toujours l'*htt* endogène de rat. Le niveau d'expression de l'*HTT* mutée est donc relativement faible par rapport à l'*htt* sauvage de rat chez les rat BACHD. Par ailleurs, les travaux initiaux sur ce modèle^{143,214} ont montré que la protéine entière humaine est peu clivée, ce qui conduit à de très faibles niveaux de fragments N-terminaux de l'*HTT* mutée, connus pour être très toxiques dans les autres modèles animaux (notamment les souris R6/2 et R6/1 qui développent la maladie en quelques semaines, voir chapitre IV). La progression de la pathologie est donc lente dans ce modèle génétique chez le rat. Il est possible que la présence de deux allèles d'*htt* sauvage conduise par ailleurs à un effet protecteur, l'*HTT* sauvage ayant des propriétés neuroprotectrices démontrées. Ainsi, ces différences pourraient expliquer qu'une réorganisation du métabolisme apparaisse plus tardivement dans ce modèle par rapport aux modèles rongeurs (R6/1, zQ175 et CAG140 notamment). De ce fait, nos résultats par gluCEST et MRS ont montré l'absence de

modifications métaboliques détectables, à l'exception d'une diminution des concentrations de lactate. Cependant, cette modification des concentrations cérébrales en lactate semble dépendre nettement des conditions expérimentales et dans nos mains reste peu reproductible. En présence d'un agent pharmacologique exogène, l'isoflurane, augmentant la concentration de lactate au moment de la mesure, cette augmentation est moins forte chez les rats BACHD, montrant une certaine perturbation du métabolisme. Chez l'homme, des travaux anciens ont plutôt rapporté des augmentations des concentrations en lactate chez les patients symptomatiques. Ces résultats ont été corroborés par des analyses biochimiques du LCR de patients atteints de la MH. Pourtant plus récemment, les études par MRS n'ont pas retrouvé d'élévation nette des taux de lactate dans le striatum^{165,215}. L'interprétation de nos observations reste donc difficile et leur caractère translationnel discutable. Le modèle rat BACHD n'est donc peut-être pas le modèle le plus adapté à la recherche de biomarqueurs fonctionnels par imagerie. Ce modèle est en revanche plus adéquat pour des études comportementales associant des tests non-moteurs montrant que les rats BACHD présentent des troubles significatifs, comme des déficits « émotionnels » et des modifications de leur interaction sociale²¹⁶⁻²¹⁸).

Le modèle SCA7^{140Q/5Q}, quant à lui, bien que de même construction que le modèle CAG140 de la MH, montre une progression beaucoup plus rapide des symptômes. Ainsi, dès la première session d'imagerie à l'âge de 16 semaines, on observe des structures atrophiées et des concentrations de métabolites altérées chez les souris non traitées. Une session d'imagerie plus précoce serait la bienvenue dans une future étude longitudinale pour observer l'âge auquel se développent ces perturbations. Tels quels, nos résultats ne permettent pas de dire que le modèle SCA7^{140Q/5Q} est un bon modèle de la phase présymptomatique. La question de l'âge d'administration d'une thérapie en est complexifiée. Si dans notre étude la thérapie utilisée semble avoir un effet bénéfique sur les souris traitées, il reste à discerner les effets de la thérapie en elle-même des effets de l'injection d'un vecteur viral, les animaux recevant un traitement témoin montrant les mêmes effets bénéfiques.

XI.1.b Essais thérapeutiques

La question de l'adéquation des modèles expérimentaux se pose également pour les recherches sur les thérapies géniques avec spécificité allélique visant à ralentir la progression des maladies à polyQ chez les patients. La stratégie principale pour atteindre la spécificité allélique est l'utilisation de polymorphismes d'un seul nucléotide. En raison de la nature héréditaire des maladies à PolyQ, de larges proportions de patients présentent les mêmes haplotypes pour leur allèle muté. Les thérapies développées dans le projet TreatPolyQ reposent sur ces haplotypes pour concevoir des ASO et shRNA spécifiques des formes mutées de la HTT, de l'ATXN7 ou de l'ATXN3. Cependant, dans le but de tester ces thérapies, leur spécificité et leur efficacité *in vivo* dans un modèle murin, il est nécessaire que ce

dernier présente les mêmes haplotypes que les patients. Un modèle souris récent, issu du croisement de souris YAC128, souris BAC21 et souris KO htt, nommé Hu128/21, a été conçu pour répondre à ce besoin^{219,220}. Ce modèle n'exprime plus de version endogène de la htt, mais plutôt deux allèles humains de la HTT entière, l'un sain (21 CAG) et l'autre muté (128 CAG). Les tests moteurs et comportementaux réalisés sur ces souris montrent une apparition progressive des symptômes, certains paramètres montrant une différence dès l'âge de 2 mois. Ce modèle est donc adapté à la recherche de biomarqueurs de la phase présymptomatique, même si la production des souris transgéniques est fastidieuse. Il serait très pertinent de l'inclure dans une étude longitudinale d'imagerie pour tester des thérapies possédant une sélectivité allélique.

XI.2. Contrôle des conditions expérimentales

Une fois le modèle animal adéquat choisi, il est important de bien contrôler les conditions expérimentales, dans l'hébergement et dans la conception de l'étude. Nos résultats ont montré que des contraintes obligeant à modifier les conditions expérimentales avaient un effet non-négligeable voire majeur sur l'interprétation des résultats. Dans la mesure du possible, il est donc nécessaire de bien appréhender ces conditions pour réduire la dispersion des mesures et offrir des résultats plus reproductibles.

XI.2.a Conditions d'hébergement

Les animaux doivent être hébergés dans le respect de toutes les normes en vigueur et du principe des 3R (remplacement, raffinement, réduction). Comme évoqué tout au long de cette thèse, la complexité des mécanismes de neurodégénérescence dans les maladies à PolyQ rend les modèles animaux difficilement remplaçables dans ce contexte. Le principe de raffinement concerne tout ce qui touche à la méthodologie d'expérimentation, dans l'élevage comme dans les protocoles en eux-mêmes. Il consiste à optimiser le bien-être animal et obtenir le plus possible d'informations à partir des expérimentations. Ce principe est non seulement un impératif éthique mais permet également lorsque bien appliqué d'accroître la pertinence et la reproductibilité des résultats.

L'optimisation du bien-être animal dans les conditions d'hébergement inclue notamment la mise en place d'un cycle jour/nuit dans l'éclairage de la pièce d'hébergement, l'enrichissement du milieu avec des matériaux de nidification et la répartition des animaux dans le respect de leur nature grégaire et de l'espace minimal nécessaire pour chaque animal.

Deux points sont à considérer avec une attention particulière d'après notre expérience. Le premier est la mise en place de critères d'exclusions, aussi appelés points-limites, au-delà desquels les animaux souffrant trop sont exclus du protocole expérimental pour être euthanasiés. Cette mesure est très

importante pour le bien-être animal mais également pour éviter d'inclure dans les résultats des biais dus à la mauvaise santé d'un animal. Ces critères d'exclusions peuvent inclure :

- Perte de poids supérieure à 10% de la masse corporelle de l'animal.
- Score faible de bien-être basé sur une échelle prédéfinie prenant en compte plusieurs critères comme le poids, la mobilité, la propreté, etc.
- La domination d'un animal sur les autres. Ce phénomène récurrent est à surveiller car une souris dominée peut perdre en mobilité, en masse, etc.

Le second point à bien considérer est le régime alimentaire des animaux. En effet, les rats ou certains modèles souris de laboratoire ont tendance à prendre beaucoup de poids au cours de leur vie, par rapport à des conditions éthologiques où l'accès à la nourriture est très souvent un défi. Cela peut avoir des effets indésirables sur la reproductibilité des résultats et la comparaison avec les animaux témoins. De plus, chez les rats, notre expérience a montré que cette prise de poids pouvait poser souci pour l'imagerie, les rats devenant trop gros pour passer dans l'aimant. La contention des rats pour les faire entrer dans l'appareil peut alors gêner leur respiration. La solution trouvée a été de mettre en place un régime avec accès limité à la nourriture. Cependant ce régime a été instauré au milieu de l'étude et a certainement provoqué des perturbations du métabolisme. Pour les futures études incluant de l'imagerie du rat, nous recommandons donc la mise en place d'un régime préalablement à la première session d'imagerie et tout au long de la vie de l'animal. Ce régime devrait être partagé par tous les animaux inclus dans l'étude. Enfin, la masse corporelle des animaux devrait être mesurée de façon hebdomadaire, pour surveiller la prise de poids des animaux mais également afin de pouvoir appliquer le point limite décrit plus haut lors d'une perte de 10% de la masse corporelle.

[XI.2.b Conditions expérimentales](#)

Le troisième principe des 3R, la réduction, consiste à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisé pour parvenir à des résultats concluants. Cela signifie bien sûr ne pas décupler le nombre d'animaux inclus dans le protocole de façon superflue, mais également ne pas sous-estimer ce nombre. En effet, si la population de l'étude est insuffisante, celle-ci risque de ne pas atteindre la puissance statistique nécessaire au franchissement du seuil de significativité des effets observés. Le nombre d'animaux inclus dans une étude doit donc être considéré en prenant en compte deux paramètres :

- La dynamique de l'effet observé. Si la mesure d'intérêt présente une faible différence entre deux groupes, il est nécessaire d'augmenter le nombre d'animaux inclus dans l'étude pour arriver à une conclusion.

- La dispersion des valeurs mesurées. Si la mesure engendre un écart-type très élevé, il sera nécessaire également d'accroître la population afin de pouvoir conclure.

Dans le contexte des maladies à PolyQ, une caractéristique importante à appréhender est donc l'âge des animaux lors des sessions d'imagerie. En effet, nous avons pu observer au cours de cette thèse que la dynamique des effets mesurés est très dépendante de l'âge et de l'état de progression de la pathologie chez les animaux. Afin d'évaluer au mieux le nombre d'animaux à inclure dans une étude, il est conseillé de réaliser un calcul de puissance statistique, à partir de données préliminaires ou trouvées dans la littérature. Ce calcul peut être réalisé à l'aide d'outils en ligne tel que BioStatGV (<https://biostatgv.sentiweb.fr/>).

Une autre condition qui a posé problème au cours de cette thèse est l'anesthésie utilisée. L'anesthésie est nécessaire au bon déroulement des examens IRM et également pertinente d'un point de vue du bien-être animal. Cependant, elle induit nécessairement des variations dans le métabolisme cérébral et une variabilité inter-individuelle due à des réponses différentes des animaux à l'anesthésique qu'il est nécessaire de bien considérer. Dans la mesure du possible, il est important de garder une anesthésie constante entre les animaux. Cependant, deux animaux peuvent avoir un rythme respiratoire totalement différent avec la même dose d'anesthésie. Dans ce cas, on privilégiera de modifier légèrement l'anesthésie pour obtenir des valeurs comparables des paramètres physiologiques. Cela est également applicable à la température de chauffage pour maintenir la température corporelle des animaux à 37°C.

L'anesthésie principalement utilisée en IRM est l'inhalation d'isoflurane. Cette méthode robuste permet de maintenir un animal endormi pendant 2h sans soucis et sans qu'il ne montre trop de difficultés à se réveiller. De plus la possibilité d'ajuster très rapidement la concentration d'isoflurane envoyée dans le masque de l'animal en fait une méthode versatile. Cependant, l'isoflurane est un vasodilatateur qui ne convient pas à la mesure de certaines modalités comme l'IRMf. De plus, il a été montré que cet anesthésique perturbe largement le métabolisme cérébral, en augmentant par exemple la concentration de lactate chez le rat ²¹¹.

Une alternative robuste à l'anesthésie par inhalation d'isoflurane est l'utilisation de médétomidine par injection sous-cutanée ou intraveineuse. Cet anesthésique permet de garder l'animal dans un état de sédation léger, avec un rythme respiratoire à peine ralenti, qui se rapproche de l'état de repos recherché en IRMf. C'est pourquoi nous l'avons utilisé lors de l'étude sur les souris SCA7^{140Q/5Q} (chapitre X). Cependant, l'utilisation de cet anesthésique seul présente des risques de mouvements des souris, c'est pourquoi nous avons choisi dans notre protocole d'utiliser une petite concentration d'isoflurane. Notre protocole, décrit dans le chapitre X, a montré une robustesse de l'anesthésie et nous a permis

d'approcher l'état de repos au moment de l'acquisition de la séquence d'IRMf. En revanche, l'enchaînement sur la séquence DTI a mené à des artefacts de mouvement importants sur les images issues de cette séquence. Nous recommandons, si cela est compatible avec la durée de la session d'imagerie, de laisser un temps d'attente d'une dizaine de minutes avec augmentation de la concentration d'isoflurane entre la séquence d'IRMf et la séquence suivante qui demande une stabilité de l'animal.

Enfin, il est à mentionner que le cycle circadien des animaux et la régularité de l'expérimentateur dans la manipulation des animaux entre deux journées sont à prendre en compte pour la conception de l'étude d'imagerie. Ainsi, selon l'heure de la journée et entre deux journées, la mesure d'un paramètre, notamment métabolique, peut varier. Afin de ne pas induire de biais systématique dans les résultats d'une étude, il est donc important de mettre en place un ordre de passage des animaux à l'IRM qui alterne et permette de moyenniser cet effet sur l'ensemble de la cohorte.

XI.3. Protocole d'imagerie

Ce travail de thèse aura également été instructif sur le plan du protocole d'imagerie à utiliser. Le protocole d'une étude longitudinale doit être optimisé pour obtenir un bon compromis entre le nombre de paramètres mesurés, la qualité des données et le temps d'acquisition par animal, qui régit nécessairement le nombre d'animaux qui pourront être inclus dans l'étude.

XI.3.a Qualité d'image anatomique

La première et indispensable séquence à implémenter dans une session d'imagerie et l'imagerie anatomique. L'image anatomique doit impérativement couvrir l'intégralité du cerveau et fournir un contraste suffisant pour permettre un bon recalage automatique des cerveaux. Un bon shim est également important afin de réduire au maximum les inhomogénéités du champ B_0 dans le cerveau, pour l'image anatomique comme pour les séquences suivantes.

Sur cet aspect, un détail est à mentionner car problématique dans nos études sur les modèles souris. La sonde cryogénique utilisée présente l'énorme intérêt d'offrir un gain en SNR de l'ordre d'un facteur 3 par rapport à notre meilleure configuration d'antennes souris à température ambiante, à savoir transmission volumique et réception surfacique. Ce gain est colossal car il peut être utilisé pour améliorer la résolution des images et/ou réduire le temps d'acquisition. Toutefois, cette antenne a le désavantage d'être une antenne surfacique, ce qui provoque une inhomogénéité de la puissance délivrée par la sonde selon la profondeur des tissus. Une bonne calibration de la puissance est donc indispensable à l'obtention d'une image homogène, en particulier pour l'imagerie CEST où le contraste dépend de l'intensité B_1 de l'impulsion de saturation des protons labiles. Cependant, même après une

calibration appropriée, les images anatomiques acquises durant cette thèse ont montré une zone d'ombre dans la partie supérieure du cortex, correspondant à une saturation des spins due à une puissance délivrée trop importante. Cette zone d'ombre a engendré des déformations du cerveau durant la segmentation automatique, et le recalage aurait pu être plus précis en s'en affranchissant. Pour s'en débarrasser, nous ne pouvons conseiller de changer d'antenne pour une antenne volumique tant le gain de sensibilité octroyé par la sonde cryogénique est important. Une solution possible serait alors de changer de séquence anatomique pour une délivrant moins de puissance qu'une séquence écho de spin, telle que la séquence d'écho de gradient. Cependant cette dernière est plus sensible aux inhomogénéités de B_0 , il faudrait donc s'assurer que la qualité du shim est suffisante pour obtenir une image de qualité.

XI.3.b Autres modalités

Les résultats des études présentés dans cette thèse ont pointé du doigt plusieurs axes d'améliorations des séquences utilisées pour mesurer des paramètres liés au métabolisme ou à la microstructure des tissus cérébraux. Ces optimisations vont être détaillées ci-dessous pour les futures études qui voudraient s'appuyer sur ce travail.

XI.3.b.i. Imagerie du tenseur de diffusion

Nous avons déjà évoqué la qualité mitigée des images issues de la séquence d'imagerie du tenseur de diffusion utilisées dans les deux études sur les modèles souris CAG140 de la MH et SCA7^{140Q/5Q}. Cette séquence s'est révélée très sensible aux artefacts de mouvement, c'est pourquoi nous conseillons de s'assurer que l'animal soit profondément endormi pour cette acquisition. Cependant, malgré une anesthésie à l'isoflurane, des artefacts de rémanence sont toujours visibles sur les images acquises sur le modèle CAG140. Il a été nécessaire d'appliquer un seuil de ratio contraste-sur-bruit aux images afin d'éliminer celles de moins bonne qualité, ce qui a diminué la puissance statistique de notre étude. La raison probable de la présence de ces artefacts est la façon dont la séquence EPI parcourt l'espace k . La lecture se fait en effet en zig-zag, avec un sens de lecture inversé entre chaque ligne. Cela conduit à une différence de phase entre les lignes paires et impaires, qui mène à l'apparition d'une image décalée de $N/2$, où N est le nombre de voxel par ligne²²¹. Ces artefacts sont appelés artefacts de Nyquist et sont principalement dus aux courants de Foucault induits par le changement rapide d'orientation des gradients. L'augmentation du nombre de segments de l'espace k divisant l'acquisition EPI permet de s'affranchir des artefacts de distorsion communément générés par les séquences EPI simple segment. Cependant, cela augmente également la fréquence d'alternance des gradients, accentuant par la même occasion les courants de Foucault. Le nombre de 8 segments utilisé

dans notre protocole est certainement trop élevé et il serait pertinent de réduire ce nombre lors de futures études, tout en contrôlant l'apparition d'artefacts de distorsion.

Il est également possible de corriger les images acquises par EPI pour compenser cette différence de phase. Pour cela, il est nécessaire d'ajouter au début de la séquence deux acquisitions de l'espace k , sans pondération en diffusion, avec des directions d'encodage de phase opposées. Le décalage de phase est ainsi calculé dans les deux directions et pris en compte dans la reconstruction de l'image. Les fonctions FSL *topup* et *eddy* permettent de corriger les artefacts de Nyquist à partir de ces deux images à directions d'encodage de phase opposées.

XI.3.b.ii. Imagerie CEST

La séquence gluCEST utilisée chez la souris a donné des résultats concluants et ne semble pas nécessiter d'optimisation. La correction des inhomogénéités par méthode WASSR a tout à fait rempli son office et devrait être incluse dans tout protocole comportant une séquence CEST. En revanche, la séquence utilisée chez les rats BACHD n'a pas permis de conclure. Comme évoqué dans le chapitre IX, il serait intéressant à l'avenir d'optimiser la séquence sur un nombre réduit de coupes afin d'augmenter le rapport signal-sur-bruit.

Une autre piste d'amélioration pour l'imagerie CEST serait l'utilisation de la modélisation afin d'obtenir une valeur quantitative de la concentration de l'agent CEST. La séparation des effets de saturation directe, d'effet CEST et de MT a été réalisée sur des Z-spectra *in vivo*²²². Cette méthode requiert cependant l'acquisition d'une cartographie T_1 et T_2 du cerveau afin de modéliser au mieux le comportement des équations de Bloch-McConnell. C'est une nouvelle fois un compromis à trouver entre temps d'acquisition et pertinence de l'information de concentration de l'agent CEST.

Enfin, dans le contexte de la recherche de biomarqueurs de maladies neurodégénératives, il convient de ne pas perdre de vue que les séquences utilisées doivent pouvoir être utilisées sur des aimants cliniques, proposant un champ moins élevé que l'appareil utilisé au cours de cette thèse. La condition pour imager l'effet CEST d'une molécule est que son taux d'échange soit inférieur au déplacement chimique de cet agent par rapport à l'eau libre. Le déplacement chimique étant dépendant de l'intensité de B_0 , l'utilisation d'un champ clinique ne respecte pas obligatoirement cette condition. Dans le cas de l'imagerie gluCEST, une IRM 7T clinique sera ainsi nécessaire. Les études souhaitant inclure l'imagerie CEST d'autres agents devraient prêter attention à cette limite.

I.1.a.i. IRM fonctionnelle

Enfin, la séquence d'IRMf utilisée permettrait elle aussi quelques optimisations. Tout d'abord, une résolution anisotrope a été utilisée. Ce type de géométrie génère nécessairement des calculs

supplémentaires lors de l'étape de recalage, qui sont sources d'erreurs. Une géométrie isotrope des voxels est à prioriser dans toutes les séquences qui sont susceptibles d'être soumises à un procédé de segmentation automatique.

Quant au traitement des images d'IRMf, une problématique importante de l'analyse de connectivité fonctionnelle à l'état de repos est que le rapport signal-sur-bruit est plus faible qu'avec un protocole d'IRMf avec stimulation. En particulier, le bruit physiologique, défini comme des fluctuations de contraste BOLD non liées à un afflux sanguin cérébral mais à des variations périphériques comme le rythme respiratoire ou cardiaque, peut être corrigé. Pour cela, une technique consiste à analyser les fréquences présentes dans la matière blanche ou le liquide céphalo-rachidien et à filtrer ces fréquences sur le reste du cerveau. Dans notre cas, nous avons seulement appliqué un masque pour retirer ces régions peu vascularisées de l'analyse DL. Le sujet de l'analyse de la connectivité fonctionnelle sur des images d'IRMf à l'état de repos est en plein développement. Plusieurs approches récentes n'ont pas pu être développées dans ce manuscrit et le lecteur est redirigé vers la récente revue de Johnson et Gregory (2019) pour une description exhaustive de ce qui existe.

1.2. Conclusion

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont permis d'identifier plusieurs axes d'amélioration et de proposer des recommandations pour une étude longitudinale d'imagerie avec essai de thérapie génique. Ces suggestions peuvent être regroupées autour de 4 axes auxquels l'expérimentateur devrait prêter attention : le modèle animal, le protocole d'imagerie, la thérapie et les conditions d'expérimentations. La figure 81 récapitule ces recommandations autour de ces 4 axes et propose le déroulé temporel idéal d'une étude longitudinale théorique. Cette étude, qui aurait pour objectif l'évaluation d'une thérapie génique avec spécificité allélique, impliquerait une thérapie directement transférable à l'homme. Le modèle utilisé serait donc un modèle humanisé hétérozygote, qui montre une progression des symptômes qui deviennent visibles aux alentours de 6 mois. Par la suite, une session d'imagerie tous les 3 mois jusqu'à l'âge d'un an semble une bonne fréquence pour le suivi de la progression de la pathologie. Le protocole inclurait une session d'imagerie à un stade précoce qui servirait de ligne de base aux observations mesurées par la suite. L'injection du traitement se ferait également de façon précoce avant l'apparition des symptômes pour un blocage plus efficace des mécanismes de pathogénèse. Le protocole inclurait obligatoirement une image anatomique haute résolution, puis des séquences de spectroscopie RMN ou gluCEST pour l'imagerie du métabolisme, DTI pour l'évaluation de la microstructure ou IRMf pour l'aspect fonctionnel, en fonction des caractéristiques déjà connues du modèle utilisé. Le protocole d'anesthésie serait adapté aux séquences incluses dans le protocole. Le nombre d'animaux utilisé aurait été calculé au préalable via

un calcul de puissance statistique et le régime alimentaire des animaux bien défini au préalable. Tout au long de l'étude, un suivi du poids des animaux permettrait d'identifier les animaux à exclure de l'étude. Ainsi, lors de l'analyse des images, ces dernières montreraient une dispersion plus faible. Le post-traitement des images inclurait une segmentation automatique basée sur l'imagerie anatomique haute-résolution, une correction des artefacts des images DTI, une correction des inhomogénéités de champ pour l'imagerie CEST et des traitements des images IRMf à l'état de l'art. En suivant l'ensemble de ces recommandations, une telle étude permettrait certainement d'arriver à des conclusions quant à l'efficacité de la thérapie au niveau du fonctionnement cellulaire. La translation de cette thérapie et de ce protocole d'imagerie en clinique pourrait alors permettre de faire un pas de plus vers un traitement efficace des maladies par expansion de polyglutamine.

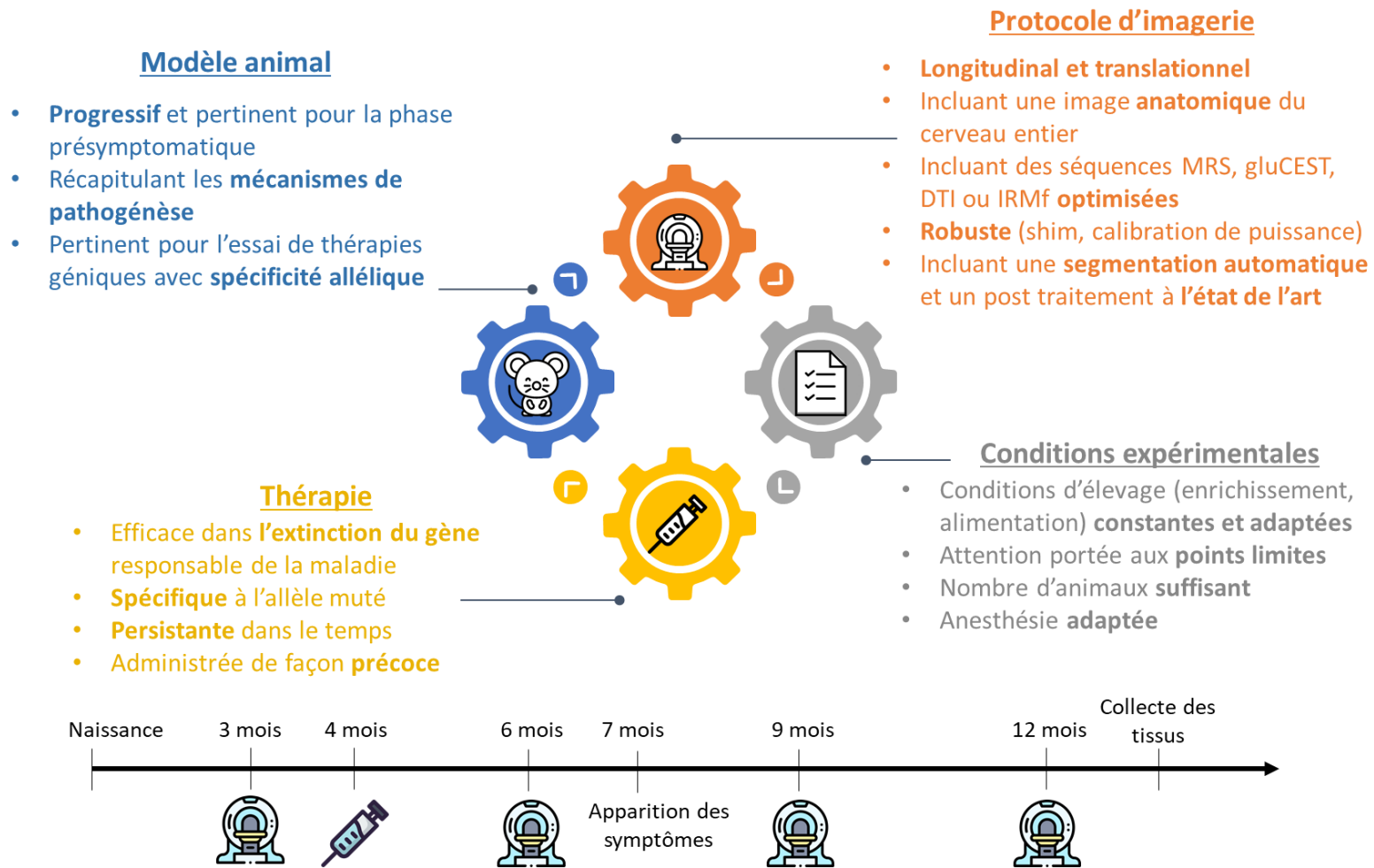


Figure 81 : Figure récapitulative des recommandations apportées dans ce chapitre pour une étude longitudinale d'imagerie idéale. La frise chronologique présente un exemple de déroulé temporel d'une étude théorique permettant la l'observation de mécanismes de pathogénèse et l'évaluation d'une thérapie en suivant ces recommandations.

Conclusion générale

Les maladies à PolyQ sont des maladies neurodégénératives héréditaires pour lesquelles il n'existe à ce jour aucun traitement pour retarder de manière efficace l'apparition des symptômes et la progression de la maladie. Ces maladies causées par l'expansion de répétitions CAG sur un gène codant pour une protéine partagent certaines caractéristiques dont une longue phase durant laquelle les patients ne montrent aucun signe clinique. Bien que les progrès en thérapie génique aient récemment permis l'extinction efficace du gène en cause dans certaines maladies à PolyQ comme la MH, le récent échec d'une étude clinique de phase III sur un ASO ciblant la HTT administré à des patients symptomatiques de la MH montre la nécessité de traiter de façon plus précoce. Cependant, l'évaluation de thérapies administrées durant la phase présymptomatique se heurte au manque de marqueurs de la maladie. La recherche de biomarqueurs non-invasifs capables de décrire la progression de la pathologie durant cette phase est un enjeu majeur pour l'évaluation de thérapies géniques.

Le projet TreatPolyQ qui a financé cette thèse a pour objectif le développement de nouvelles thérapies génique avec spécificité allélique pour les maladies à PolyQ. La spécificité allélique est en effet d'une importance majeure au vu des fonctions cellulaires de la HTT ou des protéines impliquées dans les autres maladies à PolyQ. L'extinction spécifique de la forme mutée de ces protéines, bloquant les mécanismes pathologiques de toxicité cellulaire et de dérégulation transcriptomique, tout en maintenant les fonctions endogènes de leur forme sauvage représente aujourd'hui le meilleur espoir de thérapie.

De nombreux modèles rongeurs ont été développés dans l'objectif de comprendre les mécanismes menant à la dégénérescence dans les maladies à PolyQ et de pouvoir évaluer l'efficacité de thérapies. Les modèles utilisés dans cette thèse ont été sélectionnés pour leur aspect progressif dans l'apparition des symptômes, faisant d'eux des modèles pertinents pour l'étude de la phase présymptomatique. Les modèles CAG140 de la MH et SCA7^{140Q/5Q} ont ainsi été choisis pour leur construction « knock-in » qui permet d'imiter au mieux les pathologies. Le modèle rat BACHD quant à lui a été sélectionné pour poursuivre les travaux de la thèse de Jérémy Pépin montrant une dérégulation du métabolisme chez ces rats par IRM gluCEST et spectroscopie RMN.

L'imagerie par résonance magnétique est une technique d'imagerie non invasive qui est déjà utilisée en routine en clinique pour mesurer le volume de structures cérébrales dans le suivi de la progression des maladies à PolyQ. La recherche de biomarqueurs fonctionnels et précoces de ces maladies peut

également s'appuyer sur d'autres utilisations de cette technique comme la spectroscopie RMN, l'IRM fonctionnelle, gluCEST, MT ou encore de diffusion. Sans perdre de vue la finalité clinique de ces modalités, leur application à des modèles précliniques est très pertinente pour la caractérisation de ces derniers, l'étude de mécanismes pathologiques, et l'évaluation *in vivo* de thérapies géniques.

Dans ce cadre, l'objectif de ce travail de thèse a été l'étude de biomarqueurs précoces des modèles précliniques des maladies à PolyQ par IRM et RMN *in vivo*. La méthodologie employée a été de réaliser des études longitudinales d'imagerie multiparamétrique sur les modèles sélectionnés. Un aspect non négligeable de ce travail a ainsi été de mettre au point le protocole de ces études, incluant les conditions d'hébergement des animaux, le protocole expérimental et le traitement des images. Ce dernier point en particulier a nécessité l'adaptation des outils de segmentation déjà existants et a donné fruit à un procédé de segmentation des images gluCEST et DTI qui sera utilisé par les futurs doctorants du laboratoire.

La première étude présentée dans ce manuscrit a permis de poursuivre la caractérisation du modèle CAG140 de la MH et de mettre en évidence la vulnérabilité de la matière blanche dans ce modèle. L'analyse volumétrique des cerveaux des souris CAG140 hétérozygotes a confirmé sa pertinence pour la modélisation de la phase présymptomatique de la maladie. L'imagerie gluCEST a permis d'exposer une défaillance des projections cortico-striatales. L'intégration des informations volumiques, métaboliques et microstructurales de notre étude semble souligner la vulnérabilité de la matière blanche et plus particulièrement de la voie glutamatergique cortico-striato-thalamique.

Afin de compléter les résultats précédemment obtenus durant la thèse de Jérémy Pépin, un essai thérapeutique d'un ASO spécifique de la HTTm humaine a été réalisé sur le modèle rat BACHD. L'IRM anatomique longitudinale a montré l'efficacité de l'ASO pour secourir la perte de volume du striatum, du cortex et du corps calleux mesurée chez les rats BACHD, en lien une réduction importante d'un fragment de HTTm chez les rats traités. En revanche, les résultats d'imagerie CEST et de spectroscopie RMN ont montré qu'un meilleur contrôle des conditions expérimentales était nécessaire pour la recherche de biomarqueurs fonctionnels.

La dernière étude montrée dans ce travail de thèse porte sur un essai thérapeutique par shRNA dans le modèle SCA7^{140Q/5Q}. Elle aura permis une meilleure caractérisation de ce modèle par imagerie anatomique, DTI, gluCEST, fonctionnelle et spectroscopie RMN. Nos résultats ont pu montrer un effet de l'injection de vecteurs viraux sur la perte de volume cérébral et la réorganisation du métabolisme dans l'hippocampe, bien que la nature de ces effets bénéfiques soit encore à élucider. Cette étude a également pointé du doigt certaines améliorations possibles dans notre protocole.

Publications scientifiques

Les travaux réalisés durant cette thèse ont fait l'objet de plusieurs publications scientifiques. Un article sur les résultats de la première étude sur le modèle CAG140 de la MH est en cours de révision dans la revue *Human Molecular Genetics* (1^{er} auteur). L'analyse des cerveaux *ex vivo* des cerveaux de souris SCA7^{140Q/140Q} et SCA7^{140Q/5Q} ont contribué à un article paru dans *Journal of Neuroscience* ¹⁴⁵(3^e auteur). Une analyse similaire de cerveaux d'un modèle souris d'ASC3 a également contribué à un article paru dans *Frontiers in Molecular Neuroscience* ²²³(3^e auteur). Enfin, l'application des procédés de segmentation développés au cours de cette thèse a apporté une aide dans un article publié par notre équipe au laboratoire ²²⁴ (4^e auteur).

Communications orales

De plus, l'étude sur les souris CAG140 a été le sujet de plusieurs communications orales en tant que premier auteur dans des conférences internationales à l'ISMRM 2020 (Prix Magna Cum Laude), à la conférence CEST2020, à l'ISMRM 2021 (Prix Summa Cum Laude et 3^e prix d'oral du *White Matter Study Group*) ainsi qu'à la SFRMBM 2021.

En définitive, le travail présenté dans cette thèse aura montré la pertinence de l'IRM longitudinale et multiparamétrique pour la recherche de biomarqueurs précoces dans les modèles précliniques des maladies à PolyQ. Nos résultats ont permis une meilleure compréhension des mécanismes de pathogénèse dans le modèle CAG140 de la MH, et ont mis en lumière la vulnérabilité de la matière blanche dans le processus dégénératif. Dans le modèle rat BACHD, l'étude longitudinale a permis de conclure à l'efficacité d'une thérapie spécifique de la forme mutée de la HTT. Nous avons également pu poursuivre la caractérisation du modèle SCA7^{140Q/5Q} et montrer un effet bénéfique de l'injection de vecteurs viraux dans ce modèle. Finalement, l'expérience acquise au cours de ces trois études, dans leur conception, la mise en œuvre des protocoles expérimentaux, et l'analyse des données, a permis de proposer dans le dernier chapitre des préconisations et des améliorations des protocoles que nous avons utilisés. Nous espérons que ce travail permettra d'obtenir des résultats concluants, reproductibles et translationnels pour la recherche de biomarqueurs et l'essai de thérapies dans les maladies à PolyQ et dans d'autres pathologies.

Références bibliographiques

1. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. The Huntington's Disease Collaborative Research Group. *Cell* **72**, 971–983 (1993).
2. Zoghbi, H. Y. & Orr, H. T. Glutamine repeats and neurodegeneration. *Annu. Rev. Neurosci.* **23**, 217–247 (2000).
3. Myers, R. H. Huntington's disease genetics. *NeuroRX* **1**, 255–262 (2004).
4. Abou-Sleymane, G. & Trottier, Y. Maladies par expansion de polyglutamine: Avancées récentes et perspectives thérapeutiques. 16.
5. Andrew, S. E. *et al.* The relationship between trinucleotide (CAG) repeat length and clinical features of Huntington's disease. *Nat. Genet.* **4**, 398–403 (1993).
6. Duyao, M. *et al.* Trinucleotide repeat length instability and age of onset in Huntington's disease. *Nat. Genet.* **4**, 387–392 (1993).
7. Quarrell, O. W. J. *et al.* Reduced penetrance alleles for Huntington's disease: a multi-centre direct observational study. *J. Med. Genet.* **44**, e68 (2007).
8. Quarrell, O. W. J. *et al.* Managing juvenile Huntington's disease. *Neurodegener. Dis. Manag.* **3**, (2013).
9. Bates, G. P. *et al.* Huntington disease. *Nat. Rev. Dis. Primer* **1**, 1–21 (2015).
10. Ghosh, R. & Tabrizi, S. J. Chapter 17 - Huntington disease. in *Handbook of Clinical Neurology* (eds. Geschwind, D. H., Paulson, H. L. & Klein, C.) vol. 147 255–278 (Elsevier, 2018).
11. Unified Huntington's Disease Rating Scale: reliability and consistency. Huntington Study Group. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* **11**, 136–142 (1996).
12. Ross, C. A. *et al.* Huntington disease: Natural history, biomarkers and prospects for therapeutics. *Nat. Rev. Neurol.* **10**, 204–216 (2014).

13. Reilmann, R. & Schubert, R. Chapter 18 - Motor outcome measures in Huntington disease clinical trials. in *Handbook of Clinical Neurology* (eds. Feigin, A. S. & Anderson, K. E.) vol. 144 209–225 (Elsevier, 2017).
14. Paulsen, J. S. *et al.* Detection of Huntington's disease decades before diagnosis: the Predict-HD study. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **79**, 874–880 (2008).
15. Tabrizi, S. J. *et al.* 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 (2013).
16. Peavy, G. *et al.* Cognitive and functional decline in Huntington's disease: dementia criteria revisited. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* **25**, 1163–1169 (2010).
17. Stout, J. C. *et al.* Neurocognitive signs in prodromal Huntington disease. *Neuropsychology* **25**, 1–14 (2011).
18. Paoli, R. A. *et al.* Neuropsychiatric Burden in Huntington's Disease. *Brain Sci.* **7**, (2017).
19. Berrios, G. E. *et al.* Psychiatric symptoms in neurologically asymptomatic Huntington's disease gene carriers: a comparison with gene negative at risk subjects. *Acta Psychiatr. Scand.* **105**, 224–230 (2002).
20. van Duijn, E. *et al.* Cross-sectional study on prevalences of psychiatric disorders in mutation carriers of Huntington's disease compared with mutation-negative first-degree relatives. *J. Clin. Psychiatry* **69**, 1804–1810 (2008).
21. Moseley, M. L. *et al.* Incidence of dominant spinocerebellar and Friedreich triplet repeats among 361 ataxia families. *Neurology* **51**, 1666–1671 (1998).
22. Holmberg, M. *et al.* Localization of autosomal dominant cerebellar ataxia associated with retinal degeneration and anticipation to chromosome 3p12-p21.1. *Hum. Mol. Genet.* **4**, 1441–1445 (1995).
23. Gouw, L. G. *et al.* Retinal degeneration characterizes a spinocerebellar ataxia mapping to chromosome 3p. *Nat. Genet.* **10**, 89–93 (1995).

24. Benomar, A. *et al.* The gene for autosomal dominant cerebellar ataxia with pigmentary macular dystrophy maps to chromosome 3p12–p21.1. *Nat. Genet.* **10**, 84–88 (1995).
25. Niewiadomska-Cimicka, A. & Trottier, Y. Molecular Targets and Therapeutic Strategies in Spinocerebellar Ataxia Type 7. *Neurotherapeutics* **16**, 1074–1096 (2019).
26. David, G. *et al.* Molecular and Clinical Correlations in Autosomal Dominant Cerebellar Ataxia with Progressive Macular Dystrophy (SCA7). *Hum. Mol. Genet.* **7**, 165–170 (1998).
27. Lebre, A.-S. & Brice, A. Spinocerebellar ataxia 7 (SCA7). *Cytogenet. Genome Res.* **100**, 154–163 (2003).
28. Velázquez-Pérez, L. *et al.* A comprehensive clinical and genetic study of a large Mexican population with spinocerebellar ataxia type 7. *neurogenetics* **16**, 11–21 (2015).
29. Chirino, A. *et al.* Motor and cognitive impairments in spinocerebellar ataxia type 7 and its correlations with cortical volumes. *Eur. J. Neurosci.* **48**, 3199–3211 (2018).
30. Tabrizi, S. J., Flower, M. D., Ross, C. A. & Wild, E. J. Huntington disease: new insights into molecular pathogenesis and therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Neurol.* **16**, 529–546 (2020).
31. Caron, N. S., Dorsey, E. R. & Hayden, M. R. Therapeutic approaches to Huntington disease: from the bench to the clinic. *Nat. Rev. Drug Discov.* **17**, 729–750 (2018).
32. Le, B. T. *et al.* Antisense Oligonucleotides Targeting Angiogenic Factors as Potential Cancer Therapeutics. *Mol. Ther. - Nucleic Acids* **14**, 142–157 (2019).
33. Finkel, R. S. *et al.* Treatment of infantile-onset spinal muscular atrophy with nusinersen: a phase 2, open-label, dose-escalation study. *Lancet Lond. Engl.* **388**, 3017–3026 (2016).
34. Duyao, M. P. *et al.* Inactivation of the mouse Huntington's disease gene homolog Hdh. *Science* **269**, 407–410 (1995).
35. Zeitlin, S., Liu, J.-P., Chapman, D. L., Papaioannou, V. E. & Efstratiadis, A. Increased apoptosis and early embryonic lethality in mice nullizygous for the Huntington's disease gene homologue. *Nat. Genet.* **11**, 155–163 (1995).

36. Dragatsis, I., Levine, M. S. & Zeitlin, S. Inactivation of Hdh in the brain and testis results in progressive neurodegeneration and sterility in mice. *Nat. Genet.* **26**, 300–306 (2000).
37. Dietrich, P., Johnson, I. M., Alli, S. & Dragatsis, I. Elimination of huntingtin in the adult mouse leads to progressive behavioral deficits, bilateral thalamic calcification, and altered brain iron homeostasis. *PLoS Genet.* **13**, (2017).
38. Kay, C. *et al.* Huntingtin haplotypes provide prioritized target panels for allele-specific silencing in huntington disease patients of european ancestry. *Mol. Ther.* **23**, 1759–1771 (2015).
39. Niu, C. *et al.* Antisense oligonucleotides targeting mutant Ataxin-7 restore visual function in a mouse model of spinocerebellar ataxia type 7. *Sci. Transl. Med.* **10**, (2018).
40. Barker, R. A., Fujimaki, M., Rogers, P. & Rubinsztein, D. C. Huntingtin-lowering strategies for Huntington’s disease. *Expert Opin. Investig. Drugs* **29**, 1125–1132 (2020).
41. Kingwell, K. Double setback for ASO trials in Huntington disease. *Nat. Rev. Drug Discov.* **20**, 412–413 (2021).
42. Fouquerel, E. *et al.* Use of RNA Interference to Study DNA Repair. in 413–447 (2014). doi:10.1007/978-1-4939-1068-7_24.
43. Harper, S. Q. *et al.* RNA interference improves motor and neuropathological abnormalities in a Huntington’s disease mouse model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 5820–5825 (2005).
44. Drouet, V. *et al.* Sustained effects of nonallele-specific Huntingtin silencing. *Ann. Neurol.* **65**, 276–285 (2009).
45. Drouet, V. *et al.* Allele-specific silencing of mutant huntingtin in rodent brain and human stem cells. *PLoS One* **9**, e99341 (2014).
46. Scholefield, J., Watson, L., Smith, D., Greenberg, J. & Wood, M. J. A. Allele-specific silencing of mutant Ataxin-7 in SCA7 patient-derived fibroblasts. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* **22**, 1369–1375 (2014).
47. Yang, S. *et al.* CRISPR/Cas9-mediated gene editing ameliorates neurotoxicity in mouse model of Huntington’s disease. *J. Clin. Invest.* **127**, 2719–2724 (2017).

48. Shin, J. W. *et al.* Permanent inactivation of Huntington's disease mutation by personalized allele-specific CRISPR/Cas9. *Hum. Mol. Genet.* **25**, 4566–4576 (2016).
49. Monteys, A. M., Ebanks, S. A., Keiser, M. S. & Davidson, B. L. CRISPR/Cas9 Editing of the Mutant Huntingtin Allele In Vitro and In Vivo. *Mol. Ther.* **25**, 12–23 (2017).
50. Blumenstock, S. & Dudanova, I. Cortical and Striatal Circuits in Huntington's Disease. *Front. Neurosci.* **14**, (2020).
51. Alexander, G. E. & Crutcher, M. D. Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends Neurosci.* **13**, 266–271 (1990).
52. Deng, Y. P. *et al.* Differential loss of striatal projection systems in Huntington's disease: a quantitative immunohistochemical study. *J. Chem. Neuroanat.* **27**, 143–164 (2004).
53. Harris, G. J. *et al.* Putamen volume reduction on magnetic resonance imaging exceeds caudate changes in mild Huntington's disease. *Ann. Neurol.* **31**, 69–75 (1992).
54. van den Bogaard, S., Dumas, E., van der Grond, J., van Buchem, M. & Roos, R. MRI biomarkers in Huntington's disease. *Front. Biosci. Elite Ed.* **4**, 1910–1925 (2012).
55. Mehrabi, N. F. *et al.* Symptom heterogeneity in Huntington's disease correlates with neuronal degeneration in the cerebral cortex. *Neurobiol. Dis.* **96**, 67–74 (2016).
56. Thu, D. C. V. *et al.* Cell loss in the motor and cingulate cortex correlates with symptomatology in Huntington's disease. *Brain* **133**, 1094–1110 (2010).
57. Nave, R. D. *et al.* Regional Distribution and Clinical Correlates of White Matter Structural Damage in Huntington Disease: A Tract-Based Spatial Statistics Study. *Am. J. Neuroradiol.* **31**, 1675–1681 (2010).
58. Crawford, H. E. *et al.* Corpus callosal atrophy in premanifest and early Huntington's disease. *J. Huntingt. Dis.* **2**, 517–526 (2013).
59. Tabrizi, S. J. *et al.* 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 (2009).

60. Vonsattel, J.-P. *et al.* Neuropathological Classification of Huntington's Disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **44**, 559–577 (1985).
61. Myers, R. H. *et al.* Clinical and neuropathologic assessment of severity in Huntington's disease. *Neurology* **38**, 341–347 (1988).
62. Saudou, F. & Humbert, S. The Biology of Huntingtin. *Neuron* **89**, 910–926 (2016).
63. Illarioshkin, S. N., Klyushnikov, S. A., Vigont, V. A., Seliverstov, Y. A. & Kaznacheeva, E. V. Molecular Pathogenesis in Huntington's Disease. *Biochem. Biokhimiia* **83**, 1030–1039 (2018).
64. Cha, J. H. Transcriptional dysregulation in Huntington's disease. *Trends Neurosci.* **23**, 387–392 (2000).
65. Arrasate, M. & Finkbeiner, S. Protein aggregates in Huntington's disease. *Exp. Neurol.* **238**, 1–11 (2012).
66. Francelle, L., Lotz, C., Outeiro, T., Brouillet, E. & Merienne, K. Contribution of Neuroepigenetics to Huntington's Disease. *Front. Hum. Neurosci.* **11**, 17 (2017).
67. Bassi, S., Tripathi, T., Monziani, A., Di Leva, F. & Biagioli, M. Epigenetics of Huntington's Disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* **978**, 277–299 (2017).
68. Browne, S. E. Mitochondria and Huntington's Disease Pathogenesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1147**, 358–382 (2008).
69. Dubinsky, J. M. Towards an Understanding of Energy Impairment in Huntington's Disease Brain. *J. Huntingt. Dis.* **6**, 267–302 (2017).
70. Fan, M. M. Y. & Raymond, L. A. N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor function and excitotoxicity in Huntington's disease. *Prog. Neurobiol.* **81**, 272–293 (2007).
71. Wilton, D. K. & Stevens, B. The contribution of glial cells to Huntington's disease pathogenesis. *Neurobiol. Dis.* **143**, 104963 (2020).
72. Machiela, E. & Southwell, A. L. Biological Aging and the Cellular Pathogenesis of Huntington's Disease. *J. Huntingt. Dis.* **9**, 115–128 (2020).

73. Bowles, K. R. & Jones, L. Kinase signalling in Huntington's disease. *J. Huntingt. Dis.* **3**, 89–123 (2014).
74. Wiatr, K., Szlachcic, W. J., Trzeciak, M., Figlerowicz, M. & Figiel, M. Huntington Disease as a Neurodevelopmental Disorder and Early Signs of the Disease in Stem Cells. *Mol. Neurobiol.* **55**, 3351–3371 (2018).
75. Ortega, Z. & Lucas, J. J. Ubiquitin-proteasome system involvement in Huntington's disease. *Front. Mol. Neurosci.* **7**, 77 (2014).
76. Karasinska, J. M. & Hayden, M. R. Cholesterol metabolism in Huntington disease. *Nat. Rev. Neurol.* **7**, 561–572 (2011).
77. Culver, B. P. *et al.* Proteomic Analysis of Wild-type and Mutant Huntingtin-associated Proteins in Mouse Brains Identifies Unique Interactions and Involvement in Protein Synthesis. *J. Biol. Chem.* **287**, 21599–21614 (2012).
78. Caviston, J. P., Ross, J. L., Antony, S. M., Tokito, M. & Holzbaur, E. L. F. Huntingtin facilitates dynein/dynactin-mediated vesicle transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 10045–10050 (2007).
79. Gunawardena, S. *et al.* Disruption of Axonal Transport by Loss of Huntingtin or Expression of Pathogenic PolyQ Proteins in *Drosophila*. *Neuron* **40**, 25–40 (2003).
80. Godin, J. D. *et al.* Huntingtin Is Required for Mitotic Spindle Orientation and Mammalian Neurogenesis. *Neuron* **67**, 392–406 (2010).
81. Keryer, G. *et al.* Ciliogenesis is regulated by a huntingtin-HAP1-PCM1 pathway and is altered in Huntington disease. *J. Clin. Invest.* **121**, 4372–4382 (2011).
82. Rui, Y.-N. *et al.* Huntingtin functions as a scaffold for selective macroautophagy. *Nat. Cell Biol.* **17**, 262–275 (2015).
83. Zuccato, C. *et al.* Loss of huntingtin-mediated BDNF gene transcription in Huntington's disease. *Science* **293**, 493–498 (2001).

84. Pal, A., Severin, F., Lommer, B., Shevchenko, A. & Zerial, M. Huntingtin–HAP40 complex is a novel Rab5 effector that regulates early endosome motility and is up-regulated in Huntington’s disease. *J. Cell Biol.* **172**, 605–618 (2006).
85. Ross, C. A. & Tabrizi, S. J. Huntington’s disease: from molecular pathogenesis to clinical treatment. *Lancet Neurol.* **10**, 83–98 (2011).
86. El-Daher, M.-T. *et al.* Huntingtin proteolysis releases non-polyQ fragments that cause toxicity through dynamin 1 dysregulation. *EMBO J.* **34**, 2255–2271 (2015).
87. Davies, S. W. *et al.* Formation of Neuronal Intranuclear Inclusions Underlies the Neurological Dysfunction in Mice Transgenic for the HD Mutation. *Cell* **90**, 537–548 (1997).
88. Miller, J. *et al.* Quantitative relationships between huntingtin levels, polyglutamine length, inclusion body formation, and neuronal death provide novel insight into huntington’s disease molecular pathogenesis. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **30**, 10541–10550 (2010).
89. Gutekunst, C. A. *et al.* Nuclear and neuropil aggregates in Huntington’s disease: relationship to neuropathology. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **19**, 2522–2534 (1999).
90. Slow, E. J. *et al.* Selective striatal neuronal loss in a YAC128 mouse model of Huntington disease. *Hum. Mol. Genet.* **12**, 1555–1567 (2003).
91. Slow, E. J. *et al.* Absence of behavioral abnormalities and neurodegeneration in vivo despite widespread neuronal huntingtin inclusions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 11402–11407 (2005).
92. Al-Dalahmah, O. *et al.* Single-nucleus RNA-seq identifies Huntington disease astrocyte states. *Acta Neuropathol. Commun.* **8**, 19 (2020).
93. Milnerwood, A. J. *et al.* Early increase in extrasynaptic NMDA receptor signaling and expression contributes to phenotype onset in Huntington’s disease mice. *Neuron* **65**, 178–190 (2010).
94. Gauthier, L. R. *et al.* Huntingtin controls neurotrophic support and survival of neurons by enhancing BDNF vesicular transport along microtubules. *Cell* **118**, 127–138 (2004).

95. Strand, A. D. *et al.* Expression Profiling of Huntington's Disease Models Suggests That Brain-Derived Neurotrophic Factor Depletion Plays a Major Role in Striatal Degeneration. *J. Neurosci.* **27**, 11758–11768 (2007).
96. Brouillet, E. *et al.* Age-Dependent Vulnerability of the Striatum to the Mitochondrial Toxin 3-Nitropropionic Acid. *J. Neurochem.* **60**, 356–359 (1993).
97. Liot, G., Valette, J., Pépin, J., Flament, J. & Brouillet, E. Energy defects in Huntington's disease: Why 'in vivo' evidence matters. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **483**, 1084–1095 (2017).
98. Orr, A. L. *et al.* N-terminal mutant huntingtin associates with mitochondria and impairs mitochondrial trafficking. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **28**, 2783–2792 (2008).
99. Song, W. *et al.* Mutant huntingtin binds the mitochondrial fission GTPase dynamin-related protein-1 and increases its enzymatic activity. *Nat. Med.* **17**, 377–382 (2011).
100. Beal, M. F. Does impairment of energy metabolism result in excitotoxic neuronal death in neurodegenerative illnesses? *Ann. Neurol.* **31**, 119–130 (1992).
101. Brouillet, E., F, C., Mf, B. & P, H. Replicating Huntington's disease phenotype in experimental animals. *Prog. Neurobiol.* **59**, 427–468 (1999).
102. Jacquard, C. *et al.* Brain mitochondrial defects amplify intracellular [Ca²⁺] rise and neurodegeneration but not Ca²⁺ entry during NMDA receptor activation. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **20**, 1021–1023 (2006).
103. Parsons, M. P. & Raymond, L. A. Extrasynaptic NMDA receptor involvement in central nervous system disorders. *Neuron* **82**, 279–293 (2014).
104. Shin, J.-Y. *et al.* Expression of mutant huntingtin in glial cells contributes to neuronal excitotoxicity. *J. Cell Biol.* **171**, 1001–1012 (2005).
105. Jansen, A. H. P. *et al.* Frequency of nuclear mutant huntingtin inclusion formation in neurons and glia is cell-type-specific. *Glia* **65**, 50–61 (2017).
106. Tong, X. *et al.* Astrocyte Kir4.1 ion channel deficits contribute to neuronal dysfunction in Huntington's disease model mice. *Nat. Neurosci.* **17**, 694–703 (2014).

107. Faideau, M. *et al.* In vivo expression of polyglutamine-expanded huntingtin by mouse striatal astrocytes impairs glutamate transport: a correlation with Huntington's disease subjects. *Hum. Mol. Genet.* **19**, 3053–3067 (2010).
108. Savage, J. C. *et al.* Microglial physiological properties and interactions with synapses are altered at presymptomatic stages in a mouse model of Huntington's disease pathology. *J. Neuroinflammation* **17**, 98 (2020).
109. Teo, R. T. Y. *et al.* Structural and molecular myelination deficits occur prior to neuronal loss in the YAC128 and BACHD models of Huntington disease. *Hum. Mol. Genet.* **25**, 2621–2632 (2016).
110. Xiang, Z. *et al.* Peroxisome-Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator 1 α Contributes to Dismyelination in Experimental Models of Huntington's Disease. *J. Neurosci.* **31**, 9544–9553 (2011).
111. Huang, B. *et al.* Mutant huntingtin downregulates myelin regulatory factor-mediated myelin gene expression and affects mature oligodendrocytes. *Neuron* **85**, 1212–1226 (2015).
112. Ferrari Bardile, C. *et al.* Intrinsic mutant HTT-mediated defects in oligodendroglia cause myelination deficits and behavioral abnormalities in Huntington disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **116**, 9622–9627 (2019).
113. Gatto, R. G. *et al.* Analysis of YFP(J16)-R6/2 reporter mice and postmortem brains reveals early pathology and increased vulnerability of callosal axons in Huntington's disease. *Hum. Mol. Genet.* **24**, 5285–5298 (2015).
114. Gatto, R. G. *et al.* Detection of axonal degeneration in a mouse model of Huntington's disease: comparison between diffusion tensor imaging and anomalous diffusion metrics. *Magma N. Y. N* **32**, 461–471 (2019).
115. Carroll, J. B. *et al.* Natural history of disease in the YAC128 mouse reveals a discrete signature of pathology in Huntington disease. *Neurobiol. Dis.* **43**, 257–265 (2011).

116. Diana Rosas, H. *et al.* Altered White Matter Microstructure in the Corpus Callosum in Huntington's Disease: implications for cortical "disconnection". *NeuroImage* **49**, 2995–3004 (2010).
117. Bourbon-Teles, J. *et al.* Myelin Breakdown in Human Huntington's Disease: Multi-Modal Evidence from Diffusion MRI and Quantitative Magnetization Transfer. *Neuroscience* **403**, 79–92 (2019).
118. Bartzokis, G. *et al.* Myelin breakdown and iron changes in Huntington's disease: pathogenesis and treatment implications. *Neurochem. Res.* **32**, 1655–1664 (2007).
119. de la Monte, S. M., Vonsattel, J.-P. & Richardson, E. P., Jr. Morphometric Demonstration of Atrophic Changes in the Cerebral Cortex, White Matter, and Neostriatum in Huntington's Disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **47**, 516–525 (1988).
120. Arteaga-Bracho, E. E. *et al.* Postnatal and adult consequences of loss of huntingtin during development: Implications for Huntington's disease. *Neurobiol. Dis.* **96**, 144–155 (2016).
121. Cowell, R. M., Blake, K. R. & Russell, J. W. Localization of the transcriptional coactivator PGC-1alpha to GABAergic neurons during maturation of the rat brain. *J. Comp. Neurol.* **502**, 1–18 (2007).
122. Barnat, M. *et al.* Huntington's disease alters human neurodevelopment. *Science* **369**, 787–793 (2020).
123. Menalled, L. B. & Chesselet, M.-F. Mouse models of Huntington's disease. *Trends Pharmacol. Sci.* **23**, 32–39 (2002).
124. 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).
125. Ferrante, R. J. Mouse models of Huntington's disease and methodological considerations for therapeutic trials. *Biochim. Biophys. Acta* **1792**, 506–520 (2009).

126. Ciamei, A. & Morton, A. J. 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 (2009).
127. Stack, E. C. *et al.* Chronology of behavioral symptoms and neuropathological sequela in R6/2 Huntington's disease transgenic mice. *J. Comp. Neurol.* **490**, 354–370 (2005).
128. Beal, M. F. & Ferrante, R. J. Experimental therapeutics in transgenic mouse models of Huntington's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **5**, 373–384 (2004).
129. Rattray, I. *et al.* Correlations of Behavioral Deficits with Brain Pathology Assessed through Longitudinal MRI and Histopathology in the R6/2 Mouse Model of HD. *PLOS ONE* **8**, e60012 (2013).
130. Sawiak, S. J., Wood, N. I., Williams, G. B., Morton, A. J. & Carpenter, T. A. Use of magnetic resonance imaging for anatomical phenotyping of the R6/2 mouse model of Huntington's disease. *Neurobiol. Dis.* **33**, 12–19 (2009).
131. Schilling, G. *et al.* Intranuclear inclusions and neuritic aggregates in transgenic mice expressing a mutant N-terminal fragment of huntingtin. *Hum. Mol. Genet.* **8**, 397–407 (1999).
132. Ramaswamy, S., McBride, J. L. & Kordower, J. H. Animal Models of Huntington's Disease. *ILAR J.* **48**, 356–373 (2007).
133. Menalled, L. B. Knock-in mouse models of Huntington's disease. *NeuroRx J. Am. Soc. Exp. Neurother.* **2**, 465–470 (2005).
134. Menalled, L. B., Sison, J. D., Dragatsis, I., Zeitlin, S. & Chesselet, M.-F. 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 (2003).
135. Menalled, L. *et al.* Systematic behavioral evaluation of Huntington's disease transgenic and knock-in mouse models. *Neurobiol. Dis.* **35**, 319–336 (2009).
136. Pépin, J. *et al.* In vivo imaging of brain glutamate defects in a knock-in mouse model of Huntington's disease. *NeuroImage* **139**, 53–64 (2016).

137. Simmons, D. A. *et al.* Up-regulating BDNF with an ampakine rescues synaptic plasticity and memory in Huntington's disease knockin mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 4906–4911 (2009).
138. Menalled, L. B. *et al.* Comprehensive behavioral and molecular characterization of a new knock-in mouse model of Huntington's disease: zQ175. *PLoS One* **7**, e49838 (2012).
139. Heikkinen, T. *et al.* Characterization of neurophysiological and behavioral changes, MRI brain volumetry and 1H MRS in zQ175 knock-in mouse model of Huntington's disease. *PLoS One* **7**, e50717 (2012).
140. Peng, Q. *et al.* Characterization of Behavioral, Neuropathological, Brain Metabolic and Key Molecular Changes in zQ175 Knock-In Mouse Model of Huntington's Disease. *PLOS ONE* **11**, e0148839 (2016).
141. Brooks, S., Higgs, G., Janghra, N., Jones, L. & Dunnett, S. B. Longitudinal analysis of the behavioural phenotype in YAC128 (C57BL/6J) Huntington's disease transgenic mice. *Brain Res. Bull.* **88**, 113–120 (2012).
142. Brooks, S. P., Jones, L. & Dunnett, S. B. Longitudinal analyses of operant performance on the serial implicit learning task (SILT) in the YAC128 Huntington's disease mouse line. *Brain Res. Bull.* **88**, 130–136 (2012).
143. Yu-Taeger, L. *et al.* A novel BACHD transgenic rat exhibits characteristic neuropathological features of Huntington disease. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **32**, 15426–15438 (2012).
144. Manfré, G. *et al.* The BACHD Rat Model of Huntington Disease Shows Specific Deficits in a Test Battery of Motor Function. *Front. Behav. Neurosci.* **11**, 218 (2017).
145. Niewiadomska-Cimicka, A. *et al.* SCA7 Mouse Cerebellar Pathology Reveals Preferential Downregulation of Key Purkinje Cell-Identity Genes and Shared Disease Signature with SCA1 and SCA2. *J. Neurosci.* **41**, 4910–4936 (2021).
146. Pépin, J. *et al.* Complementarity of gluCEST and 1 H-MRS for the study of mouse models of Huntington's disease. *NMR Biomed.* e4301 (2020) doi:10.1002/nbm.4301.

147. Lauterbur, P. C. Magnetic resonance zeugmatography. *Pure Appl. Chem.* **40**, 149–157 (1974).
148. Mansfield, P. & Grannell, P. K. ‘Diffraction’ and microscopy in solids and liquids by NMR. *Phys. Rev. B* **12**, 3618–3634 (1975).
149. Pepin, J. Développement de l’imagerie métabolique par IRM-CEST : application à la maladie de Huntington. (Université Paris Saclay (COmUE), 2018).
150. Le Bihan, D. Looking into the functional architecture of the brain with diffusion MRI. *Nat. Rev. Neurosci.* **4**, 469–480 (2003).
151. Wheeler-Kingshott, C. A. M. & Cercignani, M. About “axial” and “radial” diffusivities. *Magn. Reson. Med.* **61**, 1255–1260 (2009).
152. McConnell, H. M. Reaction Rates by Nuclear Magnetic Resonance. *J. Chem. Phys.* **28**, 430–431 (1958).
153. Wolff, S. D. & Balaban, R. S. Magnetization transfer contrast (MTC) and tissue water proton relaxation in vivo. *Magn. Reson. Med.* **10**, 135–144 (1989).
154. Ward, K. M., Aletras, A. H. & Balaban, R. S. A new class of contrast agents for MRI based on proton chemical exchange dependent saturation transfer (CEST). *J. Magn. Reson. San Diego Calif 1997* **143**, 79–87 (2000).
155. Kim, M., Gillen, J., Landman, B. A., Zhou, J. & van Zijl, P. C. M. Water saturation shift referencing (WASSR) for chemical exchange saturation transfer (CEST) experiments. *Magn. Reson. Med.* **61**, 1441–1450 (2009).
156. Zhou, J., Heo, H.-Y., Knutsson, L., van Zijl, P. C. M. & Jiang, S. APT-Weighted MRI: Techniques, Current Neuro Applications, and Challenging Issues. *J. Magn. Reson. Imaging JMRI* **50**, 347–364 (2019).
157. Cai, K. *et al.* Magnetic Resonance Imaging of Glutamate. *Nat. Med.* **18**, 302–306 (2012).
158. Haris, M. *et al.* Imaging of glutamate neurotransmitter alterations in Alzheimer’s disease. *NMR Biomed.* **26**, 386–391 (2013).

159. Dou, W. *et al.* Chemical exchange saturation transfer magnetic resonance imaging and its main and potential applications in pre-clinical and clinical studies. *Quant. Imaging Med. Surg.* **9**, 1747–1766 (2019).
160. Tambasco, N. *et al.* Magnetization transfer MRI in dementia disorders, Huntington’s disease and parkinsonism. *J. Neurol. Sci.* **353**, 1–8 (2015).
161. Belliveau, J. W. *et al.* Functional mapping of the human visual cortex by magnetic resonance imaging. *Science* **254**, 716–719 (1991).
162. Barkhof, F., Haller, S. & Rombouts, S. A. R. B. Resting-state functional MR imaging: a new window to the brain. *Radiology* **272**, 29–49 (2014).
163. Perez, C. Influence d’une lésion occipitale sur le traitement de l’information visuelle. Approche comportementale et fonctionnelle (IRMf) de la réorganisation corticale. (Université de Grenoble, 2012).
164. Paulsen, J. S. *et al.* Striatal and white matter predictors of estimated diagnosis for Huntington disease. *Brain Res. Bull.* **82**, 201–207 (2010).
165. Sturrock, A. *et al.* A longitudinal study of magnetic resonance spectroscopy Huntington’s disease biomarkers. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* **30**, 393–401 (2015).
166. Reynolds, N. C., Prost, R. W., Mark, L. P. & Joseph, S. A. MR-spectroscopic findings in juvenile-onset Huntington’s disease. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* **23**, 1931–1935 (2008).
167. van den Bogaard, S. J. A. *et al.* Longitudinal metabolite changes in Huntington’s disease during disease onset. *J. Huntingt. Dis.* **3**, 377–386 (2014).
168. Reynolds, N. C., Prost, R. W. & Mark, L. P. Heterogeneity in ¹H-MRS profiles of presymptomatic and early manifest Huntington’s disease. *Brain Res.* **1031**, 82–89 (2005).
169. van den Bogaard, S. J. A. *et al.* Magnetization transfer imaging in premanifest and manifest huntington disease: a 2-year follow-up. *AJNR Am. J. Neuroradiol.* **34**, 317–322 (2013).

170. Ginestroni, A. *et al.* Magnetization transfer MR imaging demonstrates degeneration of the subcortical and cortical gray matter in Huntington disease. *AJNR Am. J. Neuroradiol.* **31**, 1807–1812 (2010).
171. Poudel, G. R. *et al.* Longitudinal change in white matter microstructure in Huntington’s disease: The IMAGE-HD study. *Neurobiol. Dis.* **74**, 406–412 (2015).
172. Douaud, G. *et al.* In vivo evidence for the selective subcortical degeneration in Huntington’s disease. *NeuroImage* **46**, 958–966 (2009).
173. Smith, S. M. *et al.* Tract-based spatial statistics: voxelwise analysis of multi-subject diffusion data. *NeuroImage* **31**, 1487–1505 (2006).
174. Paulsen, J. S. Functional imaging in Huntington’s disease. *Exp. Neurol.* **216**, 272–277 (2009).
175. Wolf, R. C. *et al.* Default-mode network changes in preclinical Huntington’s disease. *Exp. Neurol.* **237**, 191–198 (2012).
176. Unschuld, P. G. *et al.* Impaired cortico-striatal functional connectivity in prodromal Huntington’s Disease. *Neurosci. Lett.* **514**, 204–209 (2012).
177. Werner, C. J. *et al.* Altered resting-state connectivity in Huntington’s disease. *Hum. Brain Mapp.* **35**, 2582–2593 (2014).
178. Gargouri, F. *et al.* Longitudinal changes in functional connectivity of cortico-basal ganglia networks in manifests and premanifest huntington’s disease. *Hum. Brain Mapp.* **37**, 4112–4128 (2016).
179. Wang, J., Zuo, X. & He, Y. Graph-based network analysis of resting-state functional MRI. *Front. Syst. Neurosci.* **0**, (2010).
180. Cheng, Y. *et al.* Structural MRI detects progressive regional brain atrophy and neuroprotective effects in N171-82Q Huntington’s disease mouse model. *NeuroImage* **56**, 1027–1034 (2011).
181. Sawiak, S. J., Wood, N. I., Williams, G. B., Morton, A. J. & Carpenter, T. A. Voxel-based morphometry in the R6/2 transgenic mouse reveals differences between genotypes not seen with manual 2D morphometry. *Neurobiol. Dis.* **33**, 20–27 (2009).

182. Rattray, I. *et al.* 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**, e84726 (2013).
183. Tereshchenko, A. *et al.* Brain structure in juvenile-onset Huntington disease. *Neurology* **92**, e1939–e1947 (2019).
184. Aggarwal, M. *et al.* Spatiotemporal mapping of brain atrophy in mouse models of Huntington's disease using longitudinal in vivo magnetic resonance imaging. *NeuroImage* **60**, 2086–2095 (2012).
185. Garcia-Miralles, M. *et al.* Laquinimod rescues striatal, cortical and white matter pathology and results in modest behavioural improvements in the YAC128 model of Huntington disease. *Sci. Rep.* **6**, 31652 (2016).
186. Zacharoff, L. *et al.* Cortical metabolites as biomarkers in the R6/2 model of Huntington's disease. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **32**, 502–514 (2012).
187. Vorisek, I., Syka, M. & Vargova, L. Brain Diffusivity and Structural Changes in the R6/2 Mouse Model of Huntington Disease. *J. Neurosci. Res.* **95**, 1474–1484 (2017).
188. Gatto, R. G. *et al.* Detection of axonal degeneration in a mouse model of Huntington's disease: comparison between diffusion tensor imaging and anomalous diffusion metrics. *Magn. Reson. Mater. Phys. Biol. Med.* **32**, 461–471 (2019).
189. Petrella, L. I. *et al.* A whole brain longitudinal study in the YAC128 mouse model of Huntington's disease shows distinct trajectories of neurochemical, structural connectivity and volumetric changes. *Hum. Mol. Genet.* **27**, 2125–2137 (2018).
190. Lin, C.-Y. *et al.* Neurovascular abnormalities in humans and mice with Huntington's disease. *Exp. Neurol.* **250**, 20–30 (2013).
191. Hsiao, H.-Y. *et al.* Aberrant astrocytes impair vascular reactivity in Huntington disease. *Ann. Neurol.* **78**, 178–192 (2015).

192. Ferris, C. F. *et al.* Studies on the Q175 Knock-in Model of Huntington's Disease Using Functional Imaging in Awake Mice: Evidence of Olfactory Dysfunction. *Front. Neurol.* **5**, (2014).
193. Li, Q. *et al.* 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 (2017).
194. Chang, W.-T. *et al.* Connectomic imaging reveals Huntington-related pathological and pharmaceutical effects in a mouse model. *NMR Biomed.* **31**, e4007 (2018).
195. Celestine, M., Nadkarni, N. A., Garin, C. M., Bougacha, S. & Dhenain, M. Sammba-MRI: A Library for Processing SmAll-MaMmal BrAin MRI Data in Python. *Front. Neuroinformatics* **14**, (2020).
196. Provencher, S. W. Estimation of metabolite concentrations from localized in vivo proton NMR spectra. *Magn. Reson. Med.* **30**, 672–679 (1993).
197. Smith, S. M. *et al.* Advances in functional and structural MR image analysis and implementation as FSL. *NeuroImage* **23**, S208–S219 (2004).
198. Lee, Y.-B. *et al.* Sparse SPM: Group Sparse-dictionary learning in SPM framework for resting-state functional connectivity MRI analysis. *NeuroImage* **125**, 1032–1045 (2016).
199. Oh, S. W. *et al.* A mesoscale connectome of the mouse brain. *Nature* **508**, 207–214 (2014).
200. Lein, E. S. *et al.* Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature* **445**, 168–176 (2007).
201. Yeh, F.-C., Wedeen, V. J. & Tseng, W.-Y. I. Generalized q-sampling imaging. *IEEE Trans. Med. Imaging* **29**, 1626–1635 (2010).
202. Yeh, F.-C., Verstynen, T. D., Wang, Y., Fernández-Miranda, J. C. & Tseng, W.-Y. I. Deterministic diffusion fiber tracking improved by quantitative anisotropy. *PLoS One* **8**, e80713 (2013).
203. van den Bogaard, S. J. A. *et al.* Exploratory 7-Tesla magnetic resonance spectroscopy in Huntington's disease provides in vivo evidence for impaired energy metabolism. *J. Neurol.* **258**, 2230–2239 (2011).

204. Tkac, I., Dubinsky, J. M., Keene, C. D., Gruetter, R. & Low, W. C. Neurochemical changes in Huntington R6/2 mouse striatum detected by in vivo 1H NMR spectroscopy. *J. Neurochem.* **100**, 1397–1406 (2007).
205. Novak, M. J. U. *et al.* White matter integrity in premanifest and early Huntington’s disease is related to caudate loss and disease progression. *Cortex J. Devoted Study Nerv. Syst. Behav.* **52**, 98–112 (2014).
206. Molina-Calavita, M. *et al.* Mutant Huntingtin Affects Cortical Progenitor Cell Division and Development of the Mouse Neocortex. *J. Neurosci.* **34**, 10034–10040 (2014).
207. Barnat, M., Le Friec, J., Benstaali, C. & Humbert, S. Huntingtin-Mediated Multipolar-Bipolar Transition of Newborn Cortical Neurons Is Critical for Their Postnatal Neuronal Morphology. *Neuron* **93**, 99–114 (2017).
208. Carroll, J. B. *et al.* Potent and Selective Antisense Oligonucleotides Targeting Single-Nucleotide Polymorphisms in the Huntington Disease Gene / Allele-Specific Silencing of Mutant Huntingtin. *Mol. Ther.* **19**, 2178–2185 (2011).
209. Southwell, A. L. *et al.* Huntingtin suppression restores cognitive function in a mouse model of Huntington’s disease. *Sci. Transl. Med.* **10**, eaar3959 (2018).
210. Southwell, A. L. *et al.* In Vivo Evaluation of Candidate Allele-specific Mutant Huntingtin Gene Silencing Antisense Oligonucleotides. *Mol. Ther.* **22**, 2093–2106 (2014).
211. Boretius, S., Tammer, R., Michaelis, T., Brockmüller, J. & Frahm, J. Halogenated volatile anesthetics alter brain metabolism as revealed by proton magnetic resonance spectroscopy of mice in vivo. *NeuroImage* **69**, 244–255 (2013).
212. Yoo, S.-Y. *et al.* SCA7 Knockin Mice Model Human SCA7 and Reveal Gradual Accumulation of Mutant Ataxin-7 in Neurons and Abnormalities in Short-Term Plasticity. *Neuron* **37**, 383–401 (2003).
213. Adanyeguh, I. M. *et al.* Autosomal dominant cerebellar ataxias: Imaging biomarkers with high effect sizes. *NeuroImage Clin.* **19**, 858–867 (2018).

214. Gray, M. *et al.* Full-length human mutant huntingtin with a stable polyglutamine repeat can elicit progressive and selective neuropathogenesis in BACHD mice. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **28**, 6182–6195 (2008).
215. Sturrock, A. *et al.* Magnetic resonance spectroscopy biomarkers in premanifest and early Huntington disease. *Neurology* **75**, 1702–1710 (2010).
216. Adjeroud, N. *et al.* Reduced impact of emotion on choice behavior in presymptomatic BACHD rats, a transgenic rodent model for Huntington Disease. *Neurobiol. Learn. Mem.* **125**, 249–257 (2015).
217. Manfré, G. *et al.* BACHD rats expressing full-length mutant huntingtin exhibit differences in social behavior compared to wild-type littermates. *PLoS One* **13**, e0192289 (2018).
218. Novati, A. *et al.* Validation of behavioral phenotypes in the BACHD rat model. *Behav. Brain Res.* **393**, 112783 (2020).
219. Southwell, A. L. *et al.* A novel humanized mouse model of Huntington disease for preclinical development of therapeutics targeting mutant huntingtin alleles. *Hum. Mol. Genet.* **26**, 1115–1132 (2017).
220. Caron, N. S. *et al.* Potent and sustained huntingtin lowering via AAV5 encoding miRNA preserves striatal volume and cognitive function in a humanized mouse model of Huntington disease. *Nucleic Acids Res.* **48**, 36–54 (2020).
221. Buonocore, M. H. & Gao, L. Ghost artifact reduction for echo planar imaging using image phase correction. *Magn. Reson. Med.* **38**, 89–100 (1997).
222. Zaiss, M., Schmitt, B. & Bachert, P. Quantitative separation of CEST effect from magnetization transfer and spillover effects by Lorentzian-line-fit analysis of z-spectra. *J. Magn. Reson. San Diego Calif 1997* **211**, 149–155 (2011).
223. Wiatr, K. *et al.* Broad Influence of Mutant Ataxin-3 on the Proteome of the Adult Brain, Young Neurons, and Axons Reveals Central Molecular Processes and Biomarkers in SCA3/MJD Using Knock-In Mouse Model. *Front. Mol. Neurosci.* **14**, 658339 (2021).

224. Baligand, C. *et al.* Zero Echo Time 17O-MRI Reveals Decreased Cerebral Metabolic Rate of Oxygen Consumption in a Murine Model of Amyloidosis. *Metabolites* **11**, 263 (2021).

Title

Identification of the key role of white matter alteration in the pathogenesis of Huntington's Disease

Authors

Jean-Baptiste Pérot^a, Marina Célestine^a, Marco Palombo^b, Marc Dhenain^a, Sandrine Humbert^c, Emmanuel Brouillet^a, Julien Flament^a

Affiliations

^aUniversité Paris-Saclay, Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives (CEA), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Molecular Imaging Research Center (MIRGen), Laboratoire des Maladies Neurodégénératives, Fontenay-aux-Roses, France

^bCentre for Medical Image Computing, Department of Computer Science, University College London, London, United Kingdom

^cUniversité Grenoble Alpes, INSERM, U1216, Grenoble Institut Neurosciences, Grenoble, France

Corresponding author

Dr. Julien Flament

MIRGen, CEA, 18 route du Panorama - BP n° 6

92265 - Fontenay-aux-Roses Cedex, France

julien.flament@cea.fr

Number of figures: 8 and **tables:** 0

Number of References: 93

Words count for: Abstract: 233 ; **Text:** 5954

Abstract

Pathogenesis of the inherited neurodegenerative disorder Huntington's Disease (HD) is complex and progressive, with a long presymptomatic phase in which subtle changes occur in the brain of gene carriers up to 15 years before the onset of symptoms. Thus, there is a need of early, functional biomarker to better understand disease progression and to evaluate treatment efficacy far from onset. In particular, recent studies have shown that white matter may be affected early in HD. In this study, we scanned longitudinally Ki140CAG mice with structural MRI, Diffusion Tensor Imaging (DTI), Chemical Exchange Saturation Transfer of glutamate (gluCEST) and Magnetization Transfer (MT) imaging, in order to assess white matter integrity over the life of this very progressive mouse model. Our results show early defects of diffusion properties in the anterior part of the corpus callosum, preceding gluCEST defects in the same region (-10.8% at 8 months, -19% at 12 months) that spread to adjacent regions. At 12 months, frontal (-7.3%) and piriform (-16.7%) cortices showed reduced gluCEST, as well as the pallidum (-21.0%). MT imaging showed reduced signal in the septum (-21.7%) at 12 months. Cortical and striatal atrophy then appear at 18 months. Vulnerability of the striatum and motor cortex, combined with alterations of anterior corpus callosum, seems to point out the pivotal role of white matter, in the pathogenesis of HD and the pertinence of gluCEST and DTI as biomarkers in HD.

Keywords

- Huntington's disease
- White matter
- gluCEST
- DTI
- Mouse model
- Neurodegenerative disease

Highlights

- A knock-in mouse model of Huntington's disease is longitudinally characterized
- A multimodal MRI protocol is performed to identify biomarkers of the disease
- The white matter plays a pivotal role in the pathogenesis of the disease
- The cortico-striatal pathway seems particularly vulnerable in Huntington's disease

List of Abbreviations

¹H-MRS: ¹H Magnetic Resonance Spectroscopy
AD: axial diffusivity
BDNF: Brain-Derived Neurotrophic Factor
CEST: Chemical Exchange Saturation Transfer
Cho: choline
DTI: Diffusion Tensor Imaging
FA: fractional anisotropy
gluCEST: Chemical Exchange Saturation Transfer of glutamate
GM: gray matter
Gln: glutamine
Glu: glutamate
HD: Huntington's disease
HTT: gene coding the huntingtin protein
htt: huntingtin protein

Ins: myo-inositol
MD: mean diffusivity
m-HTT: gene coding the mutant huntingtin protein
m-htt: mutant huntingtin protein
MT: Magnetization transfer
NAA: N-acetyl aspartate
RD: radial diffusivity
RF: radio frequency
TBSS: Tract-Based Spatial Statistics
WM: white matter

1. Introduction

Huntington's disease (HD) is an inherited neurodegenerative disease characterized by a triad of symptoms. While the disease is well known for its most prominent motor symptoms (chorea, dyskinesia and dystonia), many non-motor manifestations also occur early including olfactory deficits, sleep disorders, psychiatric signs such as depression, perturbation of emotivity and irritability. Cognitive deficits are also observed including loss of mental flexibility/adaptation, and defective procedural memory ¹. Despite tremendous efforts made, there is currently no therapy to cure the disease or to slow its progression, resulting in a fatal outcome 10 to 15 years after the onset of symptoms in young individuals. The disease is caused by a mutation consisting of an abnormal expansion of CAG repeats in the exon 1 of the HTT gene coding the protein huntingtin (htt) ². This leads to an expansion of a poly-glutamine tract in the N-terminal part of the protein. Mutant htt (m-htt) is toxic to brain cells through combination of gain and loss of function mechanisms ³.

Non-motor manifestations in m-HTT gene carriers are among the earliest to occur and are very disabling features in young individuals. Several studies suggested that they could occur many years before the onset of the disease ^{4,5}. However, these manifestations can be highly variable from one patient to the other and their use as clinical readouts for future treatment evaluation is difficult, as it requires important cohort sizes. Similarly, the intra- and inter-subject variability of motor symptoms, although lower than that of non-motor signs, also limits their use to monitor disease progression ^{6,7}.

In addition to symptoms, neuroimaging methods likely represent a crucial non-invasive approach to characterize in a quantitative manner the progression of the disease at the individual level. The preferential atrophy and dysfunction of the striatum first evidenced as the most striking neuropathological finding in post-mortem HD brain samples ^{8,9} was confirmed more than two decades ago by founding studies using CT, MRI and PET scanners even in patients at early stages of the disease ^{10,11}. Recent work showed that the atrophy of the striatum as measured by MRI is currently the best biomarker of disease progression in HD gene carriers ^{12,13}. However, despite a good correlation between striatal atrophy and disease severity ¹⁴, atrophy provides only limited information about HD pathogenesis and is probably the long-term consequence of subtle biological modifications that occur many years before macroscopic alterations. In addition, numerous studies suggested that volume alterations could occur simultaneously in several other brain structures such as cortical and subcortical regions ^{15,16} as well as white matter (WM) ^{17,18}. Therefore, focusing only on striatal atrophy is too limiting to capture the extent of different biological processes involved in HD. Thus, there is a need to find more predictive, functional and earlier biomarkers for a better understanding of disease pathogenesis and to monitor its progression. Moreover, in the perspective of future therapeutic interventions aiming at slowing down disease progression before onset of disabling symptoms, such biomarkers would be extremely useful to evaluate drug engagement and biological efficacy.

Interestingly, recent studies pointed out early alterations of WM and fiber tracks in HD concomitantly with atrophy measured in gray matter (GM) ^{17,19}. Furthermore, longitudinal studies performed in large cohorts of HD gene carriers such as TRACK-HD identified a good correlation between atrophy measured in frontal and posterior WM and disease progression in presymptomatic HD patients ^{14,20}. Early WM changes have also been reported in animal models of HD where anomalies of WM tracks were found using MRI ^{21,22}. In addition, the presence of m-htt in oligodendrocytes of knock-in mice has been shown to lead to abnormal myelination and apparition of neurological symptoms ^{23,24}. Although WM changes have been considered as a consequence of GM loss for many years, numerous studies provided strong evidence of the major role of WM alterations in HD physiopathology, independently of neuronal cell loss ²⁵⁻²⁷. Therefore, WM modifications might be one of the early hallmarks of the disease and could constitute a key biomarker, especially during the presymptomatic phase of the disease.

Further investigations are needed to characterize WM changes induced by HD pathological processes and neuroimaging methods can provide valuable tools to address this question. MRI can be used to assess non-invasively several aspects of the pathology, going from neuro-metabolic modifications to macrostructural changes.

Numerous studies have used Diffusion Tensor Imaging (DTI) to analyze WM modifications²⁸. Quantitative indexes such as fractional anisotropy (FA), mean diffusivity (MD), radial diffusivity (RD, diffusivity perpendicular to axonal fibers) and axial diffusivity (AD, diffusivity along axonal fibers) can be derived to assess microstructural properties of WM²⁹. FA describes the degree of anisotropy within a voxel so a decrease of FA value represents a loss of tissue organization that can be associated with alteration of cellular integrity³⁰. AD and RD are usually considered to be increased in pathological conditions due respectively to axonal degeneration and demyelinating processes³¹. However, several studies have shown inconsistent results in the context of HD so interpretation of these variations remains ambiguous^{27,32,33}. Such heterogeneity may be explained by the variability of symptoms within HD patients or due to different characteristics of animal models.

Complementarily to diffusion MRI, magnetization transfer (MT) imaging can capture changes of macromolecular content of tissues with a good spatial resolution, especially myelin content³⁴. The MT contrast relies on decrease of water signal intensity due to exchange of magnetization between fast exchanging protons bound to macromolecules and free water after an off-resonance radio frequency (RF) pulse³⁵. This method has been shown to be sensitive to myelin concentration with a good specificity and several studies used it to explore both WM and GM changes in HD patients^{36,37}.

In vivo ¹H Magnetic Resonance Spectroscopy (¹H-MRS) can monitor alterations of metabolic profiles, providing key biological insights of pathological pathways involved in different cell types^{38,39}. Previous studies demonstrated metabolic changes that occur in the brain of either human HD patients or transgenic mouse models of HD^{40–42}. In particular, decreased concentrations of N-acetyl-aspartate (NAA) and glutamate (Glu), two metabolites mainly located in neurons, were measured in HD patients and animal models⁴³. Other metabolite concentrations such as glutamine (Gln), myo-inositol (Ins) and choline (Cho) have been reported to be altered in HD mouse models, even if variations were not consistently reported depending on the model^{44,45}. However, in spite of the rich biological information provided by ¹H-MRS, this method suffers from its inherently low sensitivity. Measurement of metabolic profiles within small and thin structures such as the corpus callosum would be very difficult without strong contamination by surrounding structures.

Recently, CEST (Chemical Exchange Saturation Transfer) has been proposed to address this limitation by using indirect detection of dilute molecules through their exchange of labile protons with the bulk water^{46–48}. Exchangeable protons such as amine (-NH₂) or amide (-NH) exhibit a resonance frequency that is shifted from the water resonance frequency so they can be selectively saturated using RF pulse. The decrease of water signal due to magnetization exchange being directly correlated to the concentration of exchanging protons, it is possible to map the spatial distribution of the molecule of interest. Several studies already demonstrated the potential of CEST imaging to map glutamate with a good spatial resolution in both rodent and human brains^{49–51}, including in the context of HD⁵².

The Ki140CAG mouse model⁵³ is a knock-in model of HD containing 140 CAG repeats inserted in the murine huntingtin gene. It is characterized by the slowly progressive appearance of the symptoms and is considered to mimic more closely clinical form of HD than severe and rapid mouse models^{53,54}. These mice present early locomotor abnormalities and huntingtin aggregates in the striatum as early as 4 months of age⁵³. Homozygous mice for the HTT gene present early impairments of motor functions, such as hypokinesia at 4 months of age and reduced performances in rotarod test⁵⁵. In a recent study performed on heterozygous and homozygous Ki140CAG mice, we showed a progression of the severity of locomotor activity defects with genotype when compared to age-matched wild type littermates⁵². Previously, we detected early brain changes using neuroimaging in this model. Structural MRI revealed significant striatal atrophy at 12 months of age in small cohorts of homozygous mice⁵². ¹H-MRS in the same mice showed metabolic modifications including reduced levels of taurine and NAA in the striatum, in both homozygous and heterozygous Ki140CAG mice. Concentration of Glu was also found to be reduced while Gln was increased. These alterations were associated with a decrease of gluCEST signal in the striatum and piriform cortex of homozygous mice. Surprisingly, the most affected structure was the corpus callosum in both heterozygous and homozygous mice, suggesting that this structure was very early affected in this mouse model. However, whereas all changes we observed tended to be stronger in homozygous than in heterozygous Ki140CAG mice, they were obtained only at one age, so that the progression of the disease in this model remained to be investigated.

In the present study, we developed a multimodal MRI protocol combining anatomical, diffusion weighted, gluCEST and MT imaging in order to monitor longitudinally Ki140CAG mice and their wild type (WT) littermates. We detected pointed toward early changes affecting the function and tissue organization of different extra-striatal brain regions providing new insights on the progression of brain perturbations in this slowly progressive model of HD that could be reminiscent of those occurring in m-HTT human gene carriers.

2. Material and Methods

2.1 Ki140CAG and wild type littermate mice

Knock-in mice express chimeric mouse/human exon 1 containing 140 CAG repeats inserted in the murine HTT gene (Ki140CAG)⁵³. Ki140CAG mice colony was maintained by breeding heterozygous Ki140CAG males and WT females. Heterozygous mice (n = 11 males, Ki140CAG) were compared to their relative age-matched littermates (n = 12 males, WT). 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 126). The animal facility was approved by veterinarian inspectors (authorization n° A 92-032-02) and complies with Standards for Humane Care and Use of Laboratory Animals of the Office of Laboratory Animal Welfare (OLAW – n°#A5826-01). All procedures received approval from the ethical committee (APAFIS #21335-201907031642584 v2).

2.2 MRI Protocol

Animals were scanned longitudinally (2.5, 5, 8, 12 and 18 months of age) on a horizontal 11.7 T Bruker scanner (Bruker, Ettlingen, Germany). Mice were first anesthetized using 3% isoflurane in a 1:1 gas mixture of air/O₂ and positioned in a dedicated stereotaxic frame with mouth and ear bars to prevent any movements during MR acquisitions. Mice temperature was monitored with a rectal probe and maintained at 37°C with regulated water flow. Respiratory rate was continuously monitored using PC SAM software (Small Animal Instruments, Inc., Stony Brook, NY, USA) during scanning. The isoflurane level was adjusted around 1.5% to keep the respiratory rate in the range of 60 to 80 per minute. A quadrature cryoprobe (Bruker, Ettlingen, Germany) was used for radiofrequency transmission and reception.

High-resolution anatomical images (Turbo Spin Echo sequence, TE/TR = 5/10000 ms, Turbo factor = 10, effective TE = 45 ms, in-plane resolution = 100 x 100 μm^2 , 200 μm slice thickness, 100 slices) were used for structures volumetry.

Three gluCEST images centered on the mid-striatum were acquired with a 2D fast spin-echo sequence preceded by a frequency-selective continuous wave saturation pulse (TE/TR = 6/5000 ms, 10 echoes and effective TE = 30 ms, in-plane resolution = 150 x 150 μm^2 , 0.6 mm slice thickness). The MAPSHIM routine was applied in a voxel encompassing the slices of interest in order to reach a good shim on gluCEST images. GluCEST images were acquired with a saturation pulse applied during $T_{\text{sat}} = 1$ s, composed by 10 broad pulse of 100 ms, with 20 μs inter-delay and an amplitude $B_1 = 5$ μT . The frequency of the saturation pulse $\Delta\omega$ was applied in a range from -5 ppm to 5 ppm with a step of 0.5 ppm. The WASSR method⁵⁶ was used to correct for B_0 inhomogeneities ($B_1 = 0.2$ μT , $\Delta\omega$ in a range from -1 ppm to 1 ppm with a step of 0.1 ppm). The same sequence than gluCEST was used for MT images acquisition with optimized parameters to assess macromolecular compounds ($\Delta\omega = \pm 16$ ppm, $B_1 = 10$ μT , $T_{\text{sat}} = 800$ ms). MT images were not acquired during the first time-point (2.5 months).

The diffusion-weighted MRI data were acquired using Echo Planar Imaging (EPI) sequence (TE/TR = 30/3200 ms, in-plane resolution = 112 x 112 μm^2 , 500 μm slice thickness, 10 slices, b-value = 1000 s/mm², 30 directions).

2.3 Data processing and statistical analyses

Images acquired using each of the MRI modalities were co-registered and automatically segmented using an in-house python library (Sammba-MRI⁵⁷, **Fig. 1**). In a first step, anatomical images were co-registered to generate an average of all anatomical images, called the study template. This template was segmented using an atlas composed by 34 regions (**Fig. 1**) derived from the Allen mouse brain atlas⁵⁸. Then, transformations to match the atlas to the study template and to match the study template to all high-resolution anatomical images were

calculated. Finally, transformations were computed to project the atlas onto the images acquired using each of the MRI modalities. Outputs of the Sammba-MRI pipeline are the volume of each of the 34 structures and mean gluCEST contrast, MT contrast and FA, RD and AD within each structure for each animal.

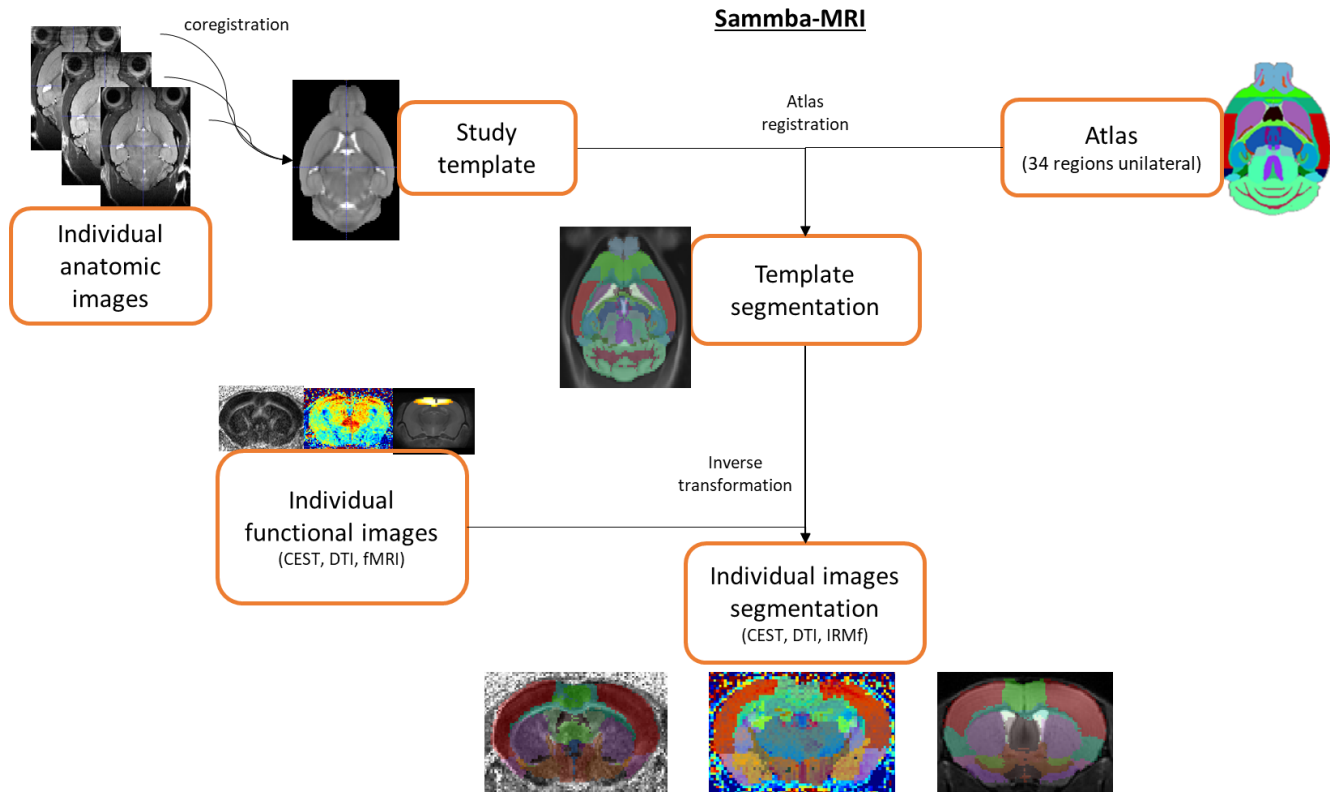


Figure 1: Automated co-registration and segmentation pipeline using in-house python library Sammba-MRI.

CEST images were processed pixel-by-pixel and analyzed using in-house programs developed on MATLAB software (MathWorks Inc., Natick, MA) used to generate Z-spectra by plotting the longitudinal magnetization as a function of saturation frequency. WASSR method was used to generate absolute B_0 map by finding the actual frequency within each voxel. Z-spectrum in each voxel was interpolated using a cubic spline and B_0 map was used to correct for B_0 inhomogeneities. The specific glutamate contribution was isolated using Asymmetrical Magnetization Transfer Ratio (MTR_{asym})⁵⁹ and was calculated as follows: $MTR_{asym}(\Delta\omega) = 100 \times (M_{sat}(-\Delta\omega) - M_{sat}(+\Delta\omega)) / M_{sat}(-5 \text{ ppm})$ where $M_{sat}(\pm\Delta\omega)$ is the magnetization acquired with saturation pulse applied at '+' or '-' $\Delta\omega$ ppm. GluCEST images were calculated with $\Delta\omega$ centered at ± 3 ppm.

FA, AD and RD maps were generated using ParaVision 6.1 software (Bruker, Ettlingen, Germany). FA images underwent the Tract-Based Spatial Statistics (TBSS) pipeline⁶⁰ using FSL software⁶¹. For that, FA maps were first co-registered to the study template. Then, the mean FA map over the whole animal cohort was generated and the skeleton template of WM tracks was extracted. Individual skeleton from each animal was calculated using the same process and then projected to skeleton template to have a good co-registration of WM tracks.

Variation of each index Ind (with Ind being either structure volume, gluCEST contrast or MT contrast) between WT littermates and Ki140CAG mice was calculated in each brain region as follows: $Variation = 100 \times (Ind(WT) - Ind(Ki140CAG)) / Ind(WT)$.

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, San Diego, California, USA). The Shapiro-Wilk test was used to test the data for normality and no deviation from normality was observed for any data. One-way ANOVA with repeated measures was used for statistical analysis. The significant threshold was set to 0.05. ANOVA was followed by a Bonferroni *post-hoc* test to determine individual significant differences between groups. Sample size to compare HD and WT mice that would have been needed for detection of significant change was estimated assuming a significance level of 5%, a power of 80% and two-sided tests

(BiostaTGV module, <https://biostatgv.sentiweb.fr/?module=etudes/sujets#>). The standard deviation used for this estimation was the square root of the pooled variance from each group.

2.4 Graph Theory

Normalized projection data from the Allen Connectivity Atlas (Oh et al.⁶²) was processed using graph theory. This method has been widely used for representation of functional networks as measured by resting-state functional MRI. A threshold was applied at 1 of normalized projection strength to remove irrelevant projections. Thresholded projection matrix was then loaded in Gephi 0.9.2 and a Force Atlas spatialization algorithm was applied. This algorithm iteratively forms clusters of regions based on their connectivity. Correspondence between subregions from connectivity atlas and large structures used in MRI atlas was established based on the Allen Mouse Brain Atlas ⁵⁸ (<http://atlas.brain-map.org/>).

2.5 Tractography

Acquired diffusion-weighted MRI data were reconstructed with the generalized q-sampling imaging (GQI) method ⁶³, which models diffusion patterns in each voxel with an orientation distribution function (ODF) that can detect simultaneous diffusion in multiple directions, using the DSI Studio software (<http://dsi-studio.labsolver.org>). For tractography, the generalized deterministic tracking algorithm implemented in DSI Studio ⁶⁴ was used. Whole brain tractography was first performed to assess overall data quality and to decide appropriate values for global parameters (e.g. the anisotropy threshold used as a stopping criterion in tractography) by tracking streamlines with a whole-brain seed. Then, locally-constrained tractography was used to isolate the tract connecting the cortex to the striatum, namely the cortico-striatal tract, and those connecting the two hemispheres, namely inter-hemispheric tract, by making use of ROI-based Boolean operations. For the cortico-striatal tract, ROIs were defined by specifying the volume of the motor cortex from which streamlines must start and the volume of the striatum where streamlines must terminate. For the inter-hemispheric tract, ROIs were defined by specifying the volume of the left end of the corpus callosum from which streamlines must start and the volume of the right end of the corpus callosum where streamlines must terminate, with an additional ROI in the middle of the corpus callosum that streamlines must cross. A threshold on the FA at 0.15, maximum streamline length 20 mm; random maximum angle; trilinear interpolation were used as global parameters. For whole brain tractography 100,000 streamlines were generated with random seeds in the whole brain; these streamlines were then filtered in the locally-constrained tractography step, where only the streamlines satisfying the ROI-based Boolean conditions were retained to define the cortico-striatal tract and the inter-hemispheric tract.

3. Results

3.1 Long-term and evolving cortico-striatal atrophy in Ki140CAG mice

The mean volume of each of the 34 brain regions was calculated at each time-point for WT littermates and Ki140CAG mice. Volume variation between mice groups was calculated for all brain structures and reported in a variation map in order to highlight hypertrophied (shades of pink) and atrophied (shades of green) structures (**Fig. 2**, variation expressed in percentage referred to WT littermates). At 18 months, significant atrophy of the striatum (-4.3%, $p < 0.05$), frontal cortex (-5.3%, $p < 0.05$) and motor cortex (-3.3%, $p < 0.05$) were measured in Ki140CAG mice (**Fig. 2**, last column). At earlier time points, we saw a clear trend towards cerebral atrophy particularly in cortical regions in association with dilation of ventricles. Although volume variations were not significant, the atrophy trend seemed increased with aging.

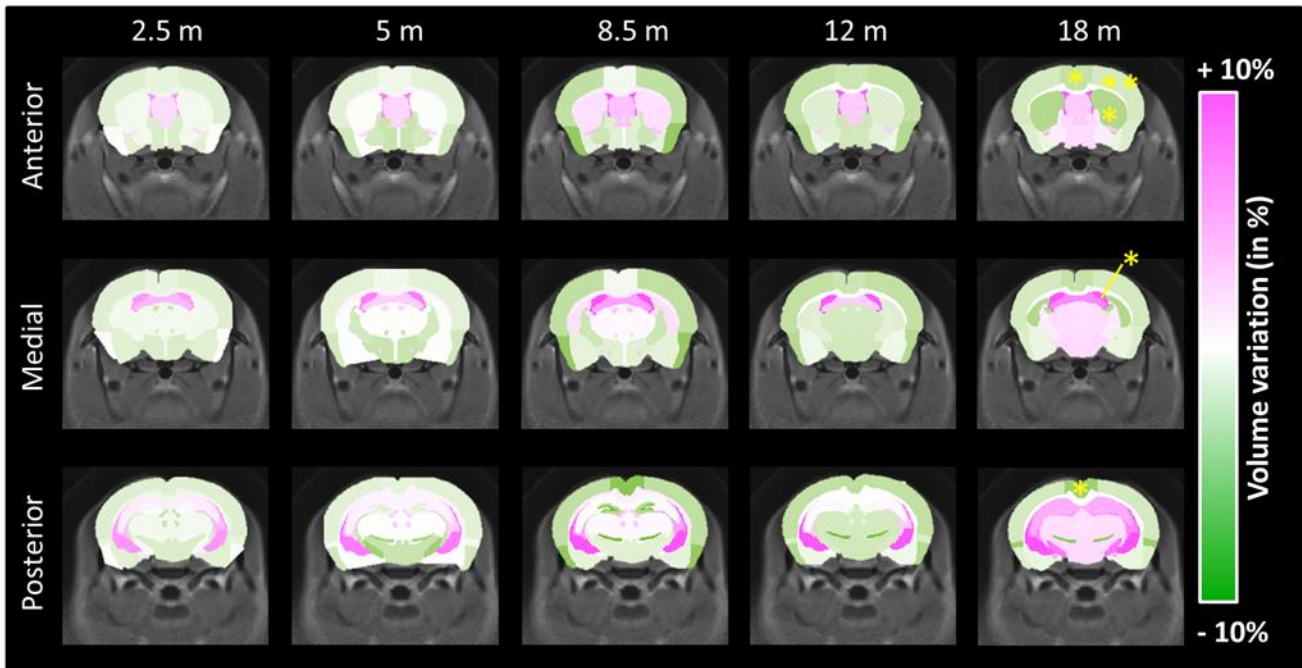


Figure 2: Volume variation maps between WT and Ki140CAG mice, at each time-point, on three slices of the mouse brain. Hypertrophied structures are reported in shades of pink and atrophied structures in shades of green. Yellow stars represent significant atrophy (RM-ANOVA + Bonferroni, $p < 0.05$).

3.2 Early deficiencies of cortico-striatal pathway revealed by metabolic imaging

Variations of mean gluCEST contrast (**Fig. 3**, increase of gluCEST contrast in shades of red, decrease in shades of blue) measured in each brain region at each time-point were calculated between Ki140CAG mice and WT littermates and reported on a variation map. The most affected structure in Ki140CAG mice was the corpus callosum (CC) where a significant decrease of gluCEST contrast was measured at 8 months (-10.8%, $p < 0.05$, **Fig. 3**). Significant decreases of gluCEST contrast were also measured in CC (-19%, $p < 0.01$), in the frontal (-7.3%, $p < 0.05$) and piriform (-16.7%, $p < 0.05$) cortices and in the pallidum (-21.0%, $p < 0.05$) of Ki140CAG mice at 12 months, confirming our previous results acquired in this mouse model⁵². A non-significant decrease of gluCEST contrast (-12%, $p = 0.12$) was measured in the striatum of 12-months old mice, as already reported in heterozygous Ki140CAG mice.

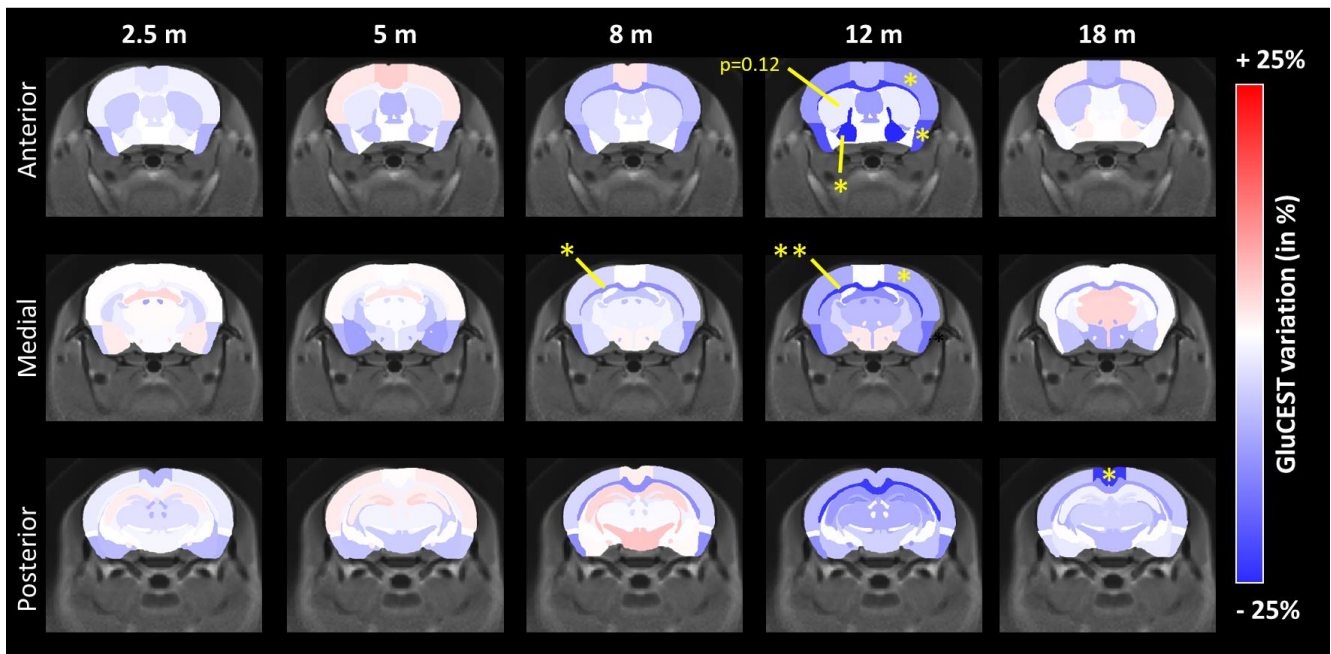


Figure 3: GluCEST variation maps between WT and Ki140CAG mice, at each time-point, on three slices of the mouse brain. Structures with increased gluCEST contrast are reported in shades of red and structures with decreased gluCEST contrast in shades of blue. Yellow stars represent significant difference (RM-ANOVA + Bonferroni, $p < 0.05$).

Similar maps of MT contrast variations (**Fig. 4**, increase of MT contrast in shades of orange, decrease in shades of purple) revealed significant decrease of MT contrast in the septum (**Fig. 4**, -21.7%, $p < 0.05$) and a trend in the striatum (-12.5%, $p = 0.12$) at 12 months only.

Surprisingly, at 18 months, neither gluCEST nor MT imaging showed significant variation of MTR_{asym} values between WT littermates and Ki140CAG mice. This could be attributed to normal aging of control mice with the decrease of gluCEST and MT contrast for those mice ⁶⁵.

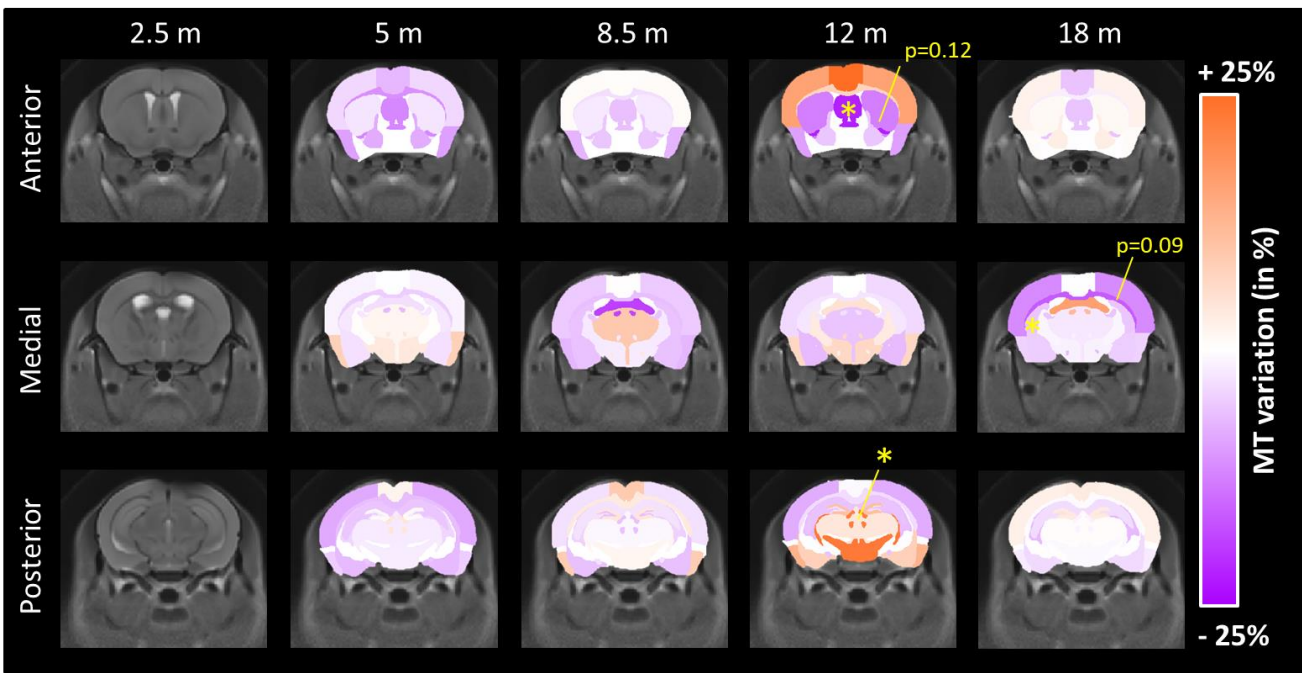


Figure 4: MT variation maps between WT and Ki140CAG mice, at each time-point, on three slices of the mouse brain. Structures with increased MT contrast are reported in shades of orange and structures with decreased MT contrast in shades of violet. Yellow stars represent significant difference (RM-ANOVA + Bonferroni, $p < 0.05$).

3.3 Alteration of structural connectivity and microstructure in Ki140CAG mice

Microstructural properties and neuronal fibers integrity were investigated using DTI. Variations of FA, AD and RD between HD and WT mice were calculated and showed for the anterior brain slices (**Fig. 5**, increase of FA, AD or RD in shades of brown, decrease in shades of cyan). Despite a clear tendency of decreased FA, AD and RD values over time in Ki140CAG in most of GM structures, no variation reached statistical significance.

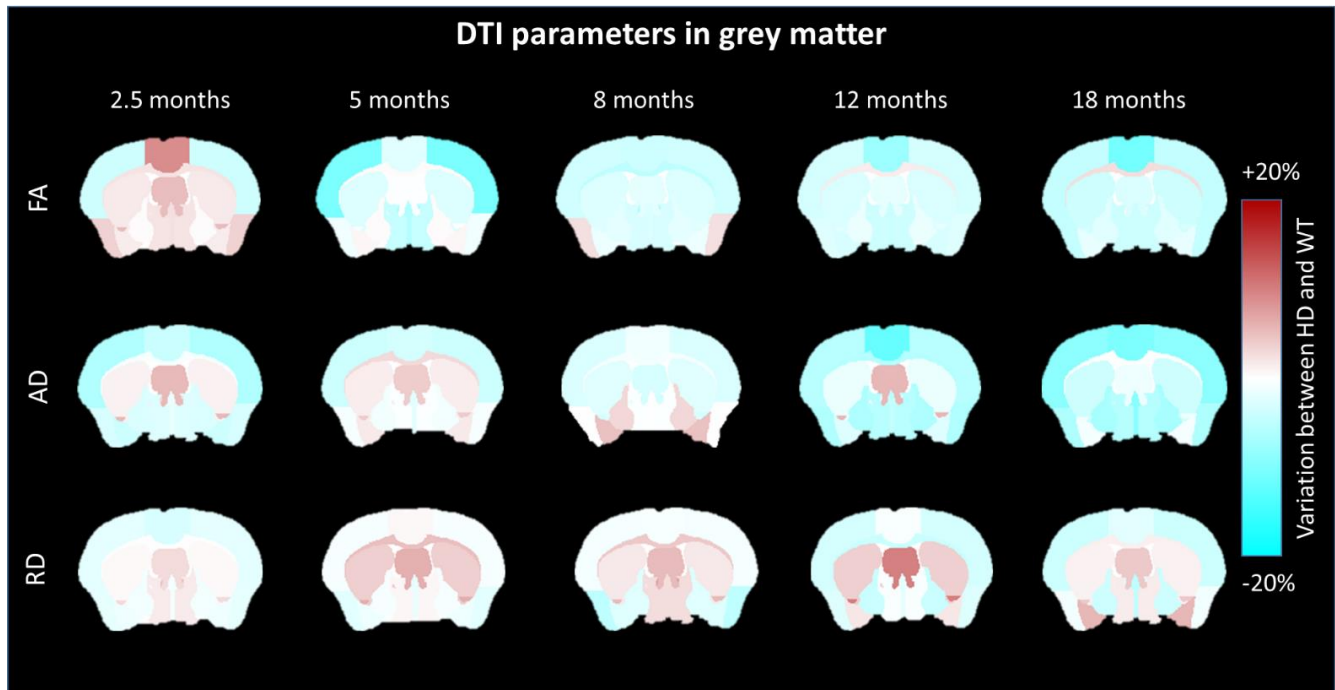


Figure 5: FA, AD and RD variation maps between WT and Ki140CAG mice, at each time-point, on an anterior slice of the mouse brain. Structures with increased diffusion parameters are reported in shades of brown and structures with decreased diffusion parameters in shades of cyan.

We hypothesized that the relevance of atlas-based approach might be limiting for examination of the WM. Indeed, due to small CC thickness and imprecise realignment of WM structures, atlas-based analysis was not able to detect any change. Interestingly, both HD and WT groups showed increase of FA values during the first 8 months and then reached a plateau (**Fig. 6.a**). Nonetheless, both time courses were not identical and a delay of FA increase was observed in Ki140CAG mice. Consequently, we performed TBSS analysis to improve DTI data analysis for WM structures. Thanks to TBSS approach, several clusters of voxels with significant decrease of FA values were identified in the anterior CC of Ki140CAG mice as early as 5 months (**Fig. 6.b**). Clusters of reduced FA values were also observed in the anterior CC at 8 and 12 months in very precise locations confirming the local alteration of the anterior CC that could not be detected with atlas-based approach.

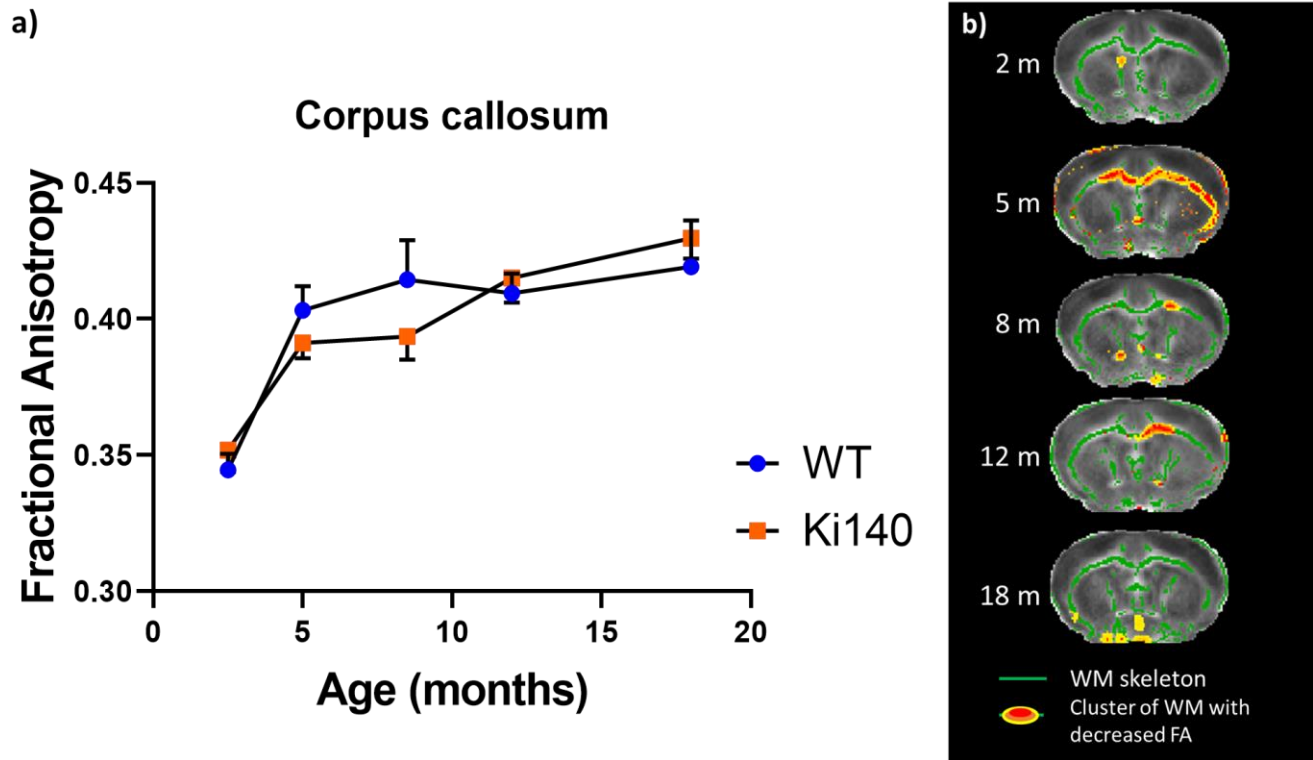


Figure 6: **a.** FA values measured in CC of WT and Ki140CAG mice as a function of time (blue and orange dots respectively, mean \pm SEM). **b.** FA alterations in white matter as revealed by TBSS analysis, at each time-point, on an anterior slice of the mouse brain. Green regions represent mean white matter skeleton as used in TBSS pipeline. Red-yellow zones show clusters of voxels with significant decrease of FA (Threshold-free cluster enhancement, $p < 0.05$).

3.4 Integration of affected structures within anatomical networks

In order to further explore the importance of the connections between brain regions, we confronted our results to Allen Connectivity Atlas⁶². Precisely, the matrix assessing the normalized strength of axonal projections between all the regions of the mouse brain, available from Oh et al.⁶², was represented using graph theory. **Figure 7** represents physical connections in the mouse brain as derived from Oh et al.⁶² as a network of structures linked with axonal projections. Position of the regions were determined in an unbiased way by force atlas algorithm. Large structures, similar to those we used in our MRI atlas, were identified in this graph (**Fig. 7**, encircled areas). Interestingly, the Caudate-Putamen (CP) is central in the graph, showing its importance in terms of connections with surrounding structures such as Frontal Cortex, Motor Cortex or Pallidum. In order to summarize findings of this study, we superimposed on this network all structures that were found to be altered in one of the MRI modalities (**Fig. 7**, in blue for gluCEST defects, violet for MT defects and green for atrophy). Colored arrows, representing projection from an affected region, seem to link striatal and cortical regions. This representation merging brain connectivity and altered regions identified using our multimodal MRI approach indicates that damaged/dysfunctional structures/pathways in the HD model belong to a relevant anatomical network.

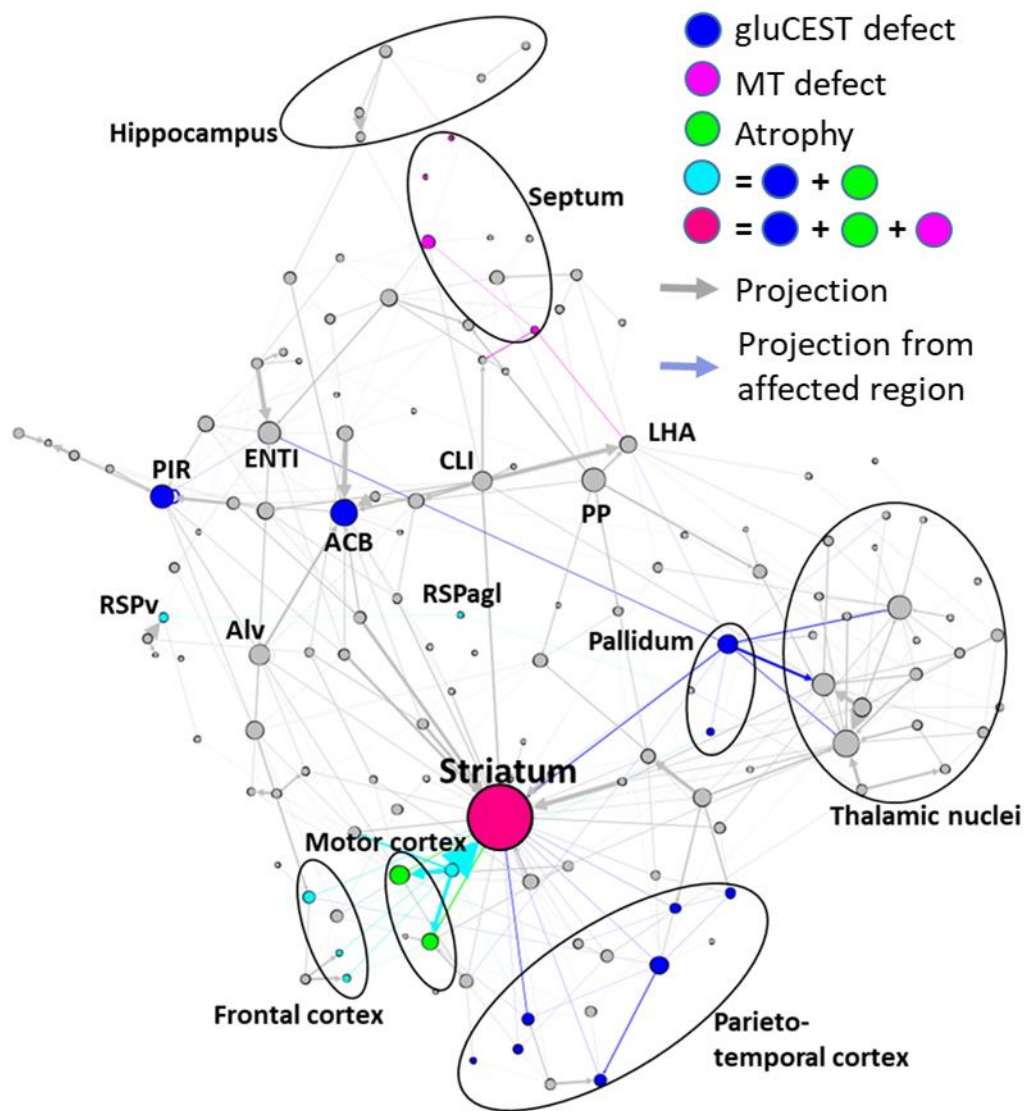


Figure 7: Summary of main results overlaid with graph-theory representation of axonal projection atlas of the mouse brain. Grey arrows and dots represent axonal projections and regions respectively. Colored dots represent affected regions according to our results. Colored arrows represent axonal projections between affected regions and can be associated with white matter alterations. For clarity, only highest degree nodes and affected nodes are labeled. ACB: Nucleus Accumbens; Alv: Alveus; CLI: Central linear nuclei raphe; ENTI: Lateral entorhinal area; LHA: Lateral hypothalamic area; PIR: Piriform area; PP: Peripeduncular nucleus; RSPv: Ventral retrosplenial area; RSPagl: Lateral agranular retrosplenial area.

4. Discussion

4.1 Ki140CAG as a slowly progressive mouse model of HD

Knock-in models of HD, especially the Ki140CAG model, have been designed and generated through homologous recombination to faithfully replicate the human genetic defect in the mouse HdH gene. This model, along other Knock-in models, is characterized by a mild progression of the disease, as compared to transgenic models where a short fragment of the mutant human HTT gene is inserted randomly in the mouse genome (e.g. R6/2, R6/1 and 171-82Q mice^{54,66}). The Ki140CAG model has already been characterized by slow progression of locomotor performances, behavioral, cellular and molecular abnormalities associated with neurodegeneration⁵³. Moreover, we demonstrated in a previous study that both heterozygous and homozygous Ki140CAG mice exhibit a significant alteration of their metabolic profiles in the striatum as compared to WT littermate controls at 12 months of age.

More interestingly, gluCEST imaging revealed that the CC is the most affected structure in both genotypes, suggesting that this structure is preferentially affected in HD and might play a major role in the physiopathology of the disease⁵². However, this study only focused on 12-month old mice while numerous studies demonstrated that variations of MRI/MRS indexes or biomarkers are not constant overtime⁶⁷. Consequently, we thought it was crucial to characterize these changes longitudinally to identify the most relevant biomarkers to monitor disease progression. Indeed, such biomarkers could be of high value to assess the efficacy of experimental therapeutics over time in preclinical trials in genetic rodent models of HD, and if translatable to clinical set ups, they could be a great help in clinical trials.

In the present study, we monitored longitudinally several potential biomarkers to better understand the physiopathology in this particular mouse model of HD. The most commonly used biomarker to characterize HD progression in m-HTT gene carriers is striatal atrophy. In our knock-in model, striatal atrophy is detected only at 18 months (~5% range with approximately 10 animals per group). Based on our results, we could estimate the sample size to compare groups of control and Ki140CAG models assuming a significance level of 5%, a power of 80%, and two-sided tests. Our results showed that 120 animals would be necessary to detect an effect at 12 months.

Similarly, in human studies, the number of premanifest mutant HTT gene carriers or early stage HD patients to be included to observe a significant atrophy of their striatum is high (>30)⁶⁸. Apart from striatal atrophy we found other indexes that seem to be more sensitive with first FA alterations measured as early as 5 months of age in the anterior CC, followed with gluCEST defect at 8 months in the same structure. Our results support the progressivity of the pathogenesis in the Ki140CAG model and highlight the slight progression of the disease in heterozygous mice, making it a great model for the study of early phase of the disease and for the evaluation of new experimental therapeutics with reasonable number of animal per groups.

4.2 Identification of molecular biomarkers of HD

From the perspective of identifying relevant and early biological markers of HD, molecules related to energy metabolism and neurotransmission are likely good candidates since it is conceivable that their alteration could occur before actual neurodegeneration associated with major cell shrinkage and/or death of brain cells⁶⁹. Glutamate is an amino acid present in high concentrations in the brain. It is involved in numerous brain functions and plays a major role in brain energy metabolism. [Glu] as measured using ¹H-MRS has been reported to be affected in the striatum and cortex of HD patients, with conflicting results on whether it increases or decreases^{70,71}. [Glu] decreases in the striatum have also been observed in zQ175 and R6/2 mice^{44,45,72,73}. We found similar reduction in [Glu] in the striatum of Ki140 mice^{52,74}. However, due to inherently low spatial resolution of ¹H-MRS, observations have been limited to striatum and cortex. Here, we could evaluate glutamate changes at the whole brain level using gluCEST imaging. This method is able to capture subtle variations of [Glu] with a high spatial resolution and a rather good specificity. Indeed, previous studies demonstrated that approximately 70% of gluCEST contrast originate from Glu⁴⁹. In a previous study, we showed that gluCEST imaging is able to map deficiencies linked to glutamate content in 12 month-old Ki140CAG mice⁵². In particular, it detected reduced contrast in the CC of 12-months old heterozygous mice, with increased severity in age-matched homozygous mice. In the present study, with a new cohort of Ki140 mice, we confirmed the 18.8% decrease of gluCEST contrast measured at 12 months in the CC when compared to wild type littermates confirming the good reproducibility of such measurements. We also show that a significant 10.8% decrease of gluCEST contrast can be observed earlier in the anterior part of the CC at 8 months of age. Noticeably, this reduction in gluCEST signal does not result from a “partial volume” bias, since morphometric measures showed the CC volume was similar in Ki140 mice and controls. Interestingly, following timepoints showed a spreading of gluCEST decrease to surrounding structures, such as the motor and piriform cortices, and subcortical nuclei, including the pallidum and the striatum. We hypothesize that this defect is an early manifestation of alteration of the axonal projections between motor cortex and striatum that pass through the anterior corpus callosum as shown in **Figure 8**. Indeed, **Figure 8.a** shows the cortico-striatal and inter-hemispheric tracts isolated using locally-constrained tractography on a representative dataset from this study. Out of 100,000 total streamlines used in whole brain tractography, 8575 were part of the CC, while 5320 were part of both the CC and the cortico-striatal tract. Thus, we can estimate a proportion of about 5320/8575 ~ 62% of streamlines in the CC going through the cortico-striatal tract. The estimation of streamlines

belonging to cortico-striatal tract passing through the CC suggests that this specific tract is not negligible in this area of the CC and alterations may be picked out by our measurements. In addition, **Figure 8.b** supports this idea by showing the projections from Primary Motor Area of motor cortex, using more precise cell tracking technique (Allen Connectivity Atlas) with a good correlation to tractography shown in **Figure 8.a**.

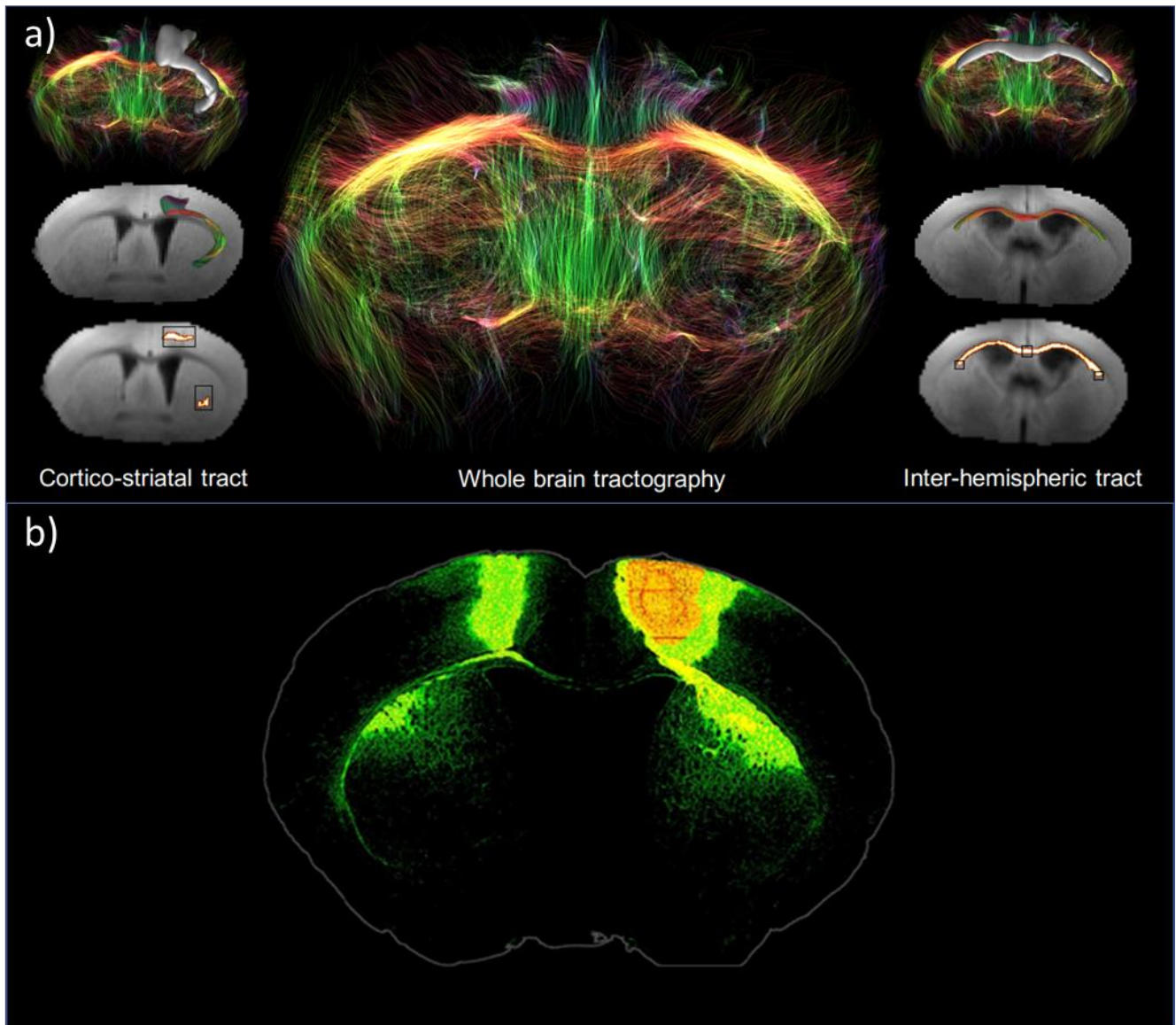


Figure 8: a. White Matter tracts isolated from the whole brain tractography of a representative dataset using locally-constrained tractography. Black boxes show starting and ending regions-of-interest (ROIs). White voxels show fibers satisfying this criterion. **b.** Axonal projections from Primary Motor Area. Extracted from Allen Connectivity Atlas (<https://connectivity.brain-map.org/projection>).

Complementarily to gluCEST, MT is based on the exchange of magnetization between free-water protons and protons of water bound to proteins such as myelin³⁶. Thus, MT signal can be another potential candidate for biomarker identification. Reduced MT contrast can be symptomatic of disruption of myelin sheath or axonal loss^{36,75}. In HD, decreased MT contrast was found in grey matter and white matter of pre-symptomatic gene carriers and HD patients, with correlation between MT loss and disease severity^{76,77}.

In this study, we reported for the first time MT defects in a mouse model of HD, especially in the septum and in the striatum. Such decrease of MT contrast could reflect alteration of myelin contents in affected brain structures as already reported in pre-symptomatic and symptomatic m-HTT gene carriers⁷⁸.

4.3 Altered diffusion in corpus callosum expose the key role of white matter in HD pathogenesis

FA is the most commonly used index to study defects related to microstructural organization. Diffusion of water molecules within WM is highly anisotropic due to strong organization of highly myelinated fibers tracks, providing high FA values. In this study, we observed several clusters of reduced FA values in the anterior part of the CC of Ki140CAG mice at different ages (**Fig. 6.a**). Such results argue in favor of preferential alteration of WM integrity, especially in the anterior part of the CC. Even if interpretation of FA changes is not straightforward⁷⁹, several studies have already showed similar decrease of FA values in the WM of HD patients^{33,80}. Significant alteration of FA and other diffusion parameters were also observed in premanifest HD gene carriers, with a good correlation with WM atrophy⁸¹. Similar decrease of FA value was also observed in WM of YAC128 mice as early as 2 weeks of age^{21,22,82}. In our study, we only observed a relatively small part of the CC with reduced FA value. Besides, no variation of CC volume or RD and AD was measured in Ki140CAG but this could be due to limited size of our animal cohorts or to anisotropic voxels used in our study that could bring partial volume effect.

Surprisingly, our results showed a reduction of the difference of FA values between Ki140CAG and WT mice over time (**Fig. 6.b**). Such observation was not consistent with the literature^{21,22,82}. However, one possible explanation is the difference in WM maturation between Ki140CAG mice and their WT littermates. Indeed, development of cortico-striatal tracts was shown affected in Ki111CAG animals^{83,84} so FA values at early timepoints may be reduced as compared with control animals. Recently, developmental origin of HD has been thoroughly discussed^{83–86}. Cortical progenitor cells from Ki111CAG mice and human gene carriers have shown impaired division in the developmental phase^{83,87}. Compensatory mechanisms may occur in the early life of mice to compensate maturation/developmental defects. However, cortico-striatal projections may remain vulnerable and could explain metabolic impairments observed at 8 months of age.

4.4 Identification of a vulnerable network of brain structures in Ki140CAG mice

In the present study, we performed a longitudinal follow-up of heterozygous Ki140CAG mice with several MRI modalities in order to monitor potential alterations of tissue microstructure, metabolic or energetic defects, and morphological changes of brain structures. Rather than taking these results separately, integrating both structural and functional data may result in a better understanding of the pathogenesis of HD in the Ki140CAG mouse model. We observed that cortical and striatal regions were vulnerable in terms of both atrophy and metabolic changes. In addition, DTI and gluCEST highlighted early WM changes in the anterior part of the CC. Interestingly, striatum and frontal cortex are anatomically connected through the anterior part of the CC and cortico-striatal connections have been shown to be impaired in HD patients as well as in animal models^{88–91}. Our findings corroborate these results and could reflect specific alteration of such connections in the Ki140CAG mouse model.

Thanks to the representation on **Figure 7**, one can observe that striatum seems to be particularly vulnerable as it appears to be affected on several MRI indexes. Moreover, this vulnerability seems to be associated with its centrality in the network and connection strength to cortical tissues that are also affected, through white matter tracts that are early affected.

Based on temporality of the observed modifications and from results found in the literature, we hypothesize that our longitudinal, multiparametric MRI protocol was able to image the vulnerability of the cortico-striato-thalamic glutamatergic pathway⁹², which is known to be impaired in HD. Metabolic and diffusion deficiencies that appear in the white matter might be related to alterations found at the cortico-striatal synapse between Cortical Pyramidal Neurons (CPNs) and Medium Spiny Neurons (MSNs). These alterations include diminished Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) transport, increased glutamate neurotransmission, altered NMDA receptors transcription and reduced Ca²⁺ uptake from mitochondria, that together lead to vulnerability of MSNs to excitotoxicity⁹³. Such hypothesis would need further validations with histopathological study to confirm the status of WM tracks at different ages.

5. Conclusion

In this study, we developed a multimodal MRI protocol to identify biomarkers of HD pathogenesis. This protocol was applied to monitor longitudinally heterozygous Ki140CAG mice, a slowly progressive mouse model of HD. Thanks to this multimodal approach, we identified early defects in striatal and cortical tissues. Interestingly, MT and gluCEST modalities seemed to be earlier indicator of pathology progression than structure atrophy. Moreover, combination of all results obtained with different MRI modalities were integrated to propose a specific brain network that would be particularly vulnerable in this animal model. As most of these modalities have already been applied on clinical scanners, such approach would be particularly interesting to assess disease progression in a clinical context of HD. This might help identifying more relevant and early biomarkers in premanifest HD patients and could provide relevant information about disease pathogenesis.

6. Acknowledgments

This work was supported by two grants from Agence Nationale pour la Recherche (“HDeNERGY” project ANR-14-CE15-0007-01 and “epiHD” project ANR-17-CE12-0027) and one grant from the ERA-Net for Research Programs on Rare Diseases (“TreatPolyQ” project ANR-17-RAR3-0008-01). The 11.7T MRI scanner was funded by a grant from NeurATRIS: A Translational Research Infrastructure for Biotherapies in Neurosciences (“Investissements d’Avenir”, ANR-11-INBS-0011). MP is supported by UKRI Future Leaders Fellowship MR/T020296/1.

References




1. Walker, F. O. Huntington's disease. *Lancet Lond. Engl.* **369**, 218–228 (2007).
2. Liot, G., Valette, J., Pépin, J., Flament, J. & Brouillet, E. Energy defects in Huntington's disease: Why 'in vivo' evidence matters. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **483**, 1084–1095 (2017).
3. Dubinsky, J. M. Towards an Understanding of Energy Impairment in Huntington's Disease Brain. *J. Huntingt. Dis.* **6**, 267–302 (2017).
4. Paoli, R. A. *et al.* Neuropsychiatric Burden in Huntington's Disease. *Brain Sci.* **7**, (2017).
5. Stout, J. C. *et al.* Neurocognitive signs in prodromal Huntington disease. *Neuropsychology* **25**, 1–14 (2011).
6. Hogarth, P. *et al.* Interrater agreement in the assessment of motor manifestations of Huntington's disease. *Mov. Disord.* **20**, 293–297 (2005).
7. Tabrizi, S. J. *et al.* Potential endpoints for clinical trials in premanifest and early Huntington's disease in the TRACK-HD study: analysis of 24 month observational data. *Lancet Neurol.* **11**, 42–53 (2012).
8. BIRD, E. D. & IVERSEN, L. L. HUNTINGTON'S CHOREA: POST-MORTEM MEASUREMENT OF GLUTAMIC ACID DECARBOXYLASE, CHOLINE ACETYLTRANSFERASE AND DOPAMINE IN BASAL GANGLIA. *Brain* **97**, 457–472 (1974).
9. Vonsattel, J.-P. *et al.* Neuropathological Classification of Huntington's Disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **44**, 559–577 (1985).
10. Kuhl, D. E. *et al.* Cerebral metabolism and atrophy in Huntington's disease determined by 18FDG and computed tomographic scan. *Ann. Neurol.* **12**, 425–434 (1982).
11. Brouillet, E., F, C., Mf, B. & P, H. Replicating Huntington's disease phenotype in experimental animals. *Prog. Neurobiol.* **59**, 427–468 (1999).
12. Tabrizi, S. J. *et al.* 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 (2013).
13. Aylward, E. H. *et al.* Onset and rate of striatal atrophy in preclinical Huntington disease. *Neurology* **63**, 66–72 (2004).
14. Paulsen, J. S. *et al.* Detection of Huntington's disease decades before diagnosis: the Predict-HD study. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **79**, 874–880 (2008).
15. Kipps, C. M. *et al.* Progression of structural neuropathology in preclinical Huntington's disease: a tensor based morphometry study. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **76**, 650–655 (2005).
16. Gómez-Ansón, B. *et al.* Prefrontal cortex volume reduction on MRI in preclinical Huntington's disease relates to visuomotor performance and CAG number. *Parkinsonism Relat. Disord.* **15**, 213–219 (2009).
17. Paulsen, J. S. *et al.* Striatal and white matter predictors of estimated diagnosis for Huntington disease. *Brain Res. Bull.* **82**, 201–207 (2010).
18. Crawford, H. E. *et al.* Corpus callosal atrophy in premanifest and early Huntington's disease. *J. Huntingt. Dis.* **2**, 517–526 (2013).
19. Gregory, S. *et al.* Natural biological variation of white matter microstructure is accentuated in Huntington's disease. *Hum. Brain Mapp.* **39**, 3516–3527 (2018).
20. Dumas, E. M. *et al.* Early changes in white matter pathways of the sensorimotor cortex in premanifest Huntington's disease. *Hum. Brain Mapp.* **33**, 203–212 (2011).
21. Teo, R. T. Y. *et al.* Structural and molecular myelination deficits occur prior to neuronal loss in the YAC128 and BACHD models of Huntington disease. *Hum. Mol. Genet.* **25**, 2621–2632 (2016).
22. Garcia-Miralles, M. *et al.* Laquinimod rescues striatal, cortical and white matter pathology and results in modest behavioural improvements in the YAC128 model of Huntington disease. *Sci. Rep.* **6**, 31652 (2016).
23. Huang, B. *et al.* Mutant huntingtin downregulates myelin regulatory factor-mediated myelin gene expression and affects mature oligodendrocytes. *Neuron* **85**, 1212–1226 (2015).
24. Bartzokis, G. *et al.* Myelin breakdown and iron changes in Huntington's disease: pathogenesis and treatment implications. *Neurochem. Res.* **32**, 1655–1664 (2007).
25. Casella, C., Lipp, I., Rosser, A., Jones, D. K. & Metzler-Baddeley, C. A Critical Review of White Matter Changes in Huntington's Disease. *Mov. Disord.* **35**, 1302–1311 (2020).

26. Zhang, J. *et al.* In vivo characterization of white matter pathology in premanifest huntington's disease. *Ann. Neurol.* **84**, 497–504 (2018).
27. Gregory, S. *et al.* Characterizing White Matter in Huntington's Disease. *Mov. Disord. Clin. Pract.* **7**, 52–60 (2020).
28. Le Bihan, D. Looking into the functional architecture of the brain with diffusion MRI. *Nat. Rev. Neurosci.* **4**, 469–480 (2003).
29. Sen, P. N. & Basser, P. J. A Model for Diffusion in White Matter in the Brain. *Biophys. J.* **89**, 2927–2938 (2005).
30. Le Bihan, D. & Johansen-Berg, H. Diffusion MRI at 25: exploring brain tissue structure and function. *NeuroImage* **61**, 324–341 (2012).
31. Gregory, S. *et al.* Longitudinal Diffusion Tensor Imaging Shows Progressive Changes in White Matter in Huntington's Disease. *J. Huntingt. Dis.* **4**, 333–346 (2015).
32. Rosas, H. D. *et al.* Complex spatial and temporally defined myelin and axonal degeneration in Huntington disease. *NeuroImage Clin.* **20**, 236–242 (2018).
33. Poudel, G. R. *et al.* Longitudinal change in white matter microstructure in Huntington's disease: The IMAGE-HD study. *Neurobiol. Dis.* **74**, 406–412 (2015).
34. Ou, X., Sun, S.-W., Liang, H.-F., Song, S.-K. & Gochberg, D. F. Quantitative Magnetization Transfer Measured Pool Size Ratio Reflects Optic Nerve Myelin Content in ex vivo Mice. *Magn. Reson. Med. Off. J. Soc. Magn. Reson. Med. Soc. Magn. Reson. Med.* **61**, 364–371 (2009).
35. van Zijl, P. C. M., Lam, W. W., Xu, J., Knutsson, L. & Staniszc, G. J. Magnetization Transfer Contrast and Chemical Exchange Saturation Transfer MRI. Features and analysis of the field-dependent saturation spectrum. *NeuroImage* **168**, 222–241 (2018).
36. Tambasco, N. *et al.* Magnetization transfer MRI in dementia disorders, Huntington's disease and parkinsonism. *J. Neurol. Sci.* **353**, 1–8 (2015).
37. Bourbon-Teles, J. *et al.* Myelin Breakdown in Human Huntington's Disease: Multi-Modal Evidence from Diffusion MRI and Quantitative Magnetization Transfer. *Neuroscience* **403**, 79–92 (2019).
38. Chaney, A., Williams, S. R. & Boutin, H. In vivo molecular imaging of neuroinflammation in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **149**, 438–451 (2019).
39. Graham, S. F. *et al.* Biochemical Profiling of the Brain and Blood Metabolome in a Mouse Model of Prodromal Parkinson's Disease Reveals Distinct Metabolic Profiles. *J. Proteome Res.* **17**, 2460–2469 (2018).
40. Mochel, F. *et al.* Early Alterations of Brain Cellular Energy Homeostasis in Huntington Disease Models. *J. Biol. Chem.* **287**, 1361–1370 (2012).
41. Sturrock, A. *et al.* Magnetic resonance spectroscopy biomarkers in premanifest and early Huntington disease. *Neurology* **75**, 1702–1710 (2010).
42. Zacharoff, L. *et al.* Cortical metabolites as biomarkers in the R6/2 model of Huntington's disease. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **32**, 502–514 (2012).
43. Jenkins, B. G. *et al.* Effects of CAG repeat length, HTT protein length and protein context on cerebral metabolism measured using magnetic resonance spectroscopy in transgenic mouse models of Huntington's disease. *J. Neurochem.* **95**, 553–562 (2005).
44. Tkac, I., Dubinsky, J. M., Keene, C. D., Gruetter, R. & Low, W. C. Neurochemical changes in Huntington R6/2 mouse striatum detected by in vivo 1H NMR spectroscopy. *J. Neurochem.* **100**, 1397–1406 (2007).
45. Heikkinen, T. *et al.* Characterization of neurophysiological and behavioral changes, MRI brain volumetry and 1H MRS in zQ175 knock-in mouse model of Huntington's disease. *PLoS One* **7**, e50717 (2012).
46. Wolff, S. D. & Balaban, R. S. Regulation of the predominant renal medullary organic solutes in vivo. *Annu. Rev. Physiol.* **52**, 727–746 (1990).
47. Ward, K. M., Aletras, A. H. & Balaban, R. S. A new class of contrast agents for MRI based on proton chemical exchange dependent saturation transfer (CEST). *J. Magn. Reson. San Diego Calif 1997* **143**, 79–87 (2000).
48. Ward, K. M. & Balaban, R. S. Determination of pH using water protons and chemical exchange dependent saturation transfer (CEST). *Magn. Reson. Med.* **44**, 799–802 (2000).
49. Cai, K. *et al.* Magnetic Resonance Imaging of Glutamate. *Nat. Med.* **18**, 302–306 (2012).

50. Cai, K. *et al.* Mapping glutamate in subcortical brain structures using high-resolution GluCEST MRI. *NMR Biomed.* **26**, 1278–1284 (2013).
51. Carrillo-de Sauvage, M.-A. *et al.* The neuroprotective agent CNTF decreases neuronal metabolites in the rat striatum: an in vivo multimodal magnetic resonance imaging study. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* **35**, 917–921 (2015).
52. Pépin, J. *et al.* In vivo imaging of brain glutamate defects in a knock-in mouse model of Huntington's disease. *NeuroImage* **139**, 53–64 (2016).
53. Menalled, L. B., Sison, J. D., Dragatsis, I., Zeitlin, S. & Chesselet, M.-F. 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 (2003).
54. Menalled, L. B. & Chesselet, M.-F. Mouse models of Huntington's disease. *Trends Pharmacol. Sci.* **23**, 32–39 (2002).
55. Hickey, M. A. *et al.* 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 (2008).
56. Kim, M., Gillen, J., Landman, B. A., Zhou, J. & van Zijl, P. C. M. Water saturation shift referencing (WASSR) for chemical exchange saturation transfer (CEST) experiments. *Magn. Reson. Med.* **61**, 1441–1450 (2009).
57. Celestine, M., Nadkarni, N. A., Garin, C. M., Bougacha, S. & Dhenain, M. Samba-MRI: A Library for Processing SmAll-MaMmal BrAin MRI Data in Python. *Front. Neuroinformatics* **14**, (2020).
58. Lein, E. S. *et al.* Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature* **445**, 168–176 (2007).
59. Liu, G., Gilad, A. A., Bulte, J. W. M., Zijl, P. C. M. van & McMahon, M. T. High-throughput screening of chemical exchange saturation transfer MR contrast agents. *Contrast Media Mol. Imaging* **5**, 162–170 (2010).
60. Smith, S. M. *et al.* Tract-based spatial statistics: voxelwise analysis of multi-subject diffusion data. *NeuroImage* **31**, 1487–1505 (2006).
61. Smith, S. M. *et al.* Advances in functional and structural MR image analysis and implementation as FSL. *NeuroImage* **23**, S208–S219 (2004).
62. Oh, S. W. *et al.* A mesoscale connectome of the mouse brain. *Nature* **508**, 207–214 (2014).
63. Yeh, F.-C., Wedeen, V. J. & Tseng, W.-Y. I. Generalized q-sampling imaging. *IEEE Trans. Med. Imaging* **29**, 1626–1635 (2010).
64. Yeh, F.-C., Verstynen, T. D., Wang, Y., Fernández-Miranda, J. C. & Tseng, W.-Y. I. Deterministic diffusion fiber tracking improved by quantitative anisotropy. *PLoS One* **8**, e80713 (2013).
65. Crescenzi, R. *et al.* Longitudinal imaging reveals sub-hippocampal dynamics in glutamate levels associated with histopathologic events in a mouse model of tauopathy and healthy mice. *Hippocampus* **27**, 285–302 (2017).
66. Menalled, L. B. Knock-in mouse models of Huntington's disease. *NeuroRx J. Am. Soc. Exp. Neurother.* **2**, 465–470 (2005).
67. Tkac, I. *et al.* Homeostatic adaptations in brain energy metabolism in mouse models of Huntington disease. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **32**, 1977–1988 (2012).
68. Scahill, R. I. *et al.* Biological and clinical characteristics of gene carriers far from predicted onset in the Huntington's disease Young Adult Study (HD-YAS): a cross-sectional analysis. *Lancet Neurol.* **19**, 502–512 (2020).
69. Bonvento, G., Valette, J., Flament, J., Mochel, F. & Brouillet, E. Imaging and spectroscopic approaches to probe brain energy metabolism dysregulation in neurodegenerative diseases. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **37**, 1927–1943 (2017).
70. van den Bogaard, S. J. A. *et al.* Exploratory 7-Tesla magnetic resonance spectroscopy in Huntington's disease provides in vivo evidence for impaired energy metabolism. *J. Neurol.* **258**, 2230–2239 (2011).
71. van den Bogaard, S. J. A. *et al.* Longitudinal metabolite changes in Huntington's disease during disease onset. *J. Huntingt. Dis.* **3**, 377–386 (2014).
72. Jenkins, B. G. *et al.* Nonlinear decrease over time in N-acetyl aspartate levels in the absence of neuronal loss and increases in glutamine and glucose in transgenic Huntington's disease mice. *J. Neurochem.* **74**, 2108–2119 (2000).

73. Peng, Q. *et al.* Characterization of Behavioral, Neuropathological, Brain Metabolic and Key Molecular Changes in zQ175 Knock-In Mouse Model of Huntington's Disease. *PLOS ONE* **11**, e0148839 (2016).
74. Pépin, J. *et al.* Complementarity of gluCEST and 1 H-MRS for the study of mouse models of Huntington's disease. *NMR Biomed.* e4301 (2020) doi:10.1002/nbm.4301.
75. Anik, Y., Iseri, P., Demirci, A., Komsuoglu, S. & Inan, N. Magnetization Transfer Ratio in Early Period of Parkinson Disease. *Acad. Radiol.* **14**, 189–192 (2007).
76. van den Bogaard, S., Dumas, E., van der Grond, J., van Buchem, M. & Roos, R. MRI biomarkers in Huntington's disease. *Front. Biosci. Elite Ed.* **4**, 1910–1925 (2012).
77. van den Bogaard, S. J. A. *et al.* Magnetization transfer imaging in premanifest and manifest huntington disease: a 2-year follow-up. *AJNR Am. J. Neuroradiol.* **34**, 317–322 (2013).
78. Di Paola, M. *et al.* MRI measures of corpus callosum iron and myelin in early Huntington's disease. *Hum. Brain Mapp.* **35**, 3143–3151 (2014).
79. Wheeler-Kingshott, C. A. M. & Cercignani, M. About “axial” and “radial” diffusivities. *Magn. Reson. Med.* **61**, 1255–1260 (2009).
80. Diana Rosas, H. *et al.* Altered White Matter Microstructure in the Corpus Callosum in Huntington's Disease: implications for cortical “disconnection”. *NeuroImage* **49**, 2995–3004 (2010).
81. Novak, M. J. U. *et al.* White matter integrity in premanifest and early Huntington's disease is related to caudate loss and disease progression. *Cortex J. Devoted Study Nerv. Syst. Behav.* **52**, 98–112 (2014).
82. Petrella, L. I. *et al.* A whole brain longitudinal study in the YAC128 mouse model of Huntington's disease shows distinct trajectories of neurochemical, structural connectivity and volumetric changes. *Hum. Mol. Genet.* **27**, 2125–2137 (2018).
83. Barnat, M. *et al.* Huntington's disease alters human neurodevelopment. *Science* **369**, 787–793 (2020).
84. Molina-Calavita, M. *et al.* Mutant Huntingtin Affects Cortical Progenitor Cell Division and Development of the Mouse Neocortex. *J. Neurosci.* **34**, 10034–10040 (2014).
85. Wiatr, K., Szlachcic, W. J., Trzeciak, M., Figlerowicz, M. & Figiel, M. Huntington Disease as a Neurodevelopmental Disorder and Early Signs of the Disease in Stem Cells. *Mol. Neurobiol.* **55**, 3351–3371 (2018).
86. Zhang, C. *et al.* Abnormal Brain Development in Huntington' Disease Is Recapitulated in the zQ175 Knock-In Mouse Model. *Cereb. Cortex Commun.* **1**, tgaa044 (2020).
87. Barnat, M., Le Fric, J., Benstaali, C. & Humbert, S. Huntingtin-Mediated Multipolar-Bipolar Transition of Newborn Cortical Neurons Is Critical for Their Postnatal Neuronal Morphology. *Neuron* **93**, 99–114 (2017).
88. Hong, S. L. *et al.* Dysfunctional Behavioral Modulation of Corticostriatal Communication in the R6/2 Mouse Model of Huntington's Disease. *PLOS ONE* **7**, e47026 (2012).
89. Naze, S. *et al.* Cortico-Striatal Cross-Frequency Coupling and Gamma Genesis Disruptions in Huntington's Disease Mouse and Computational Models. *eNeuro* **5**, (2018).
90. Rebec, G. V. Corticostriatal network dysfunction in Huntington's disease: Deficits in neural processing, glutamate transport, and ascorbate release. *CNS Neurosci. Ther.* **24**, 281–291 (2018).
91. Blumenstock, S. & Dudanova, I. Cortical and Striatal Circuits in Huntington's Disease. *Front. Neurosci.* **14**, (2020).
92. Schwartz, T. L., Sachdeva, S. & Stahl, S. M. Glutamate Neurocircuitry: Theoretical Underpinnings in Schizophrenia. *Front. Pharmacol.* **3**, (2012).
93. Fan, M. M. Y. & Raymond, L. A. N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor function and excitotoxicity in Huntington's disease. *Prog. Neurobiol.* **81**, 272–293 (2007).

SCA7 Mouse Cerebellar Pathology Reveals Preferential Downregulation of Key Purkinje Cell-Identity Genes and Shared Disease Signature with SCA1 and SCA2

Anna Niewiadomska-Cimicka,^{1,2,3,4}  Frédéric Doussau,^{4,5} Jean-Baptiste Perot,⁶ Michel J. Roux,^{1,2,3,4}  Celine Keime,^{1,2,3,4} Antoine Hache,^{1,2,3,4} Françoise Pigué,^{1,2,3,4} Ariana Novati,^{7,8} Chantal Weber,^{1,2,3,4} Binnaz Yalcin,^{1,2,3,4} Hamid Meziane,^{2,3,4,9} Marie-France Champy,^{2,3,4,9} Erwan Grandgirard,^{1,2,3,4} Alice Karam,^{1,2,3,4} Nadia Messaddeq,^{1,2,3,4} Aurélie Eisenmann,^{1,2,3,4} Emmanuel Brouillet,⁶ Hoa Huu Phuc Nguyen,^{7,8} Julien Flament,⁶  Philippe Isope,^{4,5} and Yvon Trottier^{1,2,3,4}

¹Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Illkirch 67404, France, ²Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 7104, Illkirch 67404, France, ³Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Illkirch 67404, U964, France, ⁴Université de Strasbourg, Illkirch 67404, France, ⁵Centre National de la Recherche Scientifique UPR3212, Strasbourg 67000, France, ⁶Université Paris-Saclay, Centre National de la Recherche Scientifique, Commissariat à l’Energie Atomique, Direction de la Recherche Fondamentale, Institut de biologie François Jacob, Molecular Imaging Research Center, Neurodegenerative Diseases Laboratory, Fontenay-aux-Roses 92260, France, ⁷Institute of Medical Genetics and Applied Genomics, University of Tuebingen, Tuebingen 72076, Germany, ⁸Department of Human Genetics, Medical Faculty, Ruhr University Bochum, Bochum 44801, Germany, and ⁹Celphedia, Phenomin, Institut Clinique de la Souris, Illkirch 67404, France

Spinocerebellar ataxia type 7 (SCA7) is an inherited neurodegenerative disease mainly characterized by motor incoordination because of progressive cerebellar degeneration. SCA7 is caused by polyglutamine expansion in ATXN7, a subunit of the transcriptional coactivator SAGA, which harbors histone modification activities. Polyglutamine expansions in specific proteins are also responsible for SCA1-SCA3, SCA6, and SCA17; however, the converging and diverging pathomechanisms remain poorly understood. Using a new SCA7 knock-in mouse, SCA7^{140Q/5Q}, we analyzed gene expression in the cerebellum and assigned gene deregulation to specific cell types using published datasets. Gene deregulation affects all cerebellar cell types, although at variable degree, and correlates with alterations of SAGA-dependent epigenetic marks. Purkinje cells (PCs) are by far the most affected neurons and show reduced expression of 83 cell-type identity genes, including these critical for their spontaneous firing activity and synaptic functions. PC gene downregulation precedes morphologic alterations, pacemaker dysfunction, and motor incoordination. Strikingly, most PC genes downregulated in SCA7 have also decreased expression in SCA1 and SCA2 mice, revealing converging pathomechanisms and a common disease signature involving cGMP-PKG and phosphatidylinositol signaling pathways and LTD. Our study thus points out molecular targets for therapeutic development, which may prove beneficial for several SCAs. Furthermore, we show that SCA7^{140Q/5Q} males and females exhibit the major disease features observed in patients, including cerebellar damage, cerebral atrophy, peripheral nerves pathology, and photoreceptor dystrophy, which account for progressive impairment of behavior, motor, and visual functions. SCA7^{140Q/5Q} mice represent an accurate model for the investigation of different aspects of SCA7 pathogenesis.

Key words: SCA7; cell type-specific gene deregulation; Purkinje cells; polyglutamine expansion; cerebellum; retinopathy

Received July 15, 2020; revised Mar. 3, 2021; accepted Mar. 5, 2021.

Author contributions: A.N.C. and Y.T. designed research; A.N.C., A.E., A.H., A.K., A.N., B.Y., C.K., C.W., E.G., F.D., F.P., H.M., J.B.P., M.F.C., M.J.R. and N.M. performed research; A.N.C., E.B., H.H.P.N., J.F., P.I., and Y.T. analyzed data; A.N.C. and Y.T. wrote the paper; All authors edited the paper.

This work was supported by European Union Joint Program—Neurodegenerative Disease Research Project ModelPolyQ Grant Agreement 643417 jointly funded by national funding organizations: ANR-15-JPWG-0008-03 to Y.T. and BMBF 01ED1606 to H.H.P.N.; E-Rare Research Program, which is a transnational R&D program jointly funded by national funding organizations within the framework of the ERA-NET E-Rare 3 to Y.T., H.H.P.N., and E.B.; French foundation Connaître les Syndromes Cérébelleux to Y.T.; ANR-17-RAR3-0008-04_ACT and ANR-18-CE12-0026-02 to Y.T.; ANR-CE37-2015 (CeMod) and Fondation pour la Recherche Médicale (Equipes FRM DEQ20140329514) to P.I.; and ANR-10-LABX-0030-INRT under the frame program Investissements d’Avenir labeled ANR-10-IDEX-0002-02 (to Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire). The 11.7T MRI scanner was funded by a grant from NeurATRIS: A Translational Research Infrastructure for Biotherapies in Neurosciences (Investissements d’Avenir, ANR-11-INBS-0011). We thank Dr. Huda Zoghbi for providing the SCA7 knock-in mice; the Mouse Clinical Institute of Illkirch for mouse

phenotyping support; the GenomEast Platform at Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, a member of the France Genomique consortium (ANR-10-INBS-0009) for processing Illumina libraries; Stephan Collins for macro allowing PC morphological analysis; Filiz Kavla, Raphaël Bour, and Christel Wagner for technical assistance; Tao Ye for fruitful discussion regarding motif enrichments; Doulaye Dembele for suggestions regarding statistical analysis; and Nathalie Daigle and Hélène Puccio for critical reading of the manuscript and fruitful discussion.

F. Pigué’s present address: NeuroGencell, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U1127, Institut du Cerveau et de la Moelle épinière, Paris 75013, France.

B. Yalcin’s present address: Inserm Unité Mixte de Recherche 1231 GAD, University of Bourgogne Franche-Comté, Dijon 21070, France.

The authors declare no competing financial interests.

Correspondence should be addressed to Yvon Trottier at yvon.trottier@igbmc.fr.

<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1882-20.2021>

Copyright © 2021 the authors

Significance Statement

Spinocerebellar ataxia 7 (SCA7) is one of the several forms of inherited SCAs characterized by cerebellar degeneration because of polyglutamine expansion in specific proteins. The ATXN7 involved in SCA7 is a subunit of SAGA transcriptional coactivator complex. To understand the pathomechanisms of SCA7, we determined the cell type-specific gene deregulation in SCA7 mouse cerebellum. We found that the Purkinje cells are the most affected cerebellar cell type and show downregulation of a large subset of neuronal identity genes, critical for their spontaneous firing and synaptic functions. Strikingly, the same Purkinje cell genes are downregulated in mouse models of two other SCAs. Thus, our work reveals a disease signature shared among several SCAs and uncovers potential molecular targets for their treatment.

Introduction

Spinocerebellar ataxia type 7 (SCA7) is an inherited neurodegenerative disorder caused by expansion of CAG repeats encoding polyglutamine (polyQ) in ATXN7 (David et al., 1997), a subunit of the SAGA transcriptional coactivator complex (Helmlinger et al., 2004). SCA7 expansions range from 34 to >200 repeats (Niewiadomska-Cimicka and Trotter, 2019), and the length of the expanded repeats correlates inversely with the onset of symptoms and positively with disease severity.

SCA7 patients show difficulty to coordinate balance, gait, and speech and present a variety of additional clinical features, including visual impairment (David et al., 1998; Martin, 2012). The pathology arises primarily from progressive damage of the cerebellum and its associated tracts, and the retina, leading to important loss of Purkinje cells (PCs) and cone and rod photoreceptors (Martin et al., 1994; Aleman et al., 2002; Michalik et al., 2004; Horton et al., 2013). Alterations of other structures of CNS and PNS are observed and may contribute to additional symptoms (van de Warrenburg et al., 2004; Rub et al., 2008; Martin, 2012; Salas-Vargas et al., 2015).

The visual impairment in SCA7 mouse models revealed a progressive loss of photoreceptor-specific gene expression, resulting in shortage of proteins necessary for renewal of outer segments (La Spada et al., 2001; Abou-Sleymane et al., 2006; Helmlinger et al., 2006; Yefimova et al., 2010). The results suggest that ATXN7 mutation compromises the maintenance of photoreceptor terminal differentiation (Niewiadomska-Cimicka and Trotter, 2019). Interestingly, knockdown of *atxn7* in zebrafish altered the differentiation of photoreceptor and PC during development (Yanicostas et al., 2012; Carrillo-Rosas et al., 2018). Whether PCs or other neurons also progressively lose their differentiation identity in SCA7 remains to be investigated.

In contrast to the retinopathy, the pathomechanisms underlying SCA7 motor incoordination remain to be determined. Different transgenic and knock-in mouse models showed different vulnerability of PCs to mutant ATXN7 (mATXN7) expression (Yvert et al., 2000, 2001; Yoo et al., 2003; Custer et al., 2006; Mookerjee et al., 2009; Chou et al., 2010; Furrer et al., 2013; Karam and Trotter, 2018) and little overlap of cerebellar gene deregulation (Gatchel et al., 2008; Chou et al., 2010; Friedrich et al., 2012; Stoyas et al., 2020). Interestingly, mice overexpressing mATXN7 in the whole brain, except PCs or specifically in Bergmann glia, developed motor dysfunction (Custer et al., 2006; Mookerjee et al., 2009), questioning the contribution of different cerebellar cell types to the pathology. A deeper understanding of the SCA7 cerebellar pathology at a single cell type resolution is thus warranted. Furthermore, the contribution of SAGA dysfunction to cerebellar pathology remains unclear as conditional deletion of the GCN5 histone acetyl-transferase, a subunit of SAGA, in mouse PCs led to very mild ataxia (Chen et al., 2012).

SCA7 is part of a group comprising 5 other SCAs (SCA1-SCA3, SCA6, and SCA17) that are also caused by polyQ expansion in different proteins. PolyQ SCAs cause damage to the cerebellum, often with high vulnerability of PCs (Klockgether, 2011). Despite shared genetic, clinical, and neuropathological features, more is needed to identify points of intersection and divergence of the pathophysiology of polyQ SCAs (Niewiadomska-Cimicka et al., 2020). While SCA proteins do not share any domain and have different cellular functions, changes in gene expression are central features in most polyQ SCAs. Therefore, the comparison of differentially expressed genes should provide insight into converging disease mechanisms.

Yet, the broad spectrum of SCA7 pathology has not been fully recapitulated in the current models. We describe here a new SCA7^{140Q/5Q} knock-in mouse line that combines the major clinical features observed in patients, including retinal, cerebellar, cerebral, and peripheral nerve pathologies, which account for progressive impairment of behavior, motor, and vision functions. Transcriptome profiling allowed to identify cell type-specific gene deregulation in the cerebellum and to highlight PCs as the most affected neurons. Strikingly, PCs show a profound downregulation of neuronal identity genes, which are also downregulated in other polyQ SCAs, revealing converging pathomechanisms.

Materials and Methods

Mouse information

The SCA7^{140Q/5Q} knock-in mouse line, which is derived from the SCA7^{266Q/5Q} mouse model (Yoo et al., 2003) by CAG repeat contraction, harbors an expansion ranging from 140 to 150 CAG repeats in exon1 of the *Atxn7* locus. Mice are kept on C57Bl/6J background and bred in the Mouse Clinical Institute with a 12 h light/dark cycle and free access to food and water. Genotyping was performed by PCR as described previously (Yoo et al., 2003). WT and SCA7^{140Q/5Q} males and females were analyzed, unless indicated.

Ethics approval and consent to participate

All animal procedures were conducted in strict accordance with the French and German national laws for laboratory animal welfare and the guidelines of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations, based on European Union Legislation (Directive 2010/63/EU). Experiments were approved by local Ethics Committees under the supervision of the Ministry of Higher Education, Research and Innovation in France (agreement numbers 14199-2018032117483097, #1803-2015072215481972, and #4354-2016030212155187-v3; CREMEAS; CEEA35) and the Regierungspraesidium Tuebingen in Germany.

Behavioral and motor performance analysis

To ensure the replicability of SCA7 mouse phenotype, two mouse colonies were raised in the husbandry of different research centers and were analyzed using standardized protocols by independent experimenters

and instruments. The experiments were all performed during the light phase of a 12 h light/dark cycle.

Open field test

The open fields were placed in a room homogeneously illuminated at 150 lux. Mice of the first colony were tested in automated open fields ($44.3 \times 44.3 \times 16.8$ cm, Panlab), virtually divided into central and peripheral regions. Each mouse was placed in the periphery of the open field and allowed to explore freely for 30 min, with the experimenter out of the animal's sight. The distance traveled, the number of rears, average speeds, and resting time were automatically recorded and reflect the general locomotor or motor activity phenotype. The number of entries and the time spent in the central and peripheral regions were used as index of emotionality/anxiety. Mice of the second colony were tested in an open field (46×46 cm). Each mouse was tracked over 30 min with EthoVision XT 11 and 12 (Noldus Information Technology) and automatically analyzed for the same parameters, except for the number of rears that were manually scored.

Rotarod. To assess the ability to maintain balance, mice of the first colony were tested on a rotating rod of 5 cm in diameter covered by gray rubber foam (Bioseb). Mice were given three testing trials during which the rotation speed accelerated from 4 to 40 rpm in 5 min. Trials were separated by a minimum of 5–10 min interval. The average latency before falling from the rod was used as index of motor coordination performance. Mice of the second colony were assessed using an apparatus from TSE Systems with 3.5 cm rod diameter without rubber foam, using the same parameters as for the first colony. The floor of the rotarod was covered with soft material to avoid animal discomfort when falling. Light intensity was set to ~ 115 lux.

Notched bar. The test was used to test hindlimb coordination. On the first day, mice were trained on a 2-cm-wide and 110-cm-long natural wooden notched bar made of 26 platforms of 2-cm-long spaced by 27 gaps of 2 cm and connected to the goal box ($12 \times 12 \times 14$ cm), under 115 lux. The second day, mice were tested in the same conditions and time to cross the notched bar was measured. A back paw going through a gap was considered as an error.

Beam walking test. The test consisted of a 110-cm-long wooden beam (2 cm diameter), positioned 50 cm above the floor. One extremity of the beam was used as starting position while the opposite extremity was connected to a goal box (of $12 \times 12 \times 14$ cm for the first colony, and $8.5 \times 8.5 \times 12$ cm for the second colony). The floor of the goal boxes was covered with clean sawdust. The floor under the beam was covered with soft material. During the whole protocol, the light intensity in proximity of the beam was maintained at ~ 115 Lux. Each mouse was first habituated to the goal box for 1 min before three training and three testing trials. On the first training trial, mice were placed on the beam near and facing the goal box and allowed to access it. On the second and third training trials, mice were placed further away (33 and 66 cm, respectively) facing the box and were allowed to reach and enter the box. On the testing sections, mice were placed at the beam extremity (100 cm, starting position), facing the box and were allowed to reach the goal box. After each training and testing trial, mice were left for 15 s in the goal box. The latency to reach the box (cut off 60 s) and the number of errors (slips) while crossing the beam were recorded.

Footprint. After coating the front and hind feet with two different colors of nontoxic inks, mice walked through a tunnel (length 50 cm, width 9 cm, height 6 cm) covered with paper. The following five footprint patterns were manually measured: matching between paws, stride length, stance width, distance between forelimbs and hindlimbs.

Grip strength test. This test measures the maximal muscle strength (g) using an isometric dynamometer connected to a grid (Bioseb). Mice were held by the tail and allowed to grip the metal grid with the four paws; then they were pulled backwards until they released it. Each mouse was submitted to three consecutive trials, and the maximal strength developed by the mouse before releasing the grid was recorded. The average value of the three trials adjusted to body weight was used as index of the muscle strength.

CatWalk. Gait analyses were performed using CatWalk XT 8.1 (Noldus Information Technology). The CatWalk apparatus consists of a

closed corridor resting on a glass plate. The walkway (20 cm) is illuminated with red light from the ceiling and green light from the edges of the plate (green intensity threshold: 0.30; camera gain: 20). When an animal enters the corridor, the light reflected by the paws is detected by a camera placed 25 cm below the walkway. Each mouse was placed on the walkway at one extremity and allowed to move in the corridor in both directions. Only runs lasting a maximum of 10 s with 60% maximal speed variation were counted. Five successful runs per animal were recorded. The swing (s) defined as the duration of no contact of a paw with the glass plate was analyzed separately for forelimbs and hindlimbs and averaged between left and right sides.

Optical coherence tomography (OCT) and electroretinography (ERG)

OCT. Pupils were dilated with a bilateral topical application of atropine (1%, Virbac). Animals were then anesthetized using isoflurane (4% for induction, 2% for maintenance in a 0.4 L/min flow of 50%-50% mix of air and O_2) and placed on the stage of a Bioptigen R2200 spectral domain OCT (Bioptigen). Cornea was kept moisturized with a thin layer of ocular gel (Ocry-gel, TVM) applied with surgical eye spears. For each eye, a rectangular scan was obtained, corresponding to a region of 1.4×1.4 mm centered on the optic nerve. The thicknesses of the whole retina (including the pigmentary epithelium), the segments, the outer nuclear layer (ONL), the inner nuclear layer (INL), and the inner plexiform layer (IPL) for a given eye were calculated as the average of 2 measures performed manually at 0.5 mm from the optic nerve center using the Bioptigen InVivoVue 2.4.33 software.

ERG. Pupils were dilated and cornea moisturized as described above. Mice were then anesthetized with an intraperitoneal injection of a mixture of ketamine (100 mg/kg) and medetomidine (1.2 mg/kg, Domitor). Mice were placed on a platform on top of a chemical heating pad (Aquapack, China). A DTL thread was used as the active electrode and placed across the cornea. To minimize invasiveness, we replaced the subcutaneous needles traditionally used as reference and ground electrodes, respectively, by a gold loop placed in the mouth (around the incisors), and a finger clip electrode placed on the tail with conductive paste. The platform was then moved forward to position the mouse head inside a Ganzfeld with flashes controlled with a Visiosystem (SIEM Bio-médicale). The background light was set at $25 \text{ Cd}\cdot\text{m}^{-2}$. Single-flash photopic responses were recorded for intensities of 1, 3, and $10 \text{ Cd}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2}$ and flicker responses were recorded at frequencies of 2, 5, 10, 20, and 25 Hz with three $\text{Cd}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2}$ flashes. The b-wave amplitude was measured offline with the Visiosystem software. At the end of the test, mice received a subcutaneous injection of atipamezole (10 mg/kg, Antisedan) to counteract the action of medetomidine, and were placed on a heating plate set at 37°C until awakening.

Electrophysiology

Electromyography. Recordings were performed using the Natus UltraProS100 apparatus (Mag2Health). Mice were anesthetized using intraperitoneal injection with ketamine (130 mg/kg)/xylazine (13 mg/kg). Animals were maintained at 37°C during the whole experiment until awakening. Latency and amplitude of M and H waves were recorded in the plantar hind paw muscle after sciatic nerve stimulation (0.1 ms and 8 mA intensity).

Electrophysiology of PCs. Following anesthesia by isoflurane inhalation, cerebellum extraction was done in ice-cold ($\sim 1^\circ\text{C}$) ACSF bubbled with carbogen (95% O_2 , 5% CO_2) containing the following (in mM): 120 NaCl, 3 KCl, 26 NaHCO_3 , 1.25 NaH_2PO_4 , 2.5 CaCl_2 , 2 MgCl_2 , 10 D-glucose, and 0.05 minocyclin. Cerebella were sectioned (Microm HM650V) in an ice-cold low-sodium and zero-calcium slicing buffer containing the following (in mM): 93 NMDG, 2.5 KCl, 0.5 CaCl_2 , 10 MgSO_4 , 1.2 NaH_2PO_4 , 30 NaHCO_3 , 20 HEPES, 3 Na-pyruvate, 2 thiourea, 5 Na-ascorbate, 25 D-glucose, and 1 kynurenic acid. Sagittal slices $300 \mu\text{m}$ thick were immediately transferred in bubbled ACSF for 30 min at 34°C and maintained at room temperature ($\sim 25^\circ\text{C}$) in bubbled ACSF for at least 1 h before transfer in a recording chamber, continuously perfused with bubbled ACSF. In order to block inhibitory and excitatory synaptic transmission, blockers of $GABA_A$ receptors (100 μM picrotoxin) and ionotropic glutamate receptors (1 mM kynurenic acid) were added in

ACSF. PCs located in lobules VI or IX/X were visually identified under infrared illumination. All recordings were performed at near physiological temperature ($32 \pm 0.5^\circ\text{C}$) using an AxoPatch 200A (Molecular Devices). PC discharges were monitored using extracellular recordings with pipettes filled with 0.5 M NaCl (resistance: $15\text{--}30\text{ M}\Omega$). Data were acquired using WinWCP 4.5.4 freeware (John Dempster, University of Strathclyde, Glasgow; RRID:SCR_014713). Recordings were sampled at 50 kHz and filtered at 2 kHz . In extracellular recordings, action potentials were detected using OpenElectrophy, an open source software (<http://neuralensemble.org/OpenElectrophy/>; RRID:SCR_000819) (Garcia and Fourcaud-Trocmé, 2009). Data were stored in SQL databases (Oracle). Spike trains were analyzed using Python software written in-house (SynaptiQs developed by Antoine Valera) and custom-based routines. discharge irregularity was assessed by two parameters: (1) the mean of interspike intervals (ISIs); and (2) coefficient of variation for adjacent ISIs (CV_2) calculated as follows:

$$CV_2 = 2 \frac{|ISI_{n+1} - ISI_n|}{|ISI_{n+1} + ISI_n|}$$

where ISI_n and ISI_{n+1} are two consecutive ISIs. An average of CV_2 over all consecutive pairs of ISIs estimates the intrinsic variability of PC pace-making activity. This parameter is independent of slow variations in the firing pattern.

Neuroanatomical study

Neuroanatomical study was conducted using 10 mice at 33 weeks ($n = 5$ per group) and 12 mice at 50 weeks ($n = 6$ per group). Brain samples were fixed in 4% buffered formalin for 48 h. Seventy-eight brain parameters, made of area and length measurements, were taken blind to the genotype across three coronal sections as described previously (Mikhaleva et al., 2016). Data were analyzed using a *t* test with equal variances to determine whether a brain region is associated with neuroanatomical defect or not.

MRI

After PFA perfusion of 25-week-old mice, brains were removed and stained for 1 week in a solution of gadolinium (Dotarem) in PBS at 2.5 mM . This protocol enhances the signal- and contrast-to-noise ratios on MR images of fixed brains (Dhenain et al., 2006). *Ex vivo* MRI experiments were performed on a horizontal 11.7 T Bruker scanner (Bruker). A quadrature cryoprobe (Bruker) was used for radio frequency transmission and reception. High-resolution anatomic images were acquired using EPI sequence (Resolution = $100 \times 100 \times 200\ \mu\text{m}^3$, TR = 3000 ms , TE = 28 ms). In order to preserve integrity to avoid deformations, brains were kept inside skulls for *ex vivo* MRI experiments. Anatomical images were coregistered in the same space to create a study template. Transformations to match the study template to an atlas composed of a high-resolution template, and a map of region's labels adapted from the Allen Mouse Brain Atlas (Lein et al., 2007) was calculated. Finally, transformations to match the study template and labels to each individual anatomic image were calculated. The automated segmentation pipeline was performed using an in-house Python library (Sammmba-MRI; <https://github.com/sammmba-mri/sammmba-mri>).

Immunofluorescence

Cryosections. Mice were transcardially perfused with $1 \times$ PBS followed by 4% PFA/ $1 \times$ PBS. Brains and eyecups were immediately dissected and incubated in 4% PFA/ $1 \times$ PBS overnight or for 2 h, respectively. They were washed 3 times in $1 \times$ PBS before a 24 h incubation in 30% (brain) or 20% (eyecup) sucrose for cryoprotection and then mounted in Shandon Cryomatrix embedding resin (Thermo Fisher Scientific) and immediately frozen; $14\text{--}20\ \mu\text{m}$ brain sagittal and $12\ \mu\text{m}$ eyecup cryosections (Leica Microsystems, CM 3050S) were collected and stored at -80°C .

Vibratome sections. Brains were fixed as described above, washed 3 times in $1 \times$ PBS, and mounted in 2% agarose/ $1 \times$ PBS. Vibratome sagittal sections (Leica Microsystems, VT 1000S) of $50\ \mu\text{m}$ were collected, washed in $1 \times$ PBS, next in 20% glycerol/ $1 \times$ PBS, and stored in 60%

glycerol/ $1 \times$ PBS at -20°C . The 60% glycerol/ $1 \times$ PBS was washed out with 1 wash of 20% glycerol/PBS and three washes of $1 \times$ PBS before immunofluorescence.

Cryosections were permeabilized in PBSTx ($1 \times$ PBS/ 0.1% Triton X-100) and blocked for 1 h at room temperature with PBSTx supplemented with 7% deactivated FCS. Sections were incubated overnight at 4°C with primary antibodies in a blocking buffer using the following dilutions: $1:20,000$ (cryosections) or $1:5,000$ (floating sections) anti-CALB1 (rabbit, D28k, Swant, CB38a); $1:5000$ (cryosection) or $1:1000$ (floating section) anti-CALB1 (mouse, D28k, Sigma Millipore, C9848); $1:1000$ (floating sections) vGLUT2 (guinea pig, Merck, AB2251-I); $1:10,000$ anti-vGLUT1 (guinea pig, Millipore, AB5905); $1:1000$ anti-ATXN7 (rabbit, 1261; Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire [IGBMC]); $1:700$ anti-GFAP (mouse, Sigma Millipore, G3893). Secondary goat anti-rabbit, goat anti-mouse, goat anti-guinea pig IgG antibodies (Thermo Fisher Scientific, dilution $1:1000$) conjugated with Alexa-555, -488, and -488 fluorophores, respectively, were applied for 1 h at room temperature and subsequently washed 3 times in PBSTx. Nuclei were counterstained with $1\ \mu\text{g/ml}$ DAPI ($4',6\text{-diamidino-2-phenylindole}$ dihydrochloride). Controls without primary antibodies were performed in parallel. Slides were mounted with Aqua Poly Mount (Polysciences), dried and stored at 4°C protected from light.

Floating cerebellar sections were processed as described above with the following modifications. Sections were incubated in Eppendorf tubes for 3 d at 4°C with primary antibodies in $300\ \mu\text{l}$ of blocking buffer. Secondary antibodies were applied for 2 h at room temperature. Sections were positioned on slides directly before mounting.

Retina images were acquired on a Leica DM 4000B with a Cool SNAP HQ2 camera with $40\times$ objective with zoom factor 2.5 and processed with Fiji. Cerebellum images were acquired either on a confocal microscope (SP8, Leica Microsystems) with $40\times/1.3$ oil objective with a zoom factor 1 or on a Spinning disk with Leica DMI 8 inverted microscope equipped with Hamamatsu Orca flash 4.0 Camera 5 (Gataca Sytem) connected with MetaMorph software (Molecular Devices). For the acquisitions, HC PL APO $40\times/1.3$ oil objective and three diode lasers (405 , 488 , and 561 nm) were used. Image brightness and contrast were equivalently adjusted in Fiji for display purposes when necessary.

PC size and circularity measurements

Sagittal floating sections ($50\ \mu\text{m}$) of central vermis were immunostained with anti-calbindin 1 antibody and acquired using confocal SP8 (Leica Microsystems) microscope. The obtained *z* stacks were subdivided into three groups of 15 slices using Fiji. After background subtraction, the PC layer was outlined manually in the vicinity of PC somas. Next, a customized Fiji macro allowing an automatic detection and measurement of the PC area and circularity was applied. Edge PCs were excluded from measurements.

Morphometry of cerebellar vermis sections

Sagittal $20\ \mu\text{m}$ sections of central vermis were immunostained with anti-CALB1 antibody and counterstained with DAPI. Sections were scanned with Digital Slide Scanner Nanozoomer 2.0 HT (Hamamatsu) using $40\times$ magnification. Images of the cerebellum were visualized using NDPI viewer and exported with $5\times$ magnification into tiff format. Length and width of cerebellar sections as well as the thickness of the molecular cell layer (MCL) were measured using Fiji software.

vGLUT2 density, volume, and extension in the MCL

Sagittal floating sections ($50\ \mu\text{m}$) of central vermis were immunostained with anti-calbindin 1 and anti-vGLUT2 antibodies, counterstained with DAPI. Sections were acquired using YoKogawa CSU W1 Spinning disk with Leica DMI 8 inverted microscope and Hamamatsu Orca flash 4.0 Camera (Gataca Sytem) and a driver by the MetaMorph software (Molecular Devices). For the acquisitions, HC PL APO $40\times/1.3$ oil objective and three diode lasers (405 , 488 , and 561 nm) were used. Stacks consisted of 225 *z* slices with $0.2\ \mu\text{m}$ *z* step using $6.5\ \mu\text{m} \times 6.5\ \mu\text{m}$ pixel size.

Images were saved in tiff format. Subsequently, RGB channels were split in Fiji. Channel with vGLUT2 acquisition (.ims format) was

exported to Imaris version 9.3.1 (Bitplane AG) for 3D reconstruction. The ROI, namely, the MCL, was selected and 3D volumes were created with the surface module of Imaris. Next, vGLUT2 was analyzed only on this region with the Imaris spot module. The detection of objects in three-dimensional space was based on both intensity and size (with the estimated XY diameter of 1 μm). Only spots ranging from 0.52–30 μm^3 were selected to eliminate background. Density and volume measurements of spots were analyzed in Excel and GraphPad Prism 6. The extension of vGLUT2-positive climbing fiber (CF) terminals along the dendrites of PC was measured using Fiji. Namely, the ratio of the extension of the 3D reconstructed vGLUT2 spots in the MCL over the total length of the MCL was calculated for the central part of lobule VI and for the side part of lobule X.

Histology and electron microscopy analysis

Eyes were prepared for histology and electron microscopy as in Yefimova et al. (2010). Semi-thin (2 μm) sagittal sections were cut with an ultramicrotome (Leica Ultracut UCT), stained with toluidine blue, and histologically analyzed by light microscopy. For sciatic nerve preparation, animals were perfused with 5 ml of PBS and 10 ml 4% PFA in saline, and tissues were fixed in 2.5% PFA/2.5% glutaraldehyde in cacodylate buffer. Ultra-thin (70 nm) sections were cut and contrasted with uranyl acetate and lead citrate and examined at 70 kV with a Morgagni 268D electron microscope. Images were captured digitally by Mega View III camera (Soft Imaging System), and contrast was adjusted for display purposes.

Western blot analysis

Cerebellum and retina were dissected and snap frozen in liquid nitrogen. Their whole-cell extracts were obtained by lysis and sonication of the tissue in, respectively, 500 μl and 150 μl of the buffer containing 50 mM HEPES-KOH, pH 7.5, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% Na-deoxycholate, 1% SDS, 1% Triton-X100, 1 \times Protease Inhibitor Cocktail (Roche), 20 mM N-ethylmaleide, and 20 mM nicotinamide. The last two compounds were not used for ATXN7 detection. Protein concentrations were measured using Bradford protein assay; 10 μg (histone analysis) and 30 μg (other analysis) of total proteins were used for electrophoresis. Electrophoresis was run in 4%–12% Bis-Tris Protein Gels in NuPAGE MOPS SDS Running Buffer (Thermo Fisher Scientific) for histone analysis and in NuPAGE 3%–8% Tris-Acetate Protein Gels in NuPAGE Tris-Acetate SDS Running Buffer (Thermo Fisher Scientific) for ATXN7 detection. Following electrophoresis, proteins were transferred on nitrocellulose membrane for 1.5 h at 200 mA or overnight at 30 mA. Antibodies were diluted in 1 \times PBSTM (1 \times PBS with 0.1% Tween, and 5% nonfat milk). The following primary antibodies were applied overnight at 4°C: anti-ATXN7, 1:1000 (Thermo Fisher Scientific, PA1-749); 1:20,000 anti-vGLUT1 (Millipore, AB5905), 1: 2000 anti-vGLUT2 (Millipore, AB2251), anti-RGS8, 1:1000 (Novus, NBP2-20 153), anti-FAM107b, 1:500 (Abcam, ab122566), 1:10,000 anti-IP3R1 (Novus, NB120-5908), anti-CALB1, 1:5000 (D28k, Swant, CB38a), anti-ALDOC, 1:10,000 (#69075; TMDU, lab Sugihara), anti-H2B, 1:10,000 (IGBMC, clone H2-2A8); anti-H2Bub 1:2000 (MediMabs, MM-0029); anti-H3K9ac 1:2000 (Abcam, ab4441); anti-GAPDH 1:10,000 (Merck Millipore, MAB374); anti-TUBB 1:2000 (IGBMC, 2A2), anti-histone H3, 1:20,000 (IGBMC). Secondary antibodies are as follows: Peroxidase AffiniPure F(ab')₂ Fragment Goat Anti-Rabbit IgG (H + L) (GARPO; 1:10,000, Jackson ImmunoResearch Laboratories), Peroxidase AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H + L) (GAMPO; 1:10,000, Jackson ImmunoResearch Laboratories), and Donkey anti-Goat IgG (H + L) HRP (DAGPO, 1:10,000, Thermo Fisher Scientific) were applied in 1 \times PBSTM for 2 h at room temperature, washed 3 times in 1 \times PBST, and proteins were detected using SuperSignal West Pico PLUS Chemiluminescent kit (Thermo Fisher Scientific). Chemiluminescent signal was acquired on GE HealthcareImager 600. Images were analyzed using Fiji.

RNA-Seq library preparation and sequencing

RNA-Seq libraries (3 independent samples/genotype) were prepared from 300 ng of total cerebellar RNA using TruSeq Stranded mRNA

Library Prep Kit and TruSeq RNA Single Indexes kits A and B (Illumina), according to the manufacturer's instructions. Briefly, following purification with poly-T oligo-attached magnetic beads, mRNAs were fragmented using divalent cations at 94°C for 2 min. RNA fragments were reverse-transcribed into first-strand cDNA using random primers. Strand specificity was achieved by replacing dTTP with dUTP for the second-strand cDNA synthesis using DNA Polymerase I and RNase H. Following addition of a single A base and subsequent ligation of the adapter on double-stranded cDNA fragments, products were purified and amplified by PCR (30 s at 98°C [10 s at 98°C, 30 s at 60°C, 30 s at 72°C] \times 12 cycles; 5 min at 72°C) to create the cDNA library. Surplus PCR primers and adapter dimers were removed by purification using AMPure XP beads (Beckman-Coulter) and the final cDNA libraries were checked for quality and quantified using capillary electrophoresis. Libraries were sequenced on Illumina HiSeq 4000 Sequencer as Single-Read 50 base reads following Illumina's instructions. Image analysis and base calling were performed using RTA 2.7.3 and bcl2fastq 2.17.1.14. Adapter dimer reads were removed using DimerRemover (<https://sourceforge.net/projects/dimerremover/>). The RNA-seq data have been submitted to the NCBI Gene Expression Omnibus (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) under GSE138527 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/query/acc.cgi?acc=GSE138527>).

RNA-Seq data analysis

Image analysis and base calling were performed using RTA 2.7.3 and bcl2fastq 2.17.1.14. Reads were mapped onto the mm10 assembly of mouse genome using TopHat version 2.0.14 (Kim et al., 2013) with bowtie version 2.1.0 aligner. Gene expression was quantified using HTSeq version 0.6.1 (Anders et al., 2015) and gene annotations from Ensembl release 86. Statistical analysis was performed using R and DESeq2 version 1.6.3 Bioconductor library (Love et al., 2014). Gene functional annotations were performed using Ingenuity Pathway Analysis (IPA) and String version 10.5 software (Kramer et al., 2014; Szklarczyk et al., 2015).

Analysis of public datasets

For SCA1 dataset (Gene Expression Omnibus: GSE75778), FASTQ files were retrieved from Sequence Read Archive using fastq-dump (SRA Toolkit version 2.8.0, BioProject PRJNA305316, samples: GSM1967518-GSM1967520; GSM1967524-GSM1967529; GSM1967533-GSM1967538; GSM1967542-GSM1967544), and only the first 50 bases of read 1 sequences were retained for further analysis. For SCA2 dataset (Array Express: E-MTAB-6293), FASTQ files were retrieved from Sequence Read Archive using fastq-dump (SRA Toolkit version 2.8.0, BioProject PRJEB24319, samples ERR2237861-ERR2237880, ERR2237882-ERR2237893). Reads were then mapped onto the mm10 assembly of mouse genome using TopHat version 2.0.14 (Kim et al., 2013) with bowtie version 2.1.0 aligner. Gene expression was quantified using HTSeq version 0.6.1 (Anders et al., 2015) and gene annotations from Ensembl release 90. Statistical analysis was performed using R and DESeq2 version 1.18.1 (Love et al., 2014).

Analysis of cell type-specific gene deregulation in SCA7 cerebellum

To gain insight into the cell type-specific distribution of differentially expressed genes in SCA7 cerebella, we used published datasets of Doyle et al. (2008). In this study, 9 BacTRAP transgenic mice were engineered to selectively purify 9 different cerebellar cell-type populations (PCs, granule cells (GCs), Golgi cells, stellate and basket cells, unipolar brush cells, oligodendrocytes expressing Olig2 or Cmtm5, Bergmann glia, and astrocytes) from the whole cerebellum. For each cell type, the actively translated mRNA profile (translatome) was determined using Affymetrix microarray analysis.

We first reannotated gene names according to the updated mm10 annotation using the Affymetrix NetAffx Annotation File (Mouse430_2 Annotations, Release 36). The reannotation showed that a total of 9671 genes are expressed in the 9 cell types. From these, we identified that 5058 genes are exclusively present in a single cell type and that 4613 genes are present in more than one cell type dataset. Then, using this information, we could assign that, among the 676 deregulated genes in

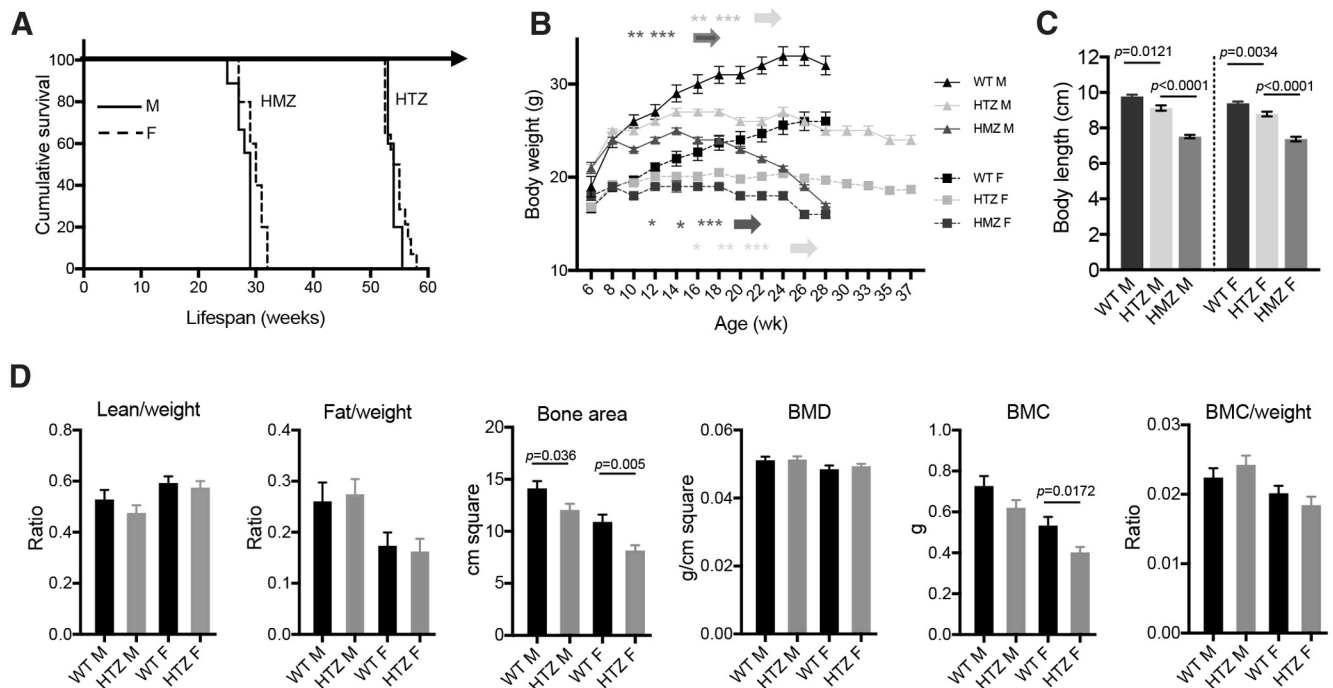


Figure 1. Lifespan, and body size and composition of SCA7 mice. **A**, Kaplan–Meier survival curves indicate that SCA7^{140Q/50Q} heterozygous (HTZ) and SCA7^{140Q/140Q} homozygous (HMZ) males (M) and females (F) have shorter lifespan than WT littermates ($n = 11$ WT F, 5 WT M, 9 HTZ F, 4 HTZ M, 6 HMZ F, 5 HMZ M). **B**, Gain in body weight of males and females of SCA7 HTZ and SCA7 HMZ mice differs from WT littermates. Two-way ANOVA with repeated measurement (males-genotypes: $F_{(2,20)} = 62.06$, $p < 0.0001$; females-genotypes: $F_{(2,22)} = 13.92$, $p = 0.0001$) and *post hoc* Bonferroni test ($*p < 0.05$; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$) ($n = 11$ WT F, 5 WT M, 8 HTZ F, 9 HTZ M, 6 HMZ F, 9 HMZ M). **C**, Body length of 38-week-old SCA7 HTZ and SCA7 HMZ mice differs from WT littermates. One-way ANOVA (males: $F_{(2,17)} = 62.45$, $p < 0.0001$; females: $F_{(2,20)} = 50.07$, $p < 0.0001$) and *post hoc* Bonferroni test ($n = 11$ WT F, 5 WT M, 8 HTZ F, 9 HTZ M, 4 HMZ F, 6 HMZ M). **D**, Analysis of proportion of lean and fat tissues normalized to animal body weight, bone area, bone mineral density (BMD), bone mineral content (BMC), and BMC normalized on body weight. SCA7 HTZ mice show no difference in body composition compared with WT mice, except for the BMC of females and bone area for females and males. Two-tailed Student’s *t* test ($n = 4$ mice/genotype). **B–D**, Data are mean \pm SEM.

SCA7 mouse cerebellum, 240 were specific to a single cerebellar cell type while another 230 were present in more than one cell type; 206 genes had no assignment because they were not reported in the datasets of Doyle et al. (2008).

qRT-PCR

Total RNA samples were extracted from 1 cerebellum/sample or 2 retinas/animal/sample using TriReagent (MRC) following the manufacturer’s instruction. For the subregional qRT-PCR analysis, anterior (lobules II–V) and posterior (lobules VI–IX) vermis, as well as lobule X were cut apart from freshly dissected cerebellum under a binocular, and total RNA samples were also extracted using TriReagent; 500 ng of purified RNA was then reverse-transcribed using QuantiTect Reverse Transcription kit (QIAGEN) according to the manufacturer’s protocol. The qRT-PCRs were performed on obtained cDNAs (1/20 dilution) using QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix (QIAGEN), a Light Cycler 480 (Roche) and specific primers as follows: *Calb1* (forward (F): GCAGAGTACACAGACCTCATG, reverse (R): ATGTATCCGTTG CCATCCCTG); *Grid2* (F: TGTGGTTTGTGTATGGGTCC, R: GGGT GATAGTAGGAAAGCG); *Rora* (F: CGCTAGAGTGGTGTGTTTATT AGG, R: ATTCGTCTTCGGTCAAGTGTG); *Rgs8* (F: GAAAGGTGGA CAAGGTGGAG, R: TTGACAGACTGAAGGCAAGG); *Fam21* (F: GTGACCTCTTTGCTGACTCTG, R: ATCTGTTTGTCCCTCTTT CCG); *Fam107b* (F: AAATCACCAAGACCTCCACAG, R: TGCTTTA TCACTTGGTCTCGTC); *Pcp4* (F: TGCCTTCTGAGCTGTTCTG, R: TCTGAACCTGAGACTGAATGGC); *36B4 (Rplp0)* (F: ACCCTGAA GTGCTCGACATC, R: AGGAAGCCTTGACCTTTTC); *Rho* (F: ACCCTCTACACATCACTCCA, R: AAGACCACCCCATGATA GC); *Opn1sw* (F: CACCTGGTTCCTCTTCATCTTC, R: GTTCAG CCTTTTGTGTCGTAG); *Opn1mw* (F: GCTACTTCGTTCTGGGAC AC, R: CAAATCTCACATTGCCAAAGGG); *Hprt* (F: GTAATGA TCAGTCAACGGGGGAC, R: CCAGCAAGCTTGCAACCTTAAC

CA); *Foxp4* (F: CCAGTCCCACCCTCTTTATG, R: CAAAGCGT GTTCTGTGTTGAG); *Orai2* (F: CTGGAACCTCGTCACGTCTAAC, R: AGGGTACTGGTACTTGGTCTC); *Kctd12* (F: CCAGAGCGAGG ACAAGATC, R: AGAAGGAATCGGGAAACAGG); *Prkg1* (F: AA GGGAGATTGGTTGGAGAG, R: TGCTTCTGCGTCCCTCATATG); *Gng13* (F: TCTCTGCTTTTGCTGTCTCC, R: TCAATCCACTTGAG AAGCTCG); *Itp1r1* (F: GATGCTAAAAGAGGGACAGAAGG, R: GCA GCGGAGAATGAGATCAAC); *Plcb3* (F: CTGCCCTGCTTATCT AACTG, R: GGTCCTGATATGTCTCTGTG); *Plcb4* (F: CAAAC CCCAGATTTAGCGATG, R: GGAACCTGCCCTGATATAACCTG); *Aldoc* (F: TATTGTGGAGCCTGAGATTCTG, R: CTCTGGGCT ATACTTGATGGG); *Gabbr1* (F: CGTTATATCCAGAACTCCCAGC, R: GAACATAGAGCCATAGCCCAG). Gene expressions were normalized based on the expression of *Hprt* or *36B4 (Rplp0)*.

Experimental design and statistical analysis

Information on number (n) values and what n represents (e.g., animals, sex, biological replicates) and definition of center and dispersion and precision measures (e.g., mean, median, SEM) can be found in the figure legends. Data were analyzed using GraphPad Prism 7 or 8 or Stat view. Differences between means were assessed with unpaired Student’s *t* test, ANOVA, or ordinary two-way ANOVA or two-way ANOVA with repeated measurement, followed by *post hoc* testing of pairwise comparisons among genotypes (Bonferroni correction), as indicated. Differences between median were analyzed using Mann–Whitney test. Survival of mice with different genotype and sex was plotted using the Kaplan–Meier method, and statistical comparisons were performed using the Log Mantel–Cox test. Distribution of PC size and circularity was analyzed using χ^2 . Further information is indicated in the figure legends. Significance was established at $p < 0.05$. Data are mean \pm SEM unless indicated. Datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

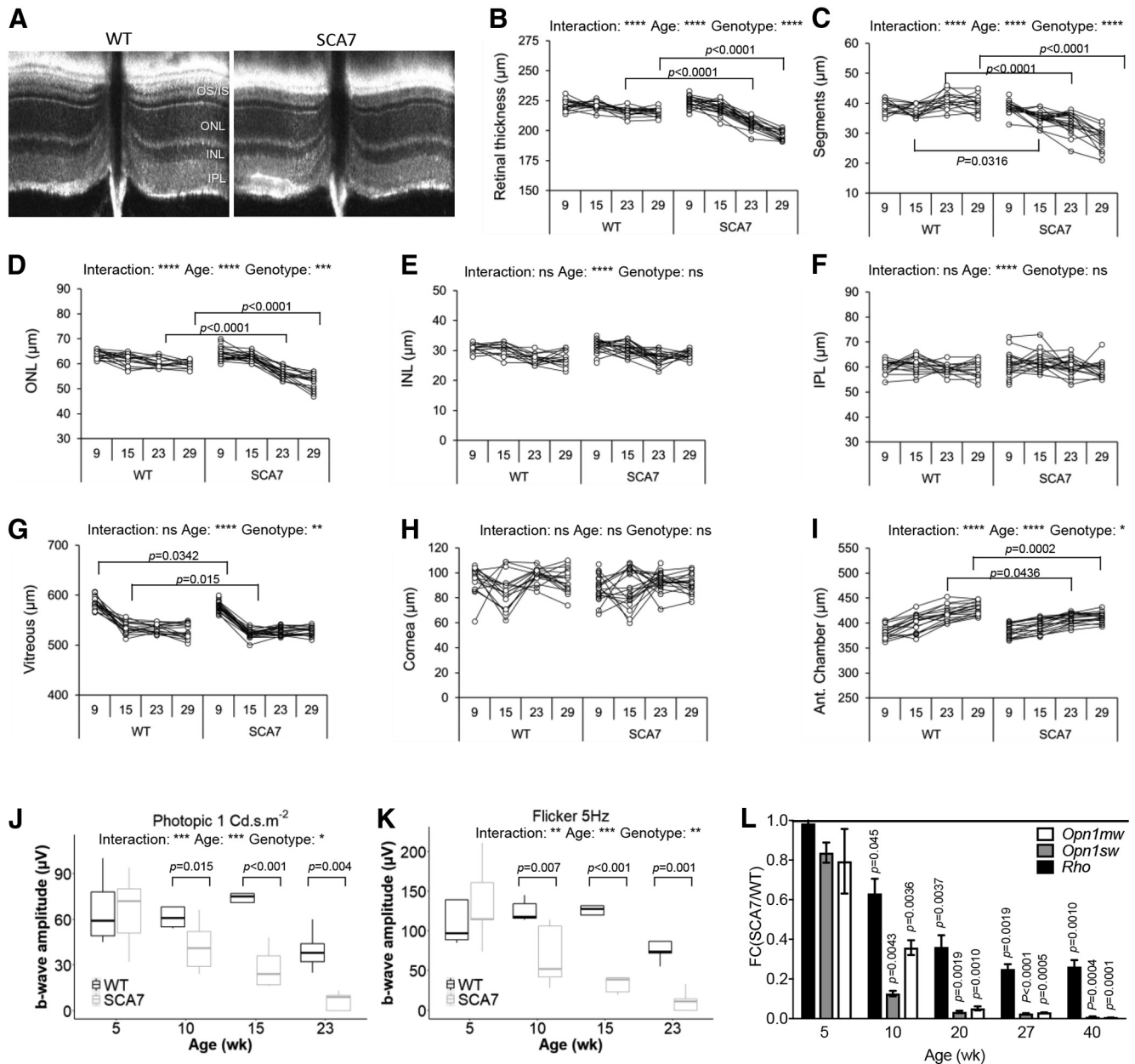


Figure 2. Retina alterations in SCA7 mice. **A**, Representative OCT B-scan showing reduced thickness of the segment layers of SCA7^{140Q/5Q} mice compared with WT at 29 weeks. OS, outer segment; IS, inner segment. **B–I**, Longitudinal OCT measurements at 9, 15, 23, and 29 weeks show progressive thinning of retina thickness (genotypes: $F_{(1,32)} = 63.11, p < 0.0001$; **B**), photoreceptor segment layers (genotypes: $F_{(1,32)} = 86.03, p < 0.0001$; **C**), ONL (genotypes: $F_{(1,32)} = 17.93, p = 0.0002$; **D**), and anterior (Ant.) chamber (genotypes: $F_{(1,30)} = 6.688, p = 0.0148$; **I**) in SCA7^{140Q/5Q} mice relative to WT littermates. The INL (**E**), IPL (**F**), vitreous (**G**), and cornea (**H**) show no steady difference between WT and mutant mice. Data are analyzed using two-way ANOVA with repeated measurement and *post hoc* Bonferroni test ($n =$ both eyes of 8 WT and 9 SCA7 mice): * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$. **J, K**, Longitudinal cone-derived b-wave amplitudes of photopic response to 1 Cd·s·m⁻² flashes (**J**) and 5 Hz flicker responses to 3 Cd·s·m⁻² flashes (**K**) show progressive reduction of cone function in SCA7^{140Q/5Q} retina relative to WT retina. Background illumination was 25 Cd·m⁻². Data are mean ± SEM and analyzed with two-way ANOVA with repeated measurement and *post hoc* Bonferroni test ($n =$ single eyes of 5 WT and 5 SCA7 mice). **L**, qRT-PCR analysis shows early and progressive downregulation of *Opn1mw* and *Opn1sw* cone genes and *Rhodopsin (Rho)* rod gene in SCA7^{140Q/5Q} retina, as shown by normalization to WT gene expression levels. Two-tailed Student's *t* test ($n = 3–6/genotype$).

Results

General phenotypic features of SCA7 mice carrying 140 CAG repeats

We performed the phenotypic characterization of the SCA7^{140Q/5Q} mouse line, which is derived from the SCA7^{266Q/5Q} knock-in mouse model by CAG repeat contraction (Yoo et al., 2003). SCA7^{266Q/5Q} mice show a very severe infantile-like pathology and early death. SCA7^{140Q/5Q} heterozygous mice have a median lifespan of 54 weeks for both males and females and SCA7^{140Q/140Q} homozygous mice have a much shorter lifespan than heterozygotes (Fig. 1A). Age-

related gain in body weight of SCA7^{140Q/5Q} and SCA7^{140Q/140Q} mice significantly differed from their WT littermates. SCA7^{140Q/5Q} females and males gained weight at the same rate as WT mice up to 12 and 14 weeks, respectively, and then plateaued until 24 weeks with an underweight of 18% for females and 20% for males compared with WT of the same sex and age (Fig. 1B). Subsequently, the weight of SCA7^{140Q/5Q} decreased, while remaining stable for WT mice. The body weight of SCA7^{140Q/140Q} mice plateaued earlier at 10 weeks for males and 12 weeks for females, and strongly decreased after 20 weeks. Compared

Table 1. Electroretinograph analysis of SCA7 mice

		5 weeks (b-wave, μ V)				10 weeks (b-wave, μ V)				15 weeks (b-wave, μ V)				23 weeks (b-wave, μ V)				Two-way repeated-measures ANOVA ^d		
		WT	SCA7	<i>p</i>	% ^b	WT	SCA7	<i>p</i>	% ^b	WT	SCA7	<i>p</i>	% ^b	WT	SCA7	<i>p</i>	% ^b	G	A	GxA
Photopic (Cd·s·m ⁻²)	1	66.2 ± 22.8	65.8 ± 24.5	0,971	36%	66.4 ± 16.4	42.4 ± 17.1	0,035	36%	75.6 ± 16.8	28.2 ± 13.6	<0.001	63%	39.8 ± 13.3	6.4 ± 6	0,004	84%	<0.001	< 0.001	0,046
	3	132 ± 31.9	150 ± 41.5	0,384	32%	132.4 ± 20.5	90.6 ± 42.7	0,049	32%	134 ± 28.3	52.8 ± 34.9	<0.001	61%	90.4 ± 32	14.8 ± 16.9	<0.001	84%	0,002	< 0.001	0,009
	10	167.6 ± 41.3	174.8 ± 25.2	0,776	20%	164.8 ± 26.1	131.4 ± 58.1	0,194	20%	171.4 ± 45.1	83.6 ± 53	0,001	51%	124.4 ± 28.9	20.8 ± 23.8	<0.001	83%	0,005	< 0.001	0,011
Flicker (Hz)	2	135.8 ± 24.2	138 ± 35.1	0,910	37%	137.6 ± 12	86.4 ± 50.9	0,012	37%	136.4 ± 30.3	47.2 ± 32.3	<0.001	65%	96.6 ± 26.4	12.4 ± 14	<0.001	87%	<0.001	< 0.001	0,008
	5	109.8 ± 27	135 ± 52.5	0,211	45%	125.4 ± 13.5	68.4 ± 39	0,007	45%	124.4 ± 28.1	43 ± 29.6	<0.001	65%	83.2 ± 27.5	11.6 ± 13.5	0,001	86%	0,003	< 0.001	0,002
	10	78.6 ± 22.3	104.2 ± 49.9	0,128	39%	85.4 ± 9.3	52 ± 28.9	0,050	39%	89.4 ± 18.7	37 ± 25	0,003	59%	59 ± 16.7	11.2 ± 13.7	0,007	81%	0,026	< 0.001	0,004
	20	33 ± 14.8	48.8 ± 22.5	0,101	32%	34.6 ± 11.8	23.6 ± 15.3	0,248	32%	48 ± 17.6	23.4 ± 13.8	0,013	51%	27.4 ± 12.1	0	0,006	100%	0,067	0,001	0,006
	25	24.4 ± 12	39.2 ± 29.6	0,080	36%	23.8 ± 6.7	15.2 ± 11.1	0,301	36%	36 ± 10.4	15.8 ± 4.2	0,019	56%	13 ± 4.9	0	0,122	100%	0,169	0,001	0,027

^aG, Genotype; A, age; GxA, genotype × age. *p* values, *post hoc* Bonferroni test. Single eye of *n* = 5 mice.

^bPercentage of decrease in SCA7.

with age-matched WT male and female littermates, the body lengths of adult SCA7^{140Q/5Q} and SCA7^{140Q/140Q} males were significantly shorter by 6.6% ($p = 0.0121$) and 23% ($p < 0.0001$), respectively, and those of adult SCA7^{140Q/5Q} and SCA7^{140Q/140Q} females by 6.5% ($p < 0.0034$) and 21% ($p < 0.0001$), respectively (Fig. 1C). SCA7^{140Q/5Q} mice, which represent the genetic status of most SCA7 patients, were then used for a detailed phenotypic characterization.

Examination of general physical appearance and body shape of SCA7^{140Q/5Q} mice did not reveal gross morphologic abnormalities at 28 weeks of age. The proportion of lean, fat, and bone tissues was similar to their WT littermates, when normalizing to body weight (Fig. 1D). The only exceptions were the total bone area that was smaller in SCA7^{140Q/5Q} males and females compared with WT mice, and the bone mineral content that was smaller in SCA7^{140Q/5Q} females. In contrast to the severely affected SCA7^{266Q/5Q} mice, SCA7^{140Q/5Q} mice presented no complication of male fertility and offspring delivery (data not shown). From ~40 weeks of age, SCA7^{140Q/5Q} mice progressively showed severe motor deficit and were easily distinguishable from control animals because of their smaller body size and hypoactivity, and some with a hunched posture (kyphosis) and tremors. Because of the poor health status and following recommendation of our animal health regulator, SCA7^{140Q/5Q} mice were generally killed at this stage.

Degeneration of photoreceptors, pigmented epithelium, and Bruch's membrane

Previous studies of SCA7 mouse retinopathy mainly focused on photoreceptor pathology. To get a broader insight into the SCA7^{140Q/5Q} mouse retinopathy, longitudinal analysis was made by correlating noninvasive OCT and ERG, and histologic and molecular analysis. The OCT measurement of 8 different morphologic parameters indicated that the overall structure of SCA7^{140Q/5Q} retina was normal at 9 weeks (Fig. 2A–I). However, from 15 weeks, photoreceptor segment layers of SCA7 mice progressively got thinner with age compared with WT littermates (Fig. 2C). The similar thinning was observed for the ONL and the retina thickness of SCA7 mice but occurred later (23 weeks) and not as severely (Fig. 2B,D). There was no clear scalable alteration of thickness of the INL, the IPL, or any other eye structures in SCA7 mice (Fig. 2E–H), except for the anterior chamber that showed a significant reduction from 23 weeks onward (Fig. 2J).

ERG studies in SCA7 patients showed that cone dysfunction precedes rod dysfunction (Michalik et al., 2004). We evaluated

cone function of WT and SCA7^{140Q/5Q} mice by measuring the cone-derived b-wave amplitudes of photopic (single flashes ERG of 1, 3, and 10 Cd·s·m⁻²) and flicker responses (5 frequencies between 2 and 25 Hz) over time. At 5 weeks, b-wave amplitudes of both photopic and flicker responses of SCA7^{140Q/5Q} mice were similar to WT littermates. However, at 10 weeks, the b-wave amplitudes of photopic and flicker responses of SCA7^{140Q/5Q} mice significantly decreased relative to WT mice, between 32% ($p = 0.035$) and 36% ($p = 0.045$) for photopic flashes and between 37% ($p < 0.012$) and 45% ($p = 0.007$) depending on flicker frequency (Fig. 2J,K; Table 1). The loss of b-wave amplitudes of photopic responses and flicker further worsened with age, with reductions between 81% and 100% at 23 weeks.

The green and blue opsin (OPN1MW, OPN1SW, respectively) of cones and the rhodopsin of rods are light-sensitive pigments that initiate vision and represent major components of photoreceptor outer segments. qRT-PCR showed that expression of these photoreceptor identity genes progressively decreased with age in SCA7^{140Q/5Q} mice (Fig. 2L). Notably, the level of *Opn1mw* and *Opn1sw* mRNAs already showed ~65% ($p < 0.0036$) and 90% ($p < 0.0043$) reduction, respectively, in 10-week-old mutant mice, when cone-derived ERG responses began to decrease. The decrease of cone opsin mRNAs was earlier and more drastic than for the *Rho* mRNA, consistent with the primary alteration of cone function in SCA7 patients. Therefore, the loss of cone ERG of SCA7^{140Q/5Q} mice closely correlates with the loss of cone opsins expression, and both occur before a significant shortening of segments detected by OCT.

Histology and electron microscopy indicated that photoreceptor outer segments are almost completely lost at 44 weeks in SCA7^{140Q/5Q} mice and at 20 weeks in SCA7^{140Q/140Q} mice, whereas inner segments showed only a slight reduction in both SCA7 genotypes, compared with WT retina (Fig. 3A,B). Additional degenerative signs of SCA7 photoreceptors included disorganization of the remnant outer segments, swollen mitochondria and vesicular membrane accumulation in inner segments, several dark-stained inner segments, and photoreceptor nuclei (Fig. 3C). Interestingly, we found striking anomalies of the retinal pigmented epithelium (RPE) and Bruch's membrane of SCA7^{140Q/5Q} retina, never reported in previous models to our knowledge. First, the thickness of RPE was clearly increased in SCA7 mice compared with controls (Fig. 3D). Second, on electron microscopy, while the normal RPE (Fig. 3E) contains translucent infolding membranes in contact all along the basement membrane, SCA7 RPE showed discontinuous and opaque

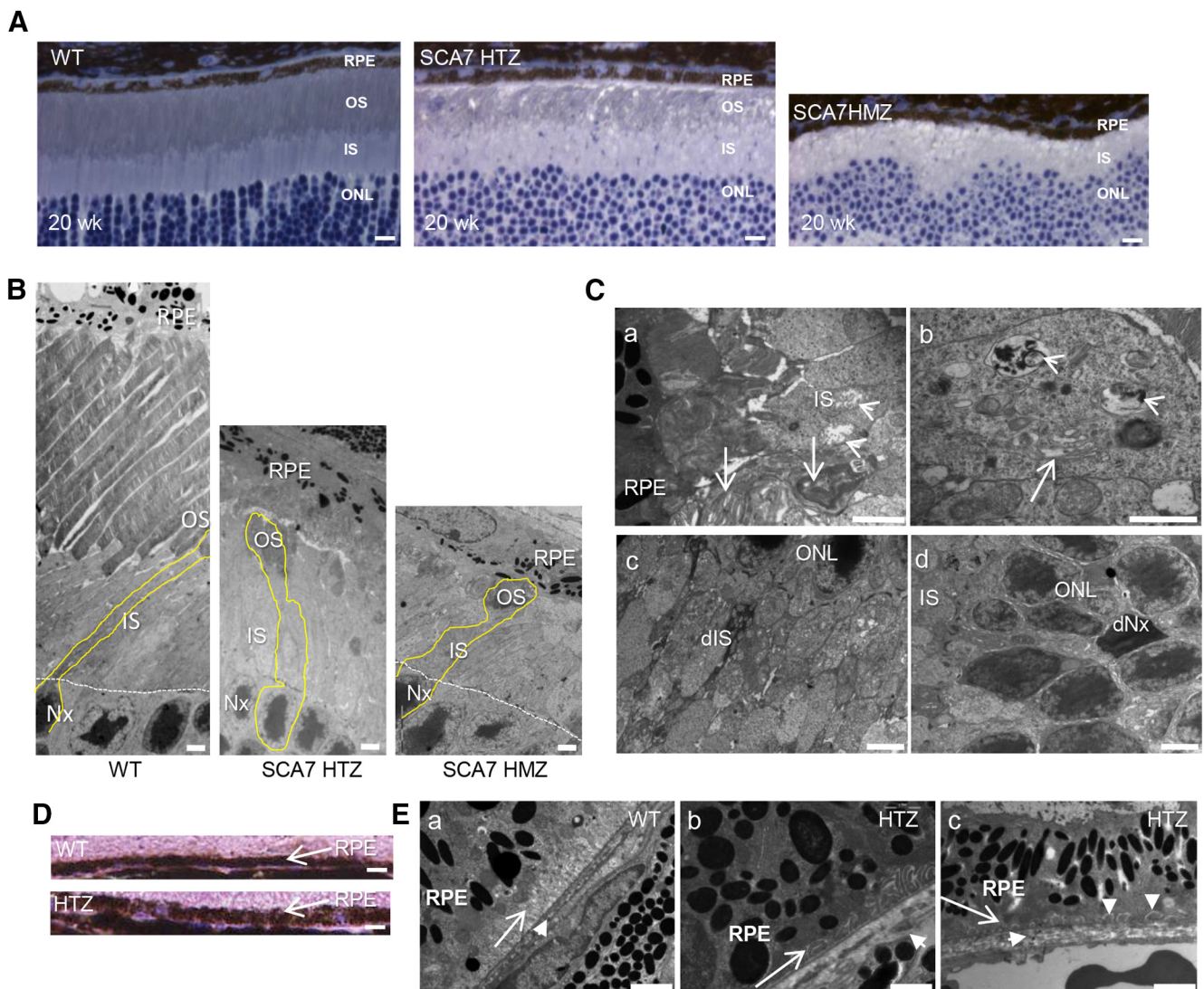


Figure 3. Tissue and cellular alterations of SCA7 mouse eye. **A**, Histologic sections of retina at 20 weeks represent the progressive thinning of outer segment (OS) layer in the SCA7^{140Q/5Q} heterozygous (HTZ) retina and the absence of OS in the more severe SCA7^{140Q/140Q} homozygous (HMZ) retina compared with WT retina. IS, Inner segment layer. Scale bar, 15 μ m. **B**, Electron micrographs represent the progressive disappearance of OS and the shortening of IS of 44-week-old SCA7 HTZ and 20-week-old SCA7 HMZ, compared with WT mice. Photoreceptor nuclei (Nx). Scale bar, 10 μ m. **C**, Electron micrographs of 20-week-old SCA7 HMZ retina. The remnant OSs have lost their parallel organization (arrows), and the IS contains swollen and disrupted mitochondria (arrowheads) (**Ca**). The IS shows dilated and vesiculated endoplasmic reticulum (arrow) and accumulation of vesicular membranes (arrowhead) (**Cb**). Dark degenerating IS (dIS) with numerous abnormal mitochondria (**Cc**). Dark photoreceptor nuclei (dNx) (**Cd**). Scale bars: **Ca, Cb**, 2 μ m; **Cc, Cd**, 5 μ m. **D**, Histologic sections comparing the thickness of WT and SCA7 RPE at 20 weeks. Scale bar, 15 μ m. **E**, Electron micrographs comparing the basal infolding membrane of RPE and Bruch's membrane of WT and SCA7 mice. In WT (**Ea**), the basal infolding membrane of RPE (arrow) shows a typical lamellar organization with translucent lumen, and a regular Bruch's membrane (short arrow). In contrast, in SCA7 retina, the infolding membrane (long arrow) is either opaque (**Eb**) or completely absent (**Ec**), whereas the Bruch's membrane (short arrow) is enlarged and disorganized (**Eb, Ec**), and occasionally interrupted (**Eb**). In addition, homogeneous deposits are found between the basement membrane and plasma membrane of RPE (vertical arrowheads in **Ec**). Scale bar, 2 μ m.

infolding membranes, with homogeneous deposits between the plasma membrane and the basement membrane (Fig. 3E). The Bruch's membrane of SCA7 retina showed enlargement and disorganization compared with WT in which the Bruch's membrane was thin and regular (Fig. 3E).

Deficits in motor activity and coordination

We performed longitudinal motor performance analysis of SCA7^{140Q/5Q} and WT male littermates using a variety of motor activity paradigms. The spontaneous activity measured with the open field showed that SCA7^{140Q/5Q} mice become significantly hypoactive at 16 weeks, and hypoactivity worsened with age (Fig. 4A–D). Specifically, they traveled shorter distances in the arena, ran slower, rested longer times, and made less rears than WT

littermates. However, SCA7^{140Q/5Q} mice did not show anxiety behavior, since they explored the central area similarly to WT mice (Fig. 4E).

When comparing the mean latency to fall from the accelerated rotarod, SCA7^{140Q/5Q} mice fell earlier than WT mice with statistically significant differences from the age of 24 weeks (Fig. 4F). On the notched bar test, SCA7^{140Q/5Q} mice performed similarly to WT littermates up to 17 weeks (Fig. 4G,H). From 20 weeks, performance worsened relative to age-matched WT mice for the time required and the number of mistakes done when crossing the bar. For beam walking test, SCA7^{140Q/5Q} mice took longer time to cross the bar from 20 weeks (Fig. 4I), while the number of mistakes was not significantly different between genotypes (data not shown).

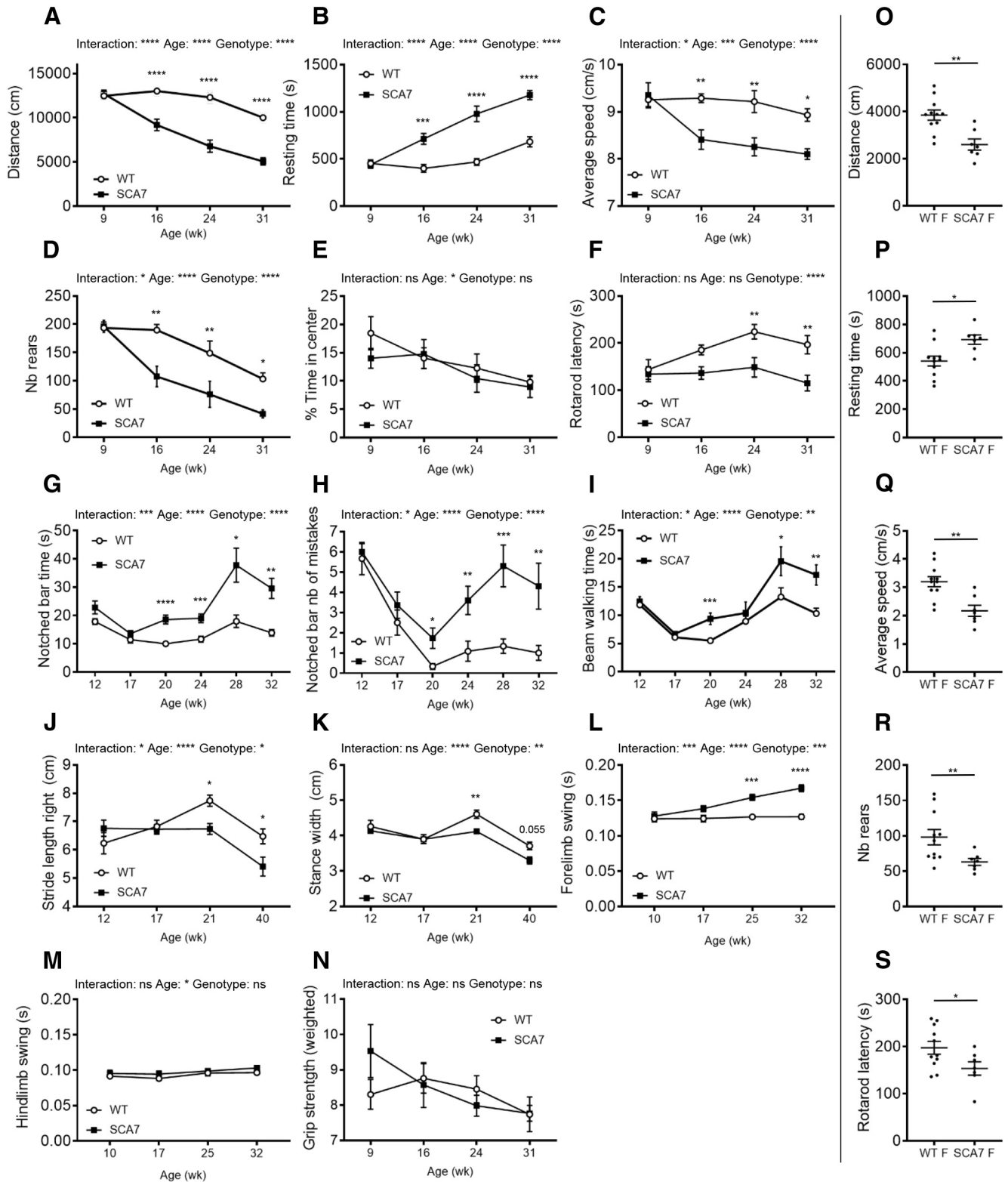


Figure 4. Behavioral and motor deficits of SCA7 mice. **A–E**, Open field analyses show that SCA7^{140Q/50} males ($n = 6$) progressively become hypoactive relative to WT male littermates ($n = 6$), according to the distance traveled (genotypes: $F_{(1,5)} = 82.21, p = 0.0001$; **A**), the resting time (genotypes: $F_{(1,5)} = 43.32, p = 0.0001$; **B**), the average speed (genotypes: $F_{(1,5)} = 64.12, p = 0.0005$; **C**), and the number (Nb) of rears (genotypes: $F_{(1,5)} = 11.71, p = 0.0188$; **D**). However, SCA7 mice show no difference with WT mice as for the time spent in the arena center (genotypes: $F_{(1,5)} = 0.26, p = 0.6307$) (**E**). Accelerating rotarod (mean latency to fall) shows progressive motor deficit of SCA7^{140Q/50} males compared with WT males (genotypes: $F_{(1,5)} = 6.61, p = 0.0499$; **F**). Notched bar [time to cross the bar (genotypes: $F_{(1,123)} = 27.96, p < 0.0001$; **G**) and number of mistakes (genotypes: $F_{(1,123)} = 29.78, p < 0.0001$; **H**)] indicates that SCA7^{140Q/50} males ($n = 10$) progressively have altered motor coordination and balance compared with WT males ($n = 12$). Beam walking also shows that motor performances of SCA7^{140Q/50} males ($n = 10$) mice are affected compared with WT males ($n = 12$) (genotypes: $F_{(1,123)} = 13.60, p = 0.0015$; **I**). Spatial gait analysis using footprint patterns indicates that SCA7^{140Q/50} males ($n = 9–11$) progressively have shorter stride length of the four limbs [only right forelimb shown (genotypes: $F_{(1,74)} = 4.75, p = 0.0325$; **J**) and shorter stance width (only forelimbs shown (genotypes: $F_{(1,74)} = 10.11, p = 0.0021$; **K**)] compared with WT littermates ($n = 9–12$). Temporal gait analysis using Catwalk shows that swing times of forelimbs [average of right and left forelimbs

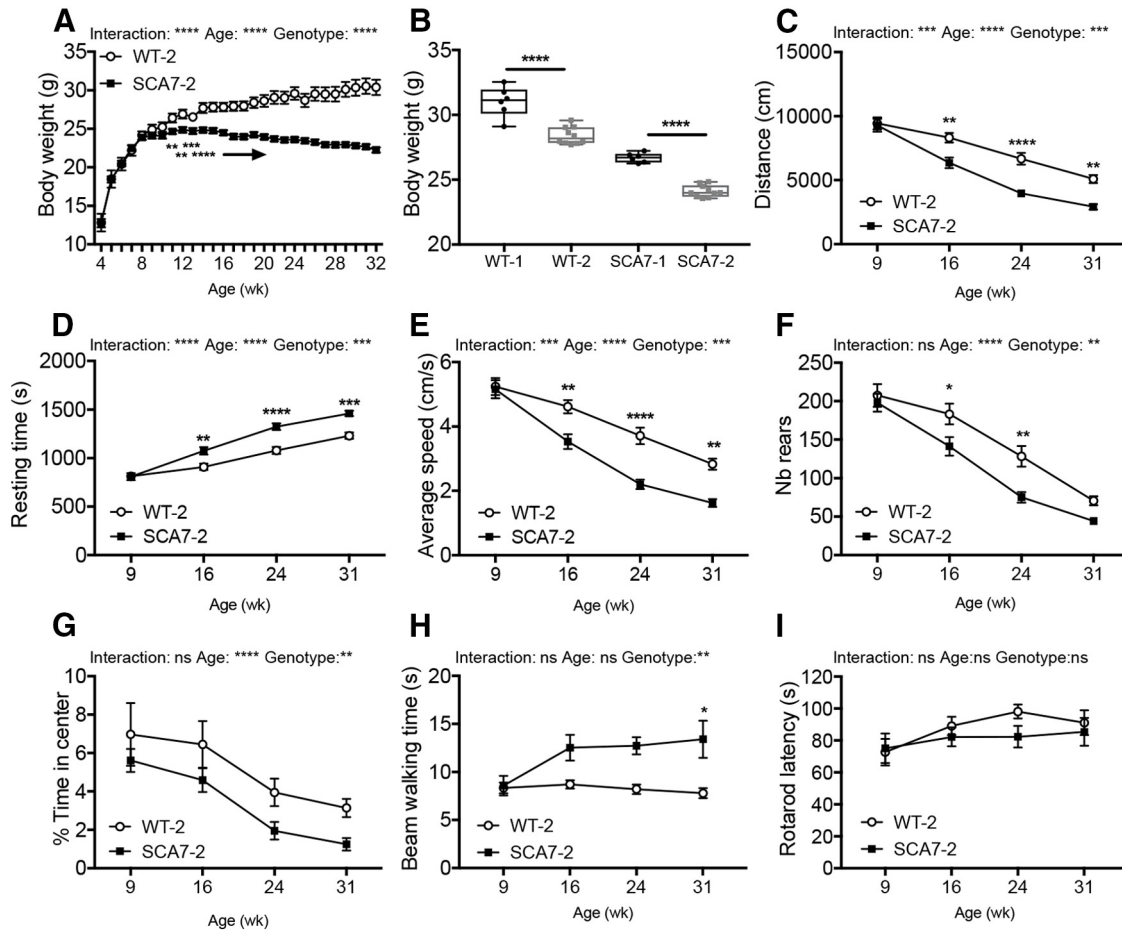


Figure 5. Motor phenotypes of a second colony of SCA7 mice. **A**, Gain in body weight of a second colony of SCA7^{140Q/5Q} males (SCA7-SCA2) ($n = 10$) is lower than their WT (WT-2) male littermates ($n = 10$) (genotypes: $F_{(1,26)} = 15.3$, $p = 0.0006$). **B**, Comparison of body weight of adult males of the first colony [WT-1 ($n = 5$), SCA7-1 ($n = 9$)] and the second colony (WT-2, SCA7-SCA2) indicates that animals of the second colony have lower body weight, regardless of the genotype. Two-tailed Student's t test. **C–F**, Open field analyses show that SCA7-SCA2 mice are hypoactive relative to their WT-2 littermates from 16 weeks of age (distance: genotypes: $F_{(1,26)} = 14.3$, $p = 0.0008$; resting time: genotypes: $F_{(1,26)} = 15.29$, $p = 0.0006$; average speed: genotypes: $F_{(1,26)} = 14.34$, $p = 0.0008$; nb of rear: genotypes: $F_{(1,26)} = 8.48$, $p = 0.0073$). **G**, Open field indicates that SCA7-SCA2 mice spend less time in the arena center, compared with WT-2 littermates (genotypes: $F_{(1,26)} = 8.21$, $p = 0.0081$). **H**, Motor performances on beam walking of SCA7-SCA2 mice are affected compared with WT-2 littermates (genotypes: $F_{(1,26)} = 9.41$, $p = 0.0050$). **I**, Motor performance on accelerating rotarod (mean latency to fall) of SCA7-SCA2 mice is comparable with WT-2 littermates (genotypes: $F_{(1,26)} = 0.78$, $p = 0.3860$). **A**, **C–I**, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$; two-way ANOVA with repeated measurement, followed by *post hoc* Bonferroni test. Data are mean \pm SEM.

The forward gait patterns were quantitatively assessed for spatial and temporal gait parameters, both for the forelimbs and hindlimbs, using, respectively, footprint and Catwalk, an automated gait analysis system. On footprint, SCA7 and WT mice performed similarly in all gait parameters until 17 weeks. From 21 weeks, SCA7^{140Q/5Q} mice made significantly shorter steps (stride length) with forelimbs and hindlimbs of each body side (Fig. 4J). Similarly, the stance width between forelimbs or between hindlimbs was consistently shorter in SCA7^{140Q/5Q} mice

from 21 weeks (Fig. 4K). Temporal gait analysis as recorded by Catwalk showed that the swing duration of right and left forelimbs was significantly affected in SCA7^{140Q/5Q} mice from 25 weeks, while the swing duration of hindlimbs was not affected (Fig. 4L,M). Finally, the grip strength test showed that the muscle strength of SCA7^{140Q/5Q} mice normalized to animal body weight was similar to WT mice (Fig. 4N). Similar to males, SCA7^{140Q/5Q} females showed initial motor defects at 16 weeks on open field test and at 25 weeks on rotarod test (Fig. 4O–S), and their motor performances worsened with age (data not shown).

Replicability of mouse phenotyping across laboratories has important implications in fundamental research and preclinical studies and is often hampered by methodological issues. To assess the replicability of SCA7 mouse phenotype, a second SCA7^{140Q/5Q} mouse colony was raised in the husbandry of a different research center and was analyzed by independent experimenters and instruments. Mice from the second colony were tested using the standardized protocols established for the first colony (for further details, see Materials and Methods). As in the first colony, SCA7^{140Q/5Q} males gained less weight than WT littermates, reaching a plateau at 14 weeks (Fig. 5A). However, the average weights of adult SCA7^{140Q/5Q} and WT males from the

(genotypes: $F_{(1,26)} = 19.17$, $p = 0.0004$; **L**), but not hindlimbs (average of right and left hindlimbs (genotypes: $F_{(1,26)} = 0.92$, $p = 0.3458$; **M**)) of SCA7^{140Q/5Q} males ($n = 15$) progressively become slower than those of WT males ($n = 10$). Grip strength performance of SCA7^{140Q/5Q} males ($n = 6$) normalized to mouse body weight is similar to WT males ($n = 6$) (genotypes: $F_{(1,40)} = 0.19$, $p = 0.6613$; **N**). **O–S**, Sixteen-week-old SCA7^{140Q/5Q} females (SCA7-F) ($n = 7$) are hypoactive relative to WT female littermates (WT-F) ($n = 11$) in open field test, according to the distance traveled (**O**), resting time (**P**), average speed (**Q**), and Nb of rears (**R**), and 25-week-old SCA7-F ($n = 7$) show motor defect in rotarod relative to WT-F ($n = 11$) (**S**). Data are mean \pm SEM. Two-way ANOVA with repeated measurement (**A–F**, **I**, **L–N**) or ordinary two-way ANOVA (**G**, **H**, **J**, **K**), followed by *post hoc* Bonferroni test: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$; two-tailed Student's t test (**O–S**).

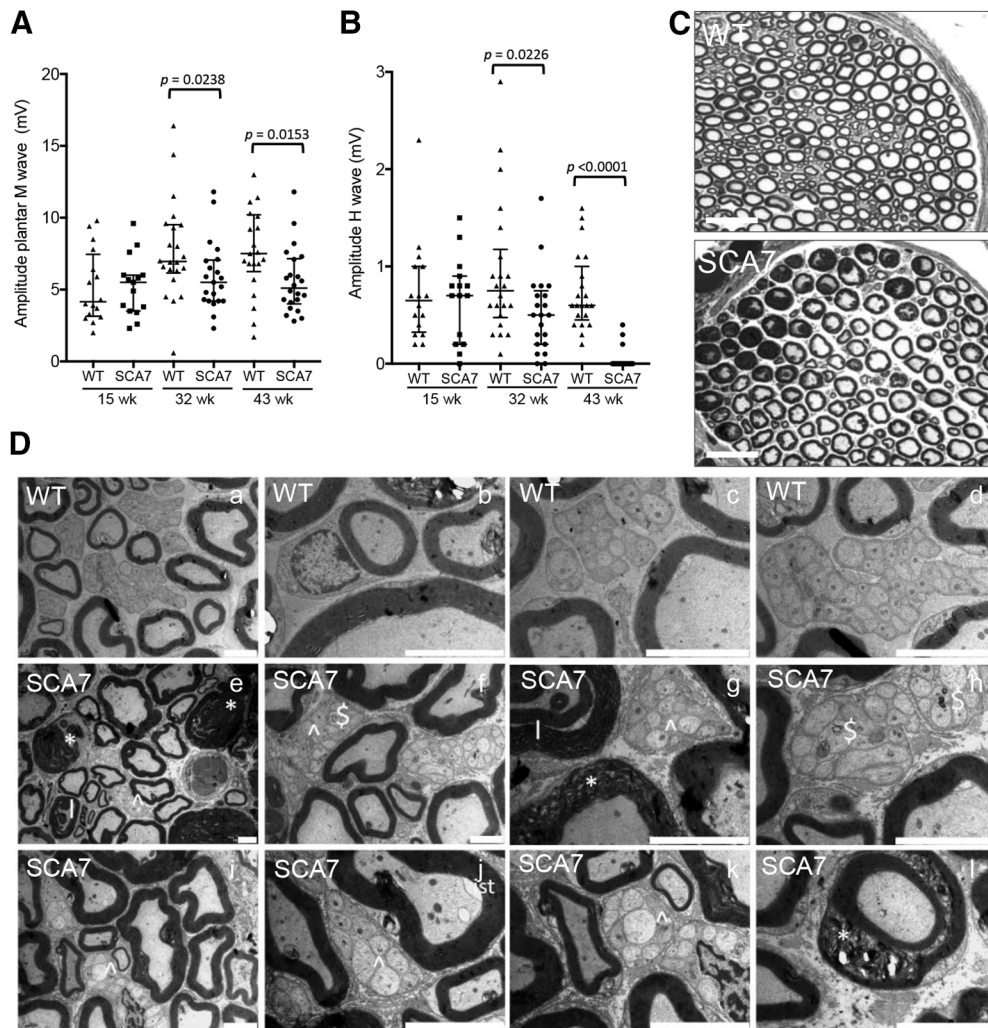


Figure 6. Peripheral nerve alterations in SCA7 mice. Electromyograph activities of the sciatic nerve. Amplitude of motor M-wave (**A**) and sensory H-wave (**B**) in SCA7^{140Q/5Q} mice relative to WT littermates (15 weeks: $n = 16$ WT and 15 SCA7; 32 week: $n = 22$ WT and 21 SCA7; 43 week: $n = 22$ WT and 21 SCA7). Scatter plot represents median with interquartile range. Mann–Whitney test. **C**, Comparison of semithin sections of sciatic nerve of SCA7^{140Q/5Q} and WT mice. The mutant shows irregular and degenerated myelinated fibers and loss of small fibers. Scale bars, 50 μ m. **D**, Electron microscopy analyses of the sciatic nerve. Compared with WT littermates (**Da–Dd**), sciatic nerve section of SCA7^{140Q/5Q} mice (**De–Dl**) at 43 week shows severe abnormalities in both myelinated and nonmyelinated fibers, including myelin degeneration (* in **De, Dg, Dl**), infolding-like structure (l in **De, Dg**), abnormal Remak bundle (^ in **De–Dg, Di–Dk**), autophagy (§ in **Df, Dh**), and inner swelling tongue (ist in **Dj**). Scale bars: **Da, Dj, Dk**, 5 μ m; **Db–Dd, Df–Di, Dl**, 2 μ m; **De**, 10 μ m.

second colony were 6.5% ($p < 0.0001$) lighter than the mice of the first colony (Fig. 5B), indicating a significant environment effect regardless of the genotype. As for the first colony, open field analysis revealed the hypoactivity of SCA7^{140Q/5Q} mice from 16 weeks of age, with a decreased total distance traveled in the arena, a decreased average speed, an increased resting time, and a decreased number of rears (Fig. 5C–G). In contrast to the first colony, the exploration of the open central area suggested a tendency of SCA7 mice to anxiety behavior in the second environment. As for the first colony, SCA7^{140Q/5Q} mice of the second colony took significantly longer time to cross the beam walking bar (Fig. 5H). However, accelerated rotarod, which had a smaller rod diameter than the previous apparatus used for the first colony, led to short latency to fall even for WT at baseline and hence did not reveal any difference in the latency between the two genotypes (Fig. 5I).

In summary, the hypoactivity of SCA7^{140Q/5Q} mice revealed by open field tests appeared at an early time point (onset at 16 weeks), while defects in motor performances (as shown in

rotarod of the first colony) and in specific proprioceptive abilities (as reflected by gait alteration in notched bar, beam walking, footprint, and catwalk) appeared later between 20 and 25 weeks, depending on the test. Except for rotarod, the onset and progression of motor phenotypes of SCA7^{140Q/5Q} were replicable in two different research centers.

Morphologic and functional alterations of the PNS

A peripheral neuropathy was reported in some, but not all, neurophysiological studies in patients (van de Warrenburg et al., 2004; Horton et al., 2013; Salas-Vargas et al., 2015) and has never been explored in mouse models. To understand the cause of motor alterations in SCA7^{140Q/5Q} mice, the activity of the PNS was first assessed over time by measuring the sciatic nerve function by electromyography. At 15 weeks, median amplitudes of plantar M-wave and H-wave of SCA7^{140Q/5Q} mice were similar to WT littermates (Fig. 6A,B). However, both plantar M-wave and H-wave amplitudes were reduced by 21% ($p = 0.0238$) and by 33% ($p = 0.0226$), respectively, at 32 weeks in SCA7 mice. At 43 weeks, the plantar M-wave amplitude was reduced by 31%

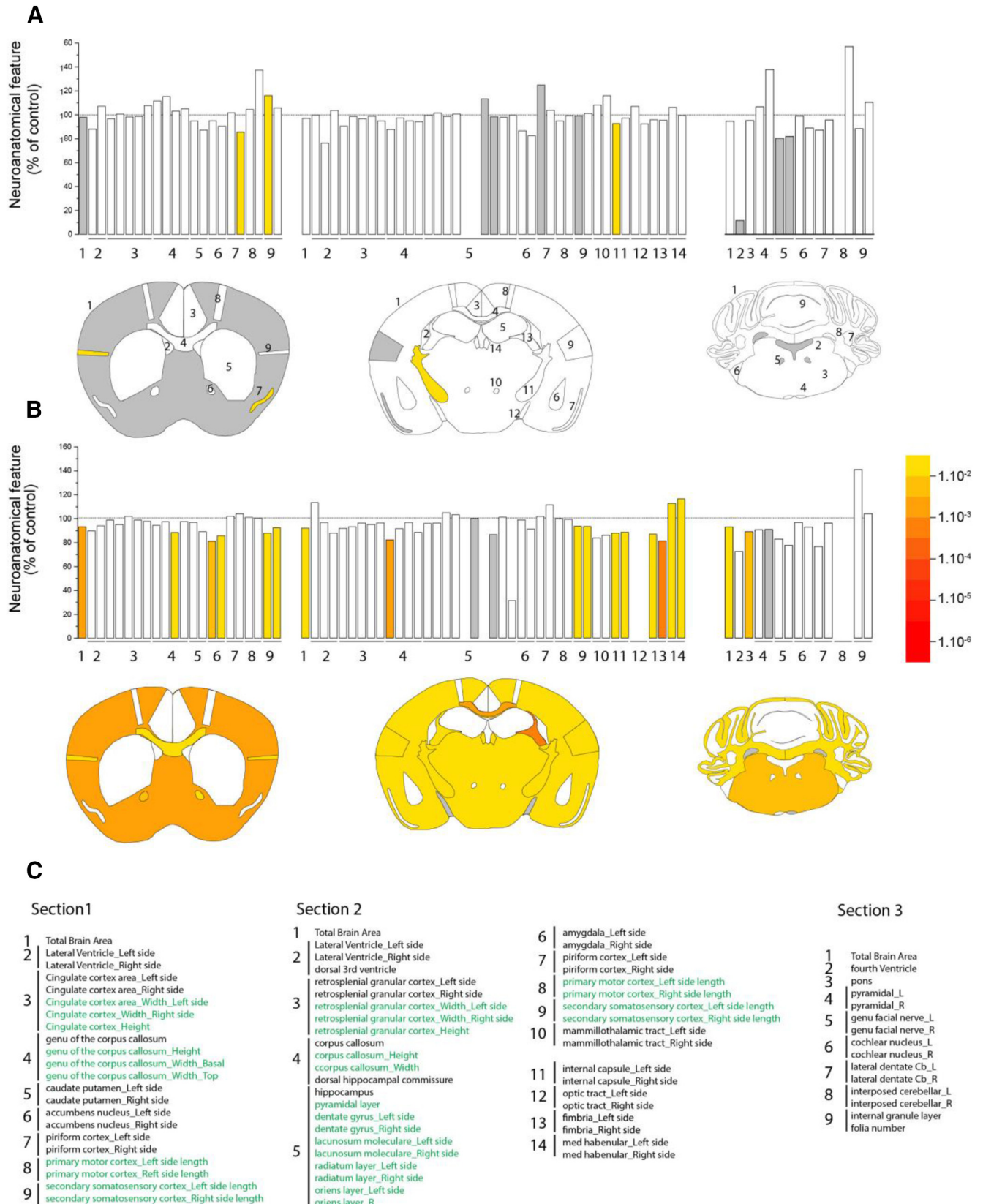


Figure 7. Neuroanatomical alterations in SCA7 mice. The figure summarizes systematic surface measurement of 78 anatomy parameters across 20 distinct brain subregions with a precision of 30 μm and down to 5 μm resolution. **A, B**, Top, Histograms represent the percentage increase or decrease of measured brain regions of SCA7 mice relative to the controls (100%) at 33 weeks (**A**) and 50 weeks (**B**). **A, B**, Bottom, Schematic representation of affected brain regions plotted in coronal planes according to p values in SCA7^{1400/50} mice versus WT littermates (5 or 6 mice per genotype). Left, Striatum section (bregma 0.98 mm). Middle, Hippocampus section (bregma -1.34 mm). Right, Cerebellum section (bregma -5.80 mm). White represents a p value >0.05. Gray represents missing data. Numbers indicate a total of 78 assessed brain regions (listed in **C**). **C**, List of assessed parameters and associated numbers across the three coronal sections. Green represents a length measurement. Black represents an area measurement. At 33 weeks (**A**), there is no major surface difference between SCA7^{1400/50} mice and WT littermates.

($p < 0.0153$), while the H-wave was almost absent (95%, $p < 0.0001$). To correlate these functional abnormalities with structural status, sciatic nerve sections were analyzed by histology and electron microscopy. Compared with WT mice, a cross section of sciatic nerve of SCA7 mice showed clear alterations of myelinated fibers and decreased number of small fibers (Fig. 6C). On electron microscopy (Fig. 6D), several structural alterations were observed in myelinated fibers of SCA7^{140Q/5Q} mice, including myelin degeneration and infolding-like structures as well as axonal modifications characterized by inner swelling tongue and autophagy. Nonmyelinated fibers displayed abnormal structures of Remak bundles. In conclusion, motor components of the sciatic nerve morphology and activity are affected in SCA7^{140Q/5Q} mice.

Distinct morphologic alterations in SCA7 mouse brain

Brains of SCA7 patients show prominent neurodegeneration in the cerebellum and atrophy of other brain regions. To establish a systematic survey of brain damage of SCA7 mice, the morphology of three different coronal brain sections of SCA7^{140Q/5Q} and WT mice was studied using neuroanatomical measurement of 78 anatomy parameters across 20 distinct brain subregions (Mikhaleva et al., 2016). At 33 weeks, there was no major surface difference between SCA7^{140Q/5Q} mice and WT littermates (Fig. 7A,C). However, end-stage SCA7^{140Q/5Q} mice (50 weeks) showed significant reduction of brain areas in the three coronal sections (from -6.7% to -8%) with both white and gray matter alterations. Atrophy of gray matter structures included the somatosensory cortex, the pons, whereas affected white matter regions comprised the corpus callosum, the anterior commissure, the internal capsule, and the fimbria of the hippocampus (Fig. 7B,C).

We then aimed to capture SCA7 mouse brain alterations at earlier disease stage using high-resolution MRI. MRI measurement clearly showed a global atrophy of the SCA7 mouse brains compared with WT at 25 weeks ($p < 0.05$) (Fig. 8A). Moreover, the decrease of whole-brain volume of SCA7^{140Q/140Q} mice was 2 times higher than SCA7^{140Q/5Q} ($p < 0.05$), confirming the stronger severity of the disease in homozygous mice. Interestingly, our automated segmentation pipeline highlighted specific brain regions particularly atrophied in the mouse model, such as the corpus callosum, and subparts of the hippocampus and cortex (Fig. 8B,C). No significant atrophy of the cerebellar cortex was measured in SCA7 mice, which can be because of strong variability of volume measurement in this structure.

To further correlate cerebellar neuropathology and motor alterations, morphometric parameters were measured on sagittal sections of the central vermis at different disease stages. The vermis length (axis from lobule V to IX) of SCA7^{140Q/5Q} mice was smaller to WT at 34 weeks (Fig. 8D,F). Interestingly, the vermis width (axis from lobule VI to X) was significantly shorter in

SCA7^{140Q/5Q} mice at 12 weeks already, and this difference remained at later stages but did not worsen with the motor phenotype (Fig. 8D,F). Strikingly, there was no major or progressive alteration of the MCL thickness in any of the lobules analyzed (Fig. 8G; and data not shown).

Morphologic and functional alterations of PCs

Since PCs are highly vulnerable neurons in inherited ataxias, their morphology, connectivity, and function were investigated. The area of PC soma (Fig. 8E) was significantly smaller in lobule VI ($p = 0.0018$) of 34 week SCA7^{140Q/5Q} compared with age-matched WT mice, while in lobules IX and X PC soma did not differ (Fig. 8H). In contrast, PC circularity index was affected in lobules IX and X ($p = 0.0006$ and $p = 0.0005$, respectively), but not in lobule VI (Fig. 8I).

We then analyzed synapse integrity between PC and CFs of inferior olivary neurons as well as between PC and parallel fibers (PFs) of GCs using vGLUT2 and vGLUT1 markers, respectively. By Western blot analysis, the bulk level of vGLUT2 showed a 20% decrease ($p = 0.0022$) in SCA7 cerebellum compared with WT, while the level of vGLUT1 was not affected (Fig. 9A). Consistently, vGLUT1 immunostaining of PC-PF contact points in the MCL of cerebellar sections showed no significant change (Fig. 9B). In contrast, vGLUT2 immunolabeling of PC-CF contact points showed that the extension of CF terminals along the PC dendritic tree was significantly reduced in lobule VI and X, respectively, by 15.8% ($p = 0.029$) and 23% ($p = 0.034$) in SCA7^{140Q/5Q} compared with WT mice (Fig. 9B,C). Further quantification did not show abnormal average density and average volume of vGLUT2 contact points in SCA7 mice (data not shown). However, coimmunolabeling of vGLUT2 and CALB1 revealed frequent aggregation of vGLUT2 contact points along large dendritic arborization of PC in SCA7 cerebellum (Fig. 9C, left). Therefore, despite different morphologic alterations of PC soma of lobule VI and X, synaptic contacts between PC and CF were affected in both lobules.

Intrinsic membrane properties of PC determine their spontaneous firing pattern even in the absence of synaptic inputs (Gruol and Franklin, 1987; Hausser and Clark, 1997). Any alteration in the precision of their pacemaking activity may be the result of PC cellular dysfunctions and may affect cerebellar functions (Hoxha et al., 2018). To investigate the correlation between PC function, morphologic phenotypes, and motor deficits, we assessed whether the intrinsic properties of PC spontaneous discharge were altered in SCA7^{140Q/5Q} mice at 22 and 38 weeks. We recorded spontaneous activity of PCs located in lobule VI and IX/X in WT and SCA7 littermates using juxtacellular recordings of PCs in acute cerebellar slices at a near physiological temperature (32°C) (Fig. 9D). To focus on PC intrinsic excitability and to rule out network contributions, excitatory and inhibitory synaptic transmissions were pharmacologically blocked. PC discharges were evaluated using the mean firing frequency (measurement of the mean ISI) and the CV₂, which estimates the variability of the firing pattern between two consecutive ISIs (Holt et al., 1996; Arancillo et al., 2015). At 22 weeks, no difference in the firing properties of PCs located in lobule VI was detected between WT and SCA7 mice. In contrast, in symptomatic SCA7 mice of 38 weeks, PCs exhibited a higher regularity of discharge in both lobules VI ($p < 0.001$) and IX/X ($p < 0.001$) (Fig. 9D, middle) and a decrease in the mean firing rate in lobule VI ($p = 0.004$) (Fig. 9D, bottom). Our results show that intrinsic properties of PC excitability are altered in symptomatic SCA7 mice.

←

At 50 weeks (B), the three coronal sections of SCA7 mouse brain show striking reduction (section 1: -6.7% , $p = 0.0017$; section 2: -8.1% , $p = 0.0145$; section 3: -7% , $p = 0.0238$) with both white and gray matter atrophy. Affected white matter regions include the corpus callosum (section 1: -11.6% , $p = 0.0226$; section 2: -17.8% , $p = 0.0049$, for the area of the soma of the corpus callosum), the anterior commissure (-17.8% , $p = 0.0070$, based on average of left and right hemispheres), the internal capsule (-11.9% , $p = 0.0099$, based on an average between the left and the right hemispheres), and the fimbria of the hippocampus (-13.9% , $p = 0.0288$). Altered gray matter structures are confined to the somatosensory cortex across two sections (section 1: -9.8% , $p = 0.0055$, based on an average between the left and the right hemispheres; section 2: -6.6% , $p = 0.0004$) and the pons of the cerebellum section (-10.9% , $p = 0.0054$). Data were analyzed using a Student's *t* test.

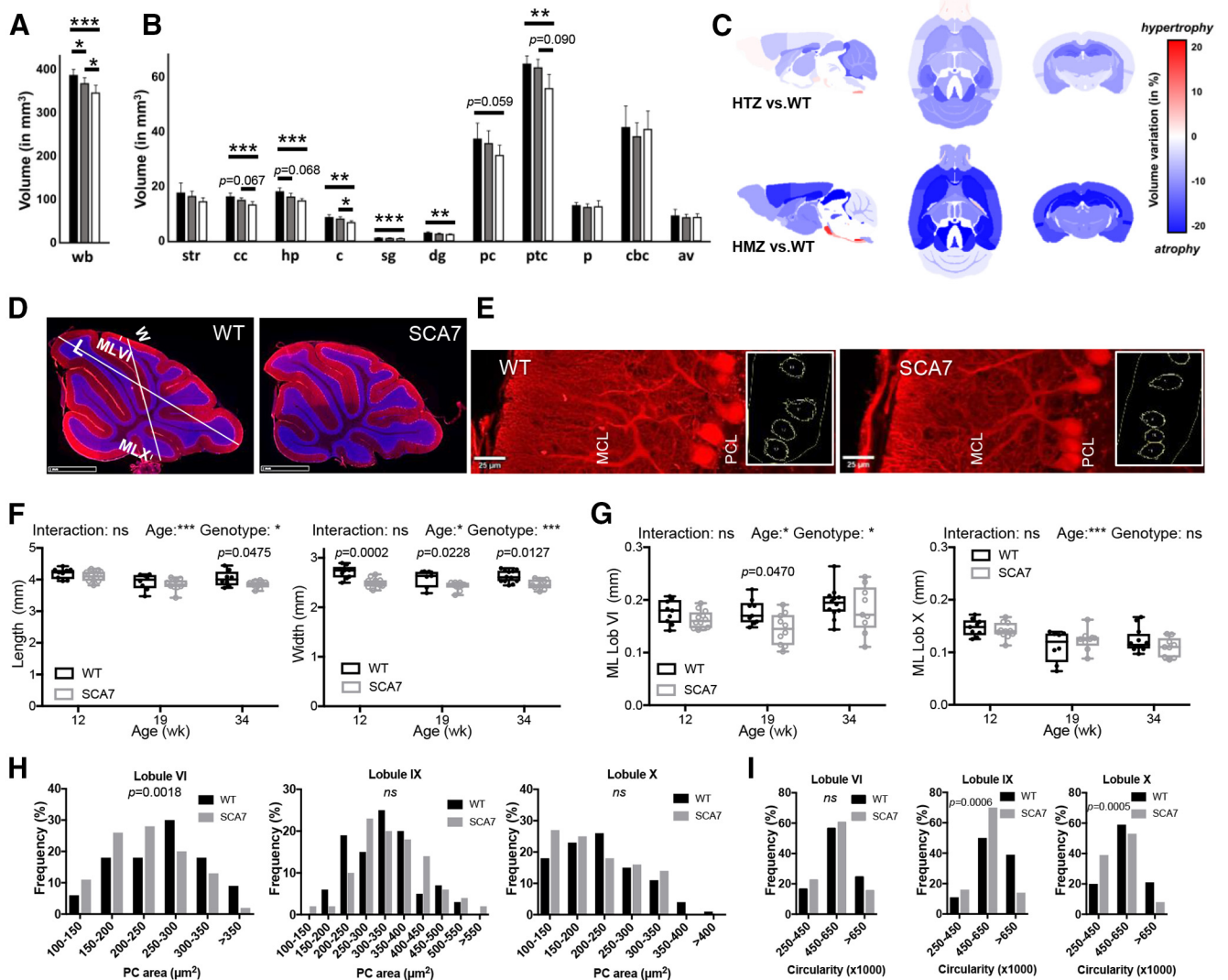


Figure 8. Brain region atrophy and morphologic alteration of PCs in SCA7. **A–C**, *Ex vivo* MRI measurement of whole-brain volume (**A**) and individual brain structures (**B**) represents differences between WT ($n = 8$), SCA7^{1400/50} ($n = 9$), and SCA7^{1400/1400} ($n = 6$) mice at 24 weeks (black, gray and white bars, respectively). wb, Whole brain; str, striatum; cc, corpus callosum; hp, hippocampus; c, colliculus; sg, stratum granulosum; dg, dentate gyrus; pc, prefrontal cortex; ptc, parietotemporal cortex; p, pons; cbc, cerebellar cortex; av, arbor vitae. **A, B**, Data are mean \pm SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; one-way ANOVA with *post hoc* Bonferroni test. Variation maps (**C**) of brain structure volumes of MRI that compare WT versus SCA7^{1400/50} heterozygous (HTZ) mice (top) and WT versus SCA7^{1400/1400} homozygous (HMZ) mice (bottom). Variation of brain region volume was calculated in each ROI as follows: Variation = $100 \times [\text{Volume}(\text{SCA7}) - \text{Volume}(\text{WT})] / \text{Volume}(\text{WT})$. Statistical analysis was performed by a nonparametric Kruskal–Wallis test with correction for multiple comparisons. Probability levels are indicated above vertical bars when trends of difference between groups are observed. **D, E**, CALB1 immunostaining (red) of cerebellar vermis section (**D**) and PCs (**E**) in lobule VI of the vermis of WT and SCA7 mice (DAPI in blue). Axis from lobule V to IX and axis from lobule VI to X in **D** are used to measure the vermis length (L) and vermis width (W). The CALB1 staining in **E** is used to evaluate the PC soma size and circularity (right). PCL, PC layer. Scale bar, 20 μm . **F**, Longitudinal analysis of the cerebellar vermis length shows shortening at late disease stage (34 weeks) in SCA7^{1400/50} relative to WT mice, while the width has reduced size from 12 weeks onward in SCA7^{1400/50} mice ($n = 8$ –12 tissue sections/age-genotype). **G**, Longitudinal analysis of the thickness of molecular layer (ML) of lobules (Lob) VI and X of cerebellar vermis sections shows no steady difference between SCA7^{1400/50} and WT mice (9–12 sections/mouse). **F, G**, Data points illustrated with interleaved box and whiskers represent minimal and maximal values. Ordinary two-way ANOVA with *post hoc* Bonferroni test. **H, I**, Frequency of PC soma area (**H**) and frequency of PC circularity index (**I**) as measured in lobules VI, IX, and X of the vermis of 34-week-old WT ($n = 3$) and SCA7^{1400/50} mice ($n = 3$) (33–51 PC/lobule/mouse were measured). SCA7^{1400/50} mice show different distribution of PC area in lobule VI and different distribution of PC circularity in lobules IX and X, relative to WT mice. Statistical analysis was performed using χ^2 .

Accumulation of mutant ATXN7 in retina and cerebellum

Previous studies showed that mATXN7 tends to misfold and form intracellular protein aggregates (for review, see Niewiadomska-Cimicka and Trotter, 2019). To determine the dynamic of mATXN7 aggregation in SCA7 mice, we performed immunofluorescence and Western blot analysis of retina and cerebellar sections. In WT retina and cerebellum, ATXN7 immunolabeling is barely detectable (Fig. 10A,B). In contrast, the immunolabeling progressively increased with age in SCA7 mouse tissues, indicating that mATXN7 accumulates over time.

This resulted in different labeling profiles depending on the neuronal population and disease stage. mATXN7 aggregates were readily detected in many photoreceptor nuclei at 12 weeks and became widespread in all retinal neuron nuclei at later stages (Fig. 10A). In SCA7 cerebellum, PCs showed the earliest mATXN7 accumulation that progressively increased between 12 and 19 weeks, leading to the formation of large nuclear aggregates at later stages (Fig. 10B). mATXN7 nuclear aggregates were also observed in the MCL and GC layer. All cerebellar lobules showed the accumulation of mATXN7 in PC nuclei (Fig. 10C).

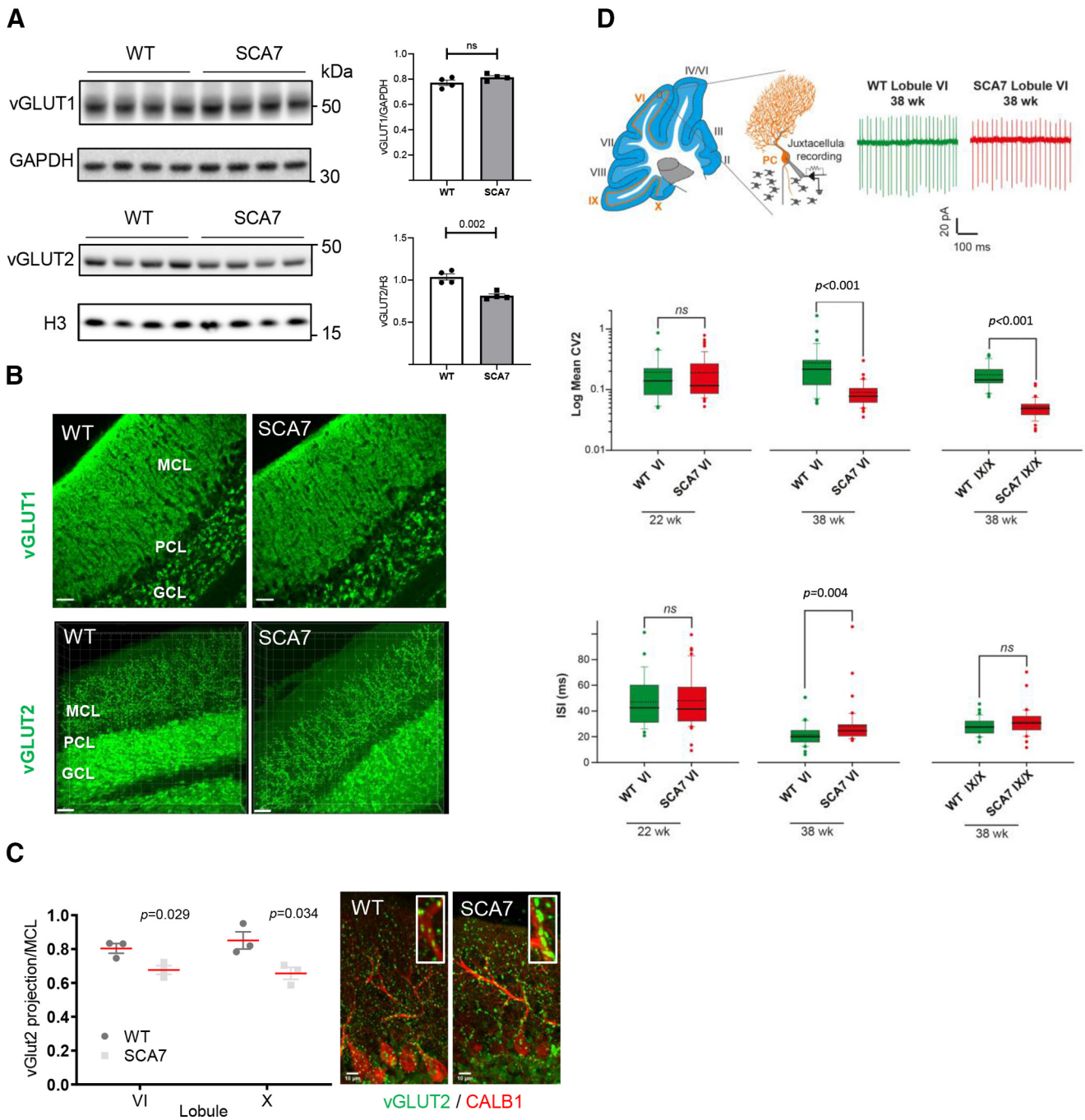


Figure 9. Alteration of synaptic contact and intrinsic activity of SCA7 PCs. **A**, Western blot analyses of SCA7^{140Q/5Q} and WT cerebella show decreased level of vGLUT2 in SCA7 mice at 34 weeks, whereas the vGLUT1 is not affected. GAPDH and histone H3 protein levels are used as loading controls. Molecular weight in kDa. **B**, vGLUT1 and vGLUT2 immunostaining of lobule VI of the vermis in WT and SCA7 mice. GCL, GC layer; PCL, PC layer. Scale bar, 30 μ m. **C**, Left, Measurement of vGLUT2-labeled area in the MCL of lobule VI and X of the vermis shows reduced width size in SCA7^{140Q/5Q} ($n = 3$) compared with WT mice ($n = 3$). Data are mean \pm SEM. Two-tailed Student's t test. Right, Coimmunostaining of vGLUT2 and CALB1 showing aggregation of vGLUT2 contact points located along large dendritic arborization of PC in SCA7 cerebellum. Scale bar, 10 μ m. **D**, Top, Schematic of a sagittal cerebellar section where cerebellar lobules are numbered from I to X and orange lines indicate the locations of PC intrinsic activity recording sites (left). Middle, Schematic of juxtacellular recording of PC pacemaking activity. Representative traces of spontaneous firing in PCs located in lobule VI from WT or SCA7^{140Q/5Q} mice (right). Middle, Box plots represent the values of CV₂ of adjacent ISI in lobule VI and IX/X in WT and SCA7 mice. Dashed and solid lines indicate mean and median values, respectively: 22-week-old WT ($n = 27$) and SCA7 ($n = 65$); 38-week-old WT ($n = 33$ in lobule VI and 34 in IX/X) and SCA7 ($n = 41$ in lobule VI and 36 in IX/X). Bottom, Same representation as in middle panel for ISI values. Statistical analysis was performed using Mann–Whitney rank-sum test. ns, not significant.

Western blot analysis showed the expression of normal ATXN7 as a 110 kDa band in control retina and cerebellar samples (Fig. 10D). In SCA7 samples, the mutant form of ATXN7 migrated at \sim 140 kDa. From 5 to 8 weeks of age, mATXN7 was also detected as high molecular weight smear in these tissues, indicating that mATXN7 accumulates as oligomeric forms,

much before the formation of visible nuclear aggregates as detected by immunolabeling of tissues.

Cerebellar gene expression changes in SCA7 mice

To gain molecular insight into the cerebellar dysfunctions of SCA7^{140Q/5Q} mice, gene expression profiles of cerebellar

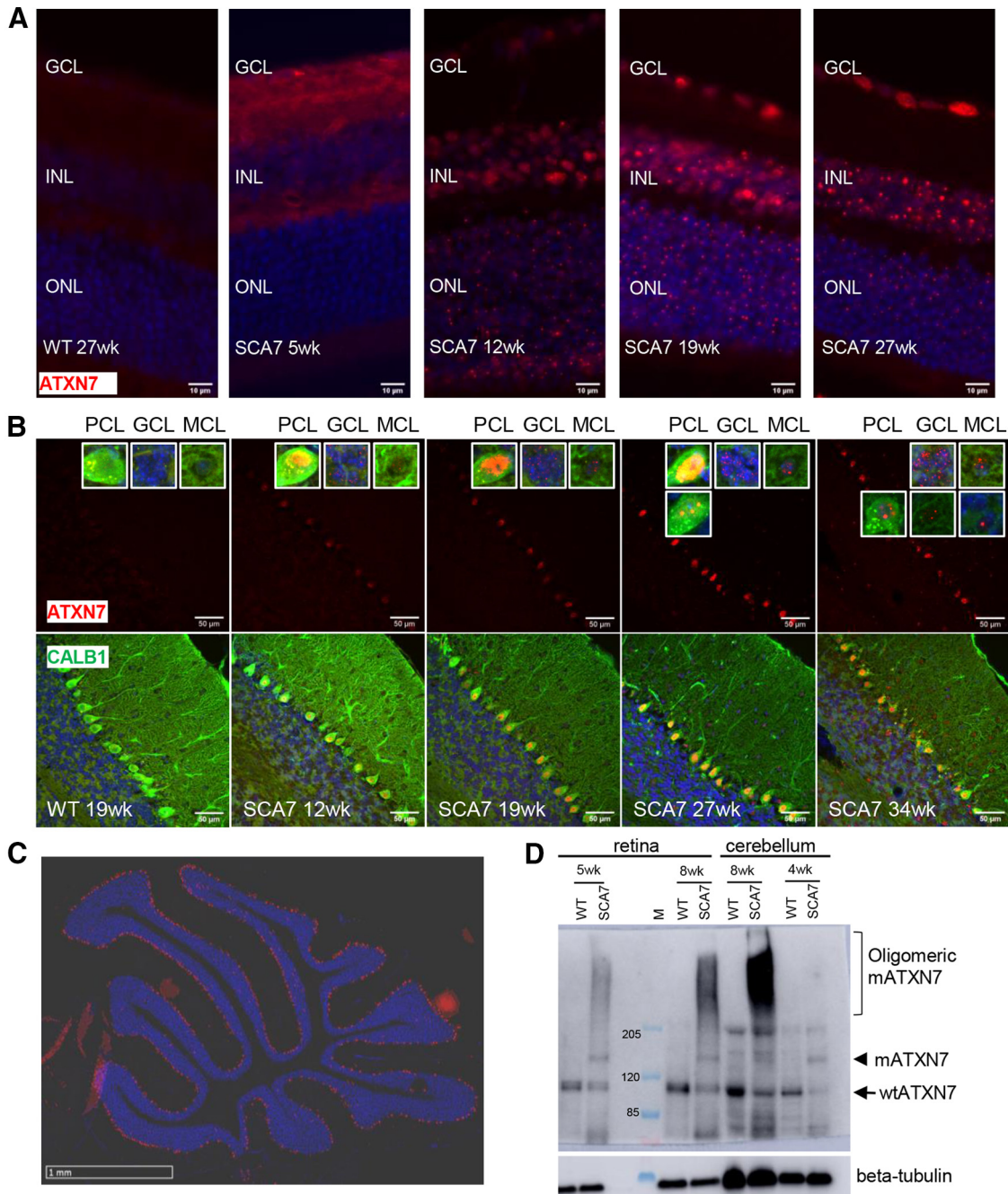


Figure 10. Accumulation of mutant ATXN7 in SCA7 mouse retina and cerebellum. **A**, Immunostaining of ATXN7 (red) on retinal sections of WT and SCA7^{1400/50} mice at different ages, showing the progressive accumulation of mutant ATXN7 (mATXN7) aggregates in retinal cells. DAPI-stained nuclei (blue). GCL, Ganglion cell layer. Scale bar, 10 μ m. **B**, Coimmunostaining of ATXN7 (red) and CALB1 (green) of cerebellar sections, showing the progressive accumulation of mATXN7 in different cerebellar cells. DAPI-stained nuclei (blue). PCL, PC layer; GCL, GC layer. Scale bar, 50 μ m. **C**, Immunostaining of ATXN7 (red) showing the global distribution of mATXN7 aggregates in the PCL of SCA7 cerebellum. DAPI-stained nuclei (blue). Scale bar, 1 mm. **D**, Western blot analysis of whole protein extract of retina and cerebellum of WT and SCA7^{1400/50} mice at different ages, probed with ATXN7 and β -tubulin antibodies. Arrows and arrowhead indicate the WT and mutant forms of ATXN7, respectively. Bracket indicates the oligomeric high molecular weight mATXN7 material in SCA7 samples. Molecular weight (M) is given in kDa.

samples of symptomatic SCA7 mice and their WT littermates were analyzed by RNA-seq. Analysis of differentially expressed genes indicated that 406 genes are downregulated in SCA7 cerebella and 270 genes are upregulated ($p < 0.05$) (Fig. 11A). IPA (Kramer et al., 2014) of the 676 differentially expressed genes revealed that the most significantly affected functions ($p \leq 0.0002$) concern major neuronal signaling pathways involving glutamate, G-protein coupled receptors, calcium, CREB, and cAMP, and LTD (Fig. 11B; Extended Data Fig. 11-1), most of which have previously been implicated in the pathogenesis of other ataxias (Hoxha et al., 2018).

IPA also pointed out the impairment of interferon signaling pathway (Fig. 11B). Interestingly, among the 10 most predicted upstream regulators ($p \leq 7 \times 10^{-9}$) of the differentially expressed genes, 8 are implicated in the modulation of interferon signaling pathways (Extended Data Fig. 11-1). Moreover, functional annotations of the 270 upregulated genes using STRING (Szklarczyk et al., 2015) further highlighted a strong enrichment (false discovery rate [FDR] $< 2 \times 10^{-6}$) of Type 1 interferon pathway (Fig. 11C). The interferon regulator factor 7 gene (*Irf7*), which is the second most significantly upregulated protein-coding gene (2.7-fold; $p = 2.28 \times 10^{-10}$) in SCA7 mouse cerebella,

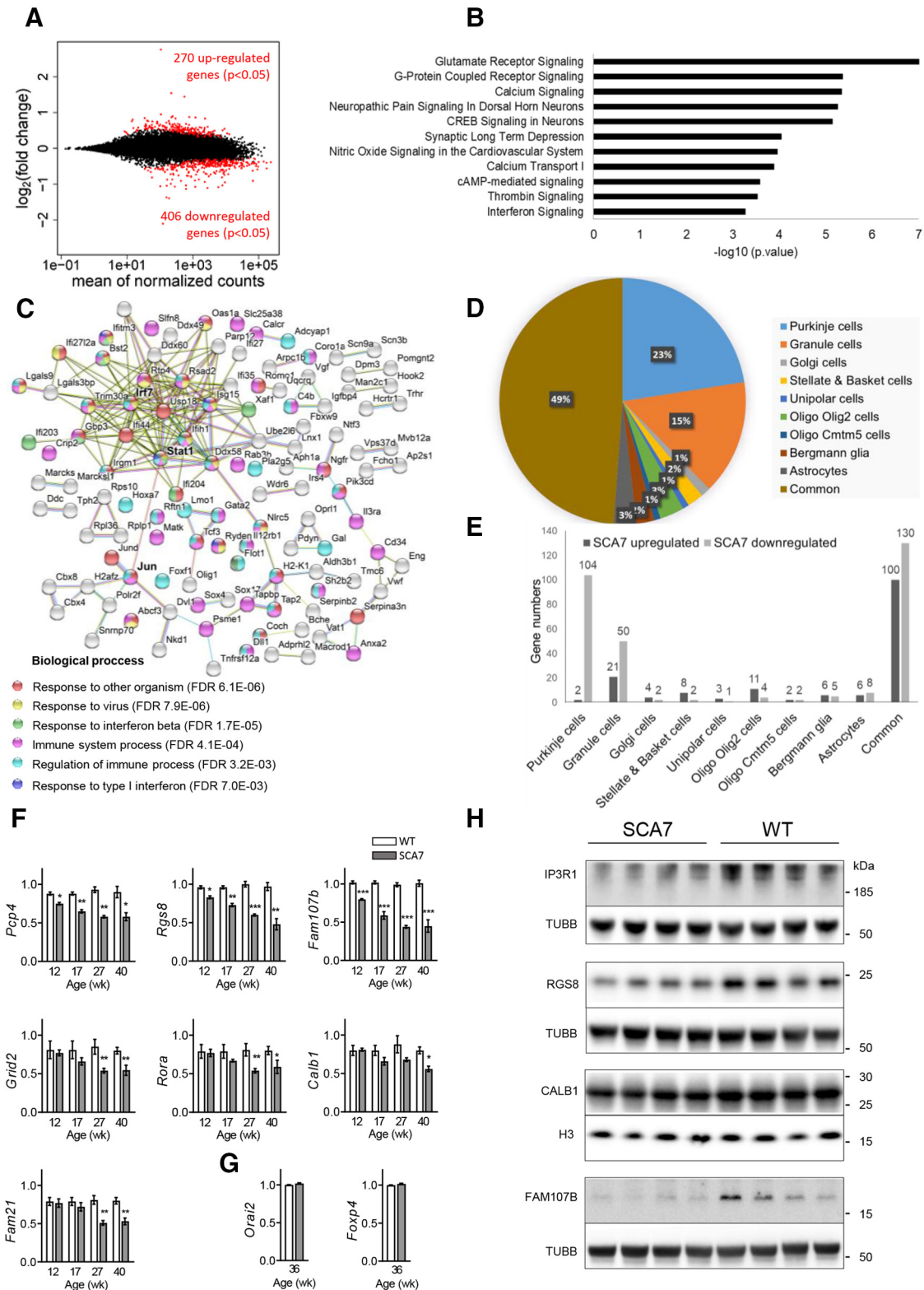


Figure 11. Gene deregulation in SCA7 cerebellum. **A**, MA plot of transcriptomic dataset between SCA7^{1400/5Q} and WT mice cerebellum at 40 weeks of age. Red points represent 676 genes deregulated in SCA7^{1400/5Q} ($p < 0.05$). **B**, Functional annotations of the deregulated genes performed using IPA. The most significantly affected pathways ($p \leq 0.0002$) in SCA7^{1400/5Q} are indicated (for additional information, see Extended Data Fig. 11-1). **C**, The STRING version 10.5 software was used to generate the protein network based on known functional partnerships and interactions: light blue represents curated databases; pink represents experimentally determined; light green represents text mining; black represents coexpression. The assigned GO Biological Processes of upregulated genes are indicated and show significant enrichment in immune response and interferon signaling pathways, with IRF7, STAT1, and JUN at the center a large network of 189 edges. **D**, Cerebellar cell-type distribution of the genes deregulated in SCA7^{1400/5Q} mice based on curated dataset of Doyle et al. (2008) (for additional information, see Extended Data Fig. 11-2). **E**, Cell-type classification of upregulated and downregulated genes indicates PCs as the predominant cell type affected by gene deregulation in SCA7 cerebellum. Common means genes deregulated in more than one cell type. **F, G**, qRT-PCR analyses of SCA7^{1400/5Q} and WT cerebella point out the downregulation of Purkinje specific genes *Pcp4*, *Rgs8*, and *Fam107b* at pre-symptomatic stage and *Grid2*, *Rora*, *Calb1*, and *Fam21* at symptomatic stage in SCA7 mice ($n = 3$ WT and 3 SCA7 mice per age). **F**, qRT-PCR analyses confirm that two Purkinje-specific genes

composed with high confidence (0.700) a protein-protein association network of 19 direct edges that includes signal transducer and activator of transcription 1 (*Stat1*), which further interconnects with the protooncogene *Jun*. Together, *Irf7*, *Stat1*, and *Jun* constituted the center a large network of 189 edges involving multiple upregulated genes coding for proteins involved in immune response (Fig. 11C), further emphasizing the important activation of interferon signaling pathway in SCA7 cerebella. Chort et al. (2013) previously reported the increased level of interferon- β and its receptor in the cerebellum of the SCA7^{266Q/5Q} model. Our transcriptome data provide additional evidence of the activation of a regulatory network involving interferon signaling.

Downregulation of a large subset of PC identity genes

To gain insight into the cell type-specific distribution of differentially expressed genes in SCA7 cerebella, we took advantage of the publicly available transcriptome datasets of each major cerebellar cell type established using BacTRAP transgenic mouse lines (Doyle et al., 2008). Among a total of 9671 genes present in these datasets, 5058 genes were exclusively expressed in one cell type, including 801 genes in PC, 2357 in GCs, 156 in Golgi cells, 340 in stellate and basket cells, 144 in unipolar brush cells, 563 in oligodendrocytes expressing *Olig2*, 133 in oligodendrocytes expressing *Cntm5*, 279 in Bergmann glia, and 285 in astrocytes (Extended Data Fig. 11-2). We compared the list of genes deregulated in SCA7 cerebellum and identified that 240 are expressed in a single cerebellar cell type and 230 are present in more than one cell type (Extended Data Fig. 11-2). The analysis revealed that all the cerebellar cell types presented differentially expressed genes (Fig. 11D), indicating that SCA7 pathology is widespread across cerebellar cell types. However, despite the rarity of PC in the cerebellum estimated to 0.1% of cerebellar cells, 23% (106 of 470) of SCA7 deregulated genes were assigned to PC. In contrast, 15% of SCA7 deregulated genes were assigned to GCs, while this cell type represents 90% of cerebellar cells. Importantly, while GC genes were both upregulated and downregulated, almost all PC genes (104 of 106 genes) were downregulated (Fig. 11E), indicating that repression of PC genes is a major component of SCA7 cerebellar pathology. Another publicly available dataset from Kratz et al. (2014) allowed us to identify 5 additional PC genes that were downregulated in SCA7 mouse cerebella (Extended Data Fig. 11-2), resulting in a total of 109 downregulated PC genes.

To ascertain the specificity of these 109 genes in PC, their pattern of expression was analyzed using ISH datasets reported in the Brain Transcriptome Database (BrainTx; CDT) (Sato et al., 2008) and in the Allen Brain Atlas (Lein et al., 2007). We established three categories of genes according to the level of enriched expression in PC, as specifically expressed in PC compared with other cerebellar cells, enriched in PC or nonenriched in PC (e.g., equally present in other cell types). The analysis showed that 83 genes had specific enrichment in PC, and are thus considered as PC identity genes that showed reduced expression in SCA7 mice. The remaining genes were expressed in wider range of cerebellar

cell types or were not present in ISH datasets and were then excluded from further analysis (Extended Data Fig. 11-2).

qRT-PCR was used to study the time course of repression of a subset of PC identity genes in SCA7^{140Q/5Q} cerebella (Fig. 11F). The *Grid2*, *Calb1*, *Fam21*, and *Rora* genes showed decreased expression in SCA7 mice from 27 weeks, coinciding with the onset of motor alterations. Interestingly, the 3 PC genes *Pcp4*, *Fam107b*, and *Rgs8* showed downregulation already at 12 weeks, a presymptomatic stage of the disease, suggesting a strong implication in PC pathology of SCA7 mice. The PC genes *Orai2* and *Foxp4*, which were not deregulated in RNA-seq data, were also not affected by qRT-PCR in SCA7 mice compared with WT, indicating that PC gene deregulation is not a consequence of cell loss (Fig. 11G). Consistently, Western blot analysis showed that FAM107B and RGS8 as well as IP3R1 proteins were strongly decreased in SCA7^{140Q/5Q} cerebella compared with WT samples at 26 weeks, while CALB1 level was not affected (Fig. 11H).

A signature of downregulated PC identity genes in SCA1, SCA2, and SCA7

To further explore whether PC genes downregulated in SCA7 have pathologic relevance in cerebellar ataxia, we looked at publicly available transcriptomic datasets of SCA1 and SCA2 mouse models in which the mutant genes were specifically expressed in PC and caused spontaneous firing dysfunction (Dansithong et al., 2015; Ingram et al., 2016). In these two models, expression level of a subset genes was also shown to be altered compared with their respective WT littermates (Dansithong et al., 2015; Ingram et al., 2016). Before proceeding with the comparative analysis, we have reanalyzed the RNA-seq raw data of SCA1 mouse cerebella at 5, 12, and 28 weeks and SCA2 cerebella at 6 weeks with the same software that was used for SCA7. We then compared the differentially expressed genes in the cerebellum of the three SCA models. The analysis revealed that 136 genes common to the three datasets were downregulated and only 5 were upregulated (Fig. 12A,B). Interestingly, of the 136 downregulated genes, 67 were PC identity genes, including 10 genes previously associated with genetic ataxias (Table 2; Extended data Table 2-1). These 67 genes were downregulated already at 5 weeks in SCA1 and at 6 weeks in SCA2 mice, which are disease onset stages of these models (Hansen et al., 2013; Ingram et al., 2016), and constitute a signature of early pathologic processes of PC. The comparison performed with the SCA1 dataset at later disease stages revealed 13 additional downregulated PC identity genes in common with SCA2 and SCA7 mice (Table 2), suggesting that these 13 genes were associated with the progression of PC pathology.

The biological significance of the early downregulation of the 67 PC identity genes was researched using three analyses. First, the KEGG pathway analysis indicated that this set was enriched for genes involved in LTD (FDR 0.0036), cGMP-PKG signaling pathway (FDR 0.0068), and phosphatidylinositol signaling system (FDR 0.0069) (Fig. 12C). Second, the STRING analysis (Szklarczyk et al., 2015) was used to search for functional partnerships and interactions between proteins encoded by the 67 PC genes. It revealed a network of 45 edges ($p = 1.2e^{-13}$) (Fig. 12C) interconnecting a large number of proteins encoded by genes showing mutations in human or mouse model ataxias, such as *Grid2*, *Calb1*, *Car8*, *Trpc3*, *Kcnma1*, *Inpp5a*, and *Inpp4a*. The network also showed central positions to the regulator of G-protein signaling 8 (RGS8), cGMP-dependent kinase PRKG1, and its phosphorylation target phospholipase C β 3 (PLCB3); the latter two are related to LTD and synapse functions of PC

←

nonderegulated in RNA-seq (*Orai2*, *Foxp4*) have the same expression level in SCA7 and WT cerebella at 36 weeks (G). All data are normalized to the *36B4* level and are expressed as mean \pm SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; two-tailed Student's *t* test. H, Western blot analyses of SCA7^{140Q/5Q} and WT cerebella show the strong decreased level of IP3R1, RGS8, and FAM107B in SCA7 mice at 26 weeks, while the CALB1 is not affected. Tubulin (TUBB) and histone H3 protein levels are used as loading controls.

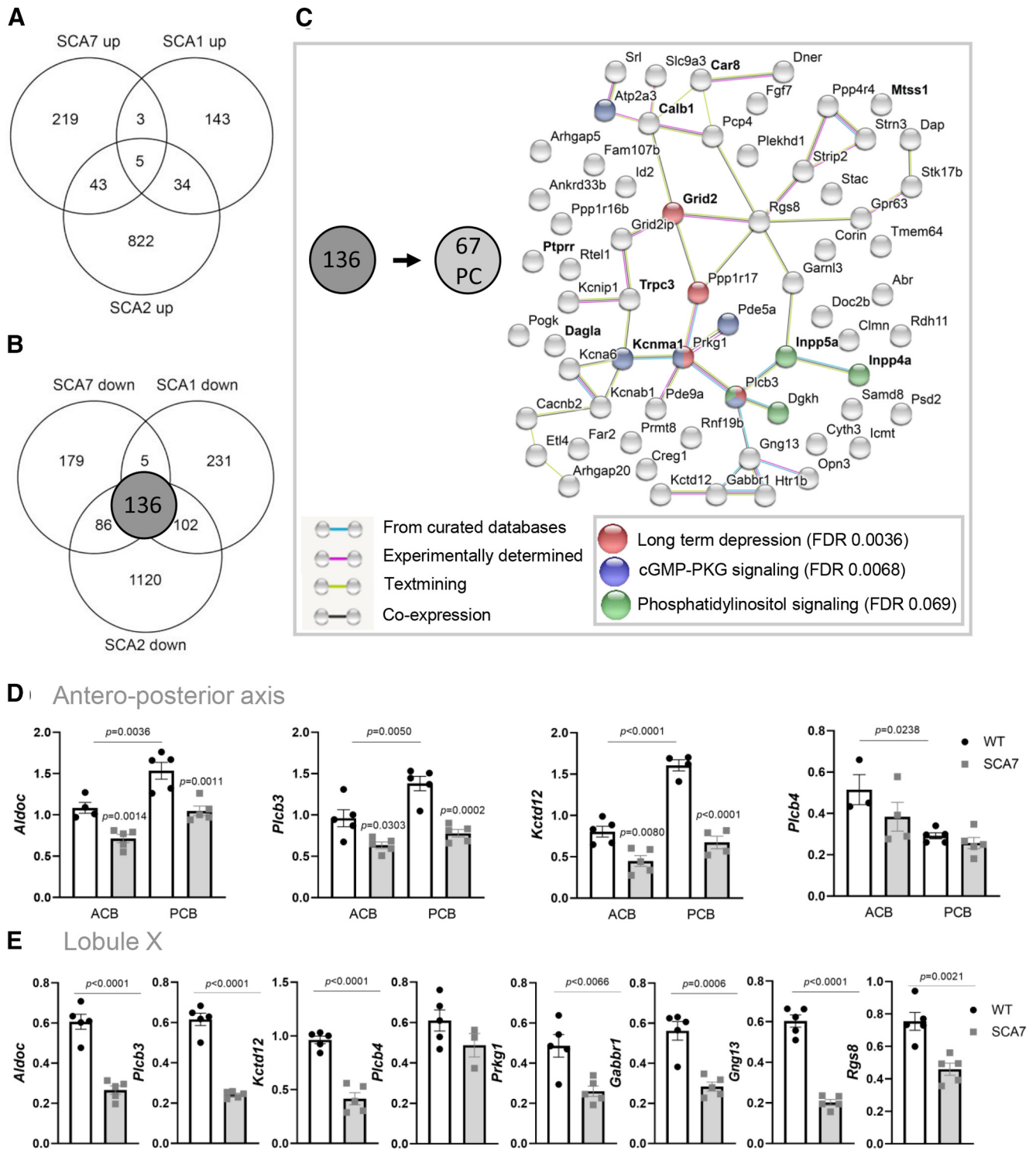


Figure 12. Downregulation of PC identity genes in SCA1, SCA2, and SCA7 and network analysis. **A**, **B**, Venn diagrams show overlap between genes upregulated (**A**) and downregulated (**B**) in SCA1 (5-week-old) (Ingram et al., 2016), SCA2 (6-week-old) (Dansithong et al., 2015), and SCA7^{1400/5Q} cerebellum. **C**, Genetic network showing functional partnerships and interactions between proteins encoded by the 67 PC genes downregulated in SCA1, SCA2, and SCA7 mouse models, as determined using the STRING software. Bold type represents known ataxia genes. Bottom right, Functional annotations of the 67 PC-enriched genes downregulated in SCA1, SCA2, and SCA7 mouse models, using KEGG pathway analysis. **D**, qRT-PCR analyses of ACB (ZII⁻ enriched lobules II-V) and PCB (ZII⁺ enriched lobule VI-IX) vermal cerebella of SCA7^{1400/5Q} and WT mice show strong downregulation of ZII⁺ associated genes (*Aldoc*, *Plcb3*, *Kctd12*) in PCB of SCA7 mice compared with WT, whereas the expression of ZII⁻ associated gene *Plcb4* is not affected in ACB and PCB. Data are normalized to the *36B4* level and are expressed as mean ± SEM. Ordinary two-way ANOVA, followed by *post hoc* Bonferroni test. **E**, qRT-PCR analyses of ZII⁺ enriched lobule X show strong downregulation of ZII⁺ associated genes (*Aldoc*, *Plcb3*, *Kctd12*) and 4 other genes (*Prkg1*, *Gabbr1*, *Gng13*, *Rgs8*) from the downregulated network (**C**), in SCA7 mice compared with WT. The ZII⁻ associated gene *Plcb4* is not affected in SCA7 lobule X. Data are normalized to the *36B4* level and are expressed as mean ± SEM. Two-tailed Student's *t* test.

Table 2. PC specific or enriched genes commonly downregulated in the cerebellum of SCA1, SCA2, and SCA7 mice models

Gene symbol	Gene names	SCA7	SCA1		SCA2	
		log2FC (SCA7/WT) 40 weeks	log2FC (SCA1/WT) 5 weeks	log2FC (SCA1/WT) 12 weeks	log2FC (SCA1/WT) 28 weeks	log2FC (SCA2/WT) 6 weeks
<i>Abr^r</i>	active BCR-related gene	−0.32	−0.27	−0.02	−0.20	−0.46
<i>Ankrd33b</i>	ankyrin repeat domain 33B	−0.52	−0.49	−1.28	−1.58	−0.73
<i>Arhgap20</i>	Rho GTPase activating protein 20	−0.73	−0.47	−0.79	−1.22	−0.70
<i>Arhgap26</i>	Rho GTPase activating protein 26	−0.62	NS	−0.68	−0.84	−0.94
<i>Arhgap31</i>	Rho GTPase activating protein 31	−0.37	NS	−0.64	−1.12	−0.70
<i>Arhgap32</i>	Rho GTPase activating protein 32	−0.39	NS	−0.49	−1.03	−0.69
<i>Arhgap5</i>	Rho GTPase activating protein 5	−0.49	−0.26	−1.22	−1.05	−0.56
<i>Atp2a3</i>	ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, ubiquitous	−0.38	−0.79	−1.50	−1.84	−1.26
<i>B4galnt3</i>	beta-1,4-N-acetyl-galactosaminyl transferase 3	−0.55	NS	−4.15	−0.56	−1.77
<i>Cacnb2^r</i>	calcium channel, voltage-dependent, beta 2 subunit	−0.42	−0.51	−0.92	−1.05	−0.49
<i>Calb1^{a,r}</i>	calbindin 1	−0.47	−0.61	−1.17	−1.42	−0.87
<i>Car8^{a,r}</i>	carbonic anhydrase 8	−0.51	−0.73	−1.59	−1.51	−1.13
<i>Casq2</i>	calsequestrin 2	−0.42	NS	−0.73	−1.03	−0.58
<i>Clmn</i>	calmin	−0.65	−0.70	−1.32	−1.84	−1.34
<i>Corin</i>	corin	−0.53	−0.86	−2.11	−2.83	−1.22
<i>Creg1</i>	cellular repressor of E1A-stimulated genes 1	−0.49	−0.78	−0.85	−0.97	−0.31
<i>Cyth3</i>	cytohesin 3	−0.37	−0.42	−0.79	−0.65	−0.56
<i>Dagla^a</i>	diacylglycerol lipase, alpha	−0.45	−0.90	−1.12	−1.44	−1.58
<i>Dap^r</i>	death-associated protein	−0.35	−1.09	−0.94	−1.31	−0.64
<i>Dgkh^r</i>	diacylglycerol kinase, eta	−0.77	−1.06	−1.80	−2.37	−1.14
<i>Dlg2</i>	discs large MAGUK scaffold protein 2	−0.43	NS	−0.93	−0.98	−0.43
<i>Dner</i>	δ/notch-like EGF repeat containing	−0.36	−0.56	−1.13	−1.08	−1.20
<i>Doc2b</i>	double C2, beta	−0.64	−1.01	−1.43	−1.87	−1.53
<i>Etl4</i>	enhancer trap locus 4	−0.50	−0.35	−0.51	−0.72	−0.82
<i>Fam107b^r</i>	family with sequence similarity 107, member B	−1.03	−1.08	−1.92	−1.65	−1.87
<i>Fam117a</i>	family with sequence similarity 117, member A	−0.68	NS	−0.82	−0.60	−1.18
<i>Fam78b^r</i>	family with sequence similarity 78, member B	−0.41	NS	−0.45	−0.85	−0.60
<i>Far2</i>	fatty acyl CoA reductase 2	−0.54	−0.58	−1.36	−1.22	−0.70
<i>Fgf7</i>	fibroblast growth factor 7	−0.51	−1.55	−3.26	−2.59	−1.41
<i>Gabbr1</i>	GABA B receptor, 1	−0.37	−0.57	−0.69	−0.76	−0.53
<i>Garnl3</i>	GTPase activating RANGAP domain-like 3	−0.67	−0.65	−1.12	−1.41	−0.96
<i>Gm5083</i>	predicted gene 5083	−0.47	−0.68	−0.90	−0.98	−1.08
<i>Gng13</i>	guanine nucleotide binding protein (G protein), γ 13	−0.74	−1.30	−1.92	−1.97	−1.54
<i>Gpr63</i>	GPCR 63	−0.90	−1.07	−1.93	−2.58	−2.17
<i>Grid2^a</i>	glutamate receptor, ionotropic, δ 2	−0.50	−0.42	−1.18	−1.32	−0.80
<i>Grid2ip</i>	glutamate receptor, ionotropic, δ 2 (Grid2) interacting protein 1	−0.66	−1.09	−1.66	−2.95	−1.68
<i>Htr1b</i>	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1B	−0.45	−0.52	−1.36	−1.21	−1.16
<i>Icmt^r</i>	isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase	−0.54	−0.63	−1.41	−1.56	−0.88
<i>Id2^r</i>	inhibitor of DNA binding 2	−0.32	−0.46	−0.59	−0.52	−0.49
<i>Inpp4a^a</i>	inositol polyphosphate-4-phosphatase, Type I	−0.29	−0.35	−0.72	−0.90	−1.00
<i>Inpp5a^a</i>	inositol polyphosphate-5-phosphatase A	−0.41	−0.56	−0.89	−1.07	−1.00
<i>Itpr1^{a,r}</i>	inositol 1,4,5-trisphosphate receptor 1	−0.56	NS	−1.43	−2.00	−1.00
<i>Kcna6^r</i>	potassium voltage-gated channel, shaker-related, subfamily, member 6	−0.45	−0.49	−0.77	−0.47	−0.70
<i>Kcnab1^r</i>	potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, beta member 1	−0.34	−0.51	−1.30	−1.07	−0.74
<i>Kcnip1</i>	Kv channel-interacting protein 1	−0.34	−0.62	−0.97	−1.10	−0.38
<i>Kcnma1^a</i>	potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, alpha member 1	−0.67	−0.37	−0.97	−1.62	−0.83
<i>Kctd12</i>	potassium channel tetramerization domain containing 12	−0.95	−0.87	−1.96	−1.44	−1.23
<i>Mtss1^{a,r}</i>	metastasis suppressor 1	−0.36	−0.27	−0.59	−0.88	−0.93
<i>Nexn</i>	nexilin	−0.36	NS	−0.67	−0.81	−0.62
<i>Opn3</i>	opsin 3	−1.03	−1.05	−1.74	−0.76	−1.94
<i>Pcp4^r</i>	PC protein 4	−0.57	−0.85	−1.14	−1.30	−0.81
<i>Pde5a</i>	phosphodiesterase 5A, cGMP-specific	−0.70	−0.45	−1.50	−1.83	−0.89
<i>Pde9a</i>	phosphodiesterase 9A	−0.46	−0.37	−0.12	−0.47	−0.47
<i>Plcb3^r</i>	phospholipase C, beta 3	−0.72	−0.91	−0.92	−1.10	−0.98
<i>Plekhd1</i>	pleckstrin homology domain containing family D (with coiled-coil domains) member 1	−0.34	−0.39	−0.74	−0.78	−0.61
<i>Pogk</i>	pogo transposable element with KRAB domain	−0.45	−0.32	−0.75	−0.67	−0.54
<i>Ppp1r16b</i>	protein phosphatase 1, regulatory subunit 16B	−0.72	−0.74	−1.31	−1.44	−1.25
<i>Ppp1r17</i>	protein phosphatase 1, regulatory subunit 17	−0.34	−0.45	−1.08	−0.93	−0.65
<i>Ppp4r4</i>	protein phosphatase 4, regulatory subunit 4	−0.49	−0.46	−0.98	−1.26	−0.70
<i>Prkg1</i>	protein kinase, cGMP-dependent, Type I	−0.80	−0.48	−1.05	−1.20	−0.90
<i>Prmt8</i>	protein arginine N-methyltransferase 8	−0.52	−0.35	−0.49	−0.50	−0.70

(Table continues.)

Table 2. Continued

Gene symbol	Gene names	SCA7	SCA1				SCA2
		log2FC (SCA7/WT) 40 weeks	log2FC (SCA1/WT) 5 weeks	log2FC (SCA1/WT) 12 weeks	log2FC (SCA1/WT) 28 weeks	log2FC (SCA2/WT) 6 weeks	
<i>Psd2</i>	pleckstrin and Sec7 domain containing 2	−0.31	−0.38	−0.57	−0.38	−0.49	
<i>Ptprr^{a,r}</i>	protein tyrosine phosphatase, receptor type, R	−0.36	−0.36	−1.14	−0.83	−0.50	
<i>Rdh11</i>	retinol dehydrogenase 11	−0.46	−0.40	−0.90	−0.60	−0.45	
<i>Rgs7bp</i>	regulator of G-protein signaling 7 binding protein	−0.32	NS	−0.87	−0.64	−0.33	
<i>Rgs8</i>	regulator of G-protein signaling 8	−0.91	−0.97	−2.06	−2.13	−1.50	
<i>Rnf19b</i>	ring finger protein 19B	−0.45	−0.49	−0.70	−0.68	−0.90	
<i>Rora^{a,r}</i>	RAR-related orphan receptor alpha	−0.39	NS	−0.87	−1.25	−0.63	
<i>Rtel1</i>	regulator of telomere elongation helicase 1	−0.32	−0.55	−0.79	−0.71	−0.41	
<i>Samd8</i>	sterile alpha motif domain containing 8	−0.33	−0.43	−0.90	−0.92	−0.60	
<i>Slc9a3^r</i>	solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), member 3	−0.60	−0.82	−1.66	−2.00	−1.22	
<i>Srl</i>	sarcalumenin	−0.77	−0.91	−1.24	−1.04	−0.78	
<i>Stac</i>	src homology three (SH3) and cysteine-rich domain	−0.66	−0.92	−1.26	−1.83	−1.22	
<i>Stk17b</i>	serine/threonine kinase 17b (apoptosis-inducing)	−0.71	−0.84	−1.86	−1.74	−1.02	
<i>Strip2</i>	striatin interacting protein 2	−0.49	−0.45	−1.37	−1.24	−0.73	
<i>Strn3</i>	striatin, calmodulin binding protein 3	−0.34	−0.42	−0.75	−0.87	−0.37	
<i>Tmem64</i>	transmembrane protein 64	−0.33	−0.27	−0.85	−0.58	−0.37	
<i>Trpc3^a</i>	transient receptor potential cation channel subfamily C member 3	−0.50	−0.65	−1.57	−1.58	−1.26	
<i>2410124H12Rik</i>	RIKEN cDNA 2410124H12 gene	−0.88	−1.75	−3.11	−3.67	−2.08	
<i>3632451006Rik</i>	—	−0.40	NS	−0.84	−0.53	−0.25	

^a, genes associated with genetic ataxias; ^r, RORa genetic targets. See also Extended Data Table 2-1.
NS, Not Significant

(Feil et al., 2003; Hoxha et al., 2018). Finally, our list of 67 PC identity genes was compared with a published list of genes composing the SCA1 Magenta gene module (Ingram et al., 2016). This module was established using the Weighted Gene Coexpression Network Analysis of SCA1 cerebellar transcripts and reported to be enriched in PC genes involved in LTD and glutamate signaling and to be of high relevance for SCA1 pathogenesis (Ingram et al., 2016). We found that 48 of 67 PC-enriched genes were present in the Magenta module. Furthermore, two major hub genes described in the module, namely, *Fam107b* and *Rgs8*, were within the top strongest downregulated genes in SCA1, SCA2, and SCA7 models, and were already downregulated at 12 weeks in SCA7 mice, hence before onset of motor symptoms (Fig. 11F). Together, these analyses suggest that the dysfunction of synaptic LTD of PC constitutes a common pathway in the early pathogenesis of SCA1, SCA2, and SCA7.

The heterogeneity of PCs in the cerebellum is characterized at the topographical and molecular level by striped arrangement of Zebrin II (ALDOC) positive (ZII⁺) or negative (ZII⁻) PCs (Sillitoe and Hawkes, 2002; Fujita et al., 2014; Cerminara et al., 2015). ZII⁺ PCs express *Aldoc* and *Plcb3* and are enriched in the posterior cerebellum (lobules VI-X), whereas ZII⁻ PCs express *Plcb4* and are enriched in the anterior part (lobules I-V). The presence of the *Plcb3* at a central position in the downregulated network (Fig. 12C) suggested that ZII⁺ PCs are particularly vulnerable in SCA1, SCA2, and SCA7. We tested this possibility in SCA7 mice by analyzing the related markers in the anterior (ACB) and posterior vermal cerebellum (PCB) by qRT-PCR. As expected, *Plcb4* showed a significantly higher expression in the ACB of WT mice, and *Aldoc* and *Plcb3* were significantly more expressed in the PCB (Fig. 12D). Interestingly, *Plcb4* expression was not affected in SCA7 cerebellum, whereas *Aldoc* and *Plcb3* were downregulated and showed a stronger decreased expression in the PCB than in the ACB. Similarly, the gene coding for KCTD12, another marker expressed in ZII⁺ PCs (Metz et al., 2011) and present in the downregulated network (Fig. 12C),

showed a strong decreased expression in the PCB. As shown in Figure 9, SCA7 PCs showed firing impairment in the vermal lobules IX/X, two lobules strongly enriched in ZII⁺ PCs. Consistently, all markers of ZII⁺ PCs (*Aldoc*, *Plcb3*, and *Kctd12*) were strongly downregulated in SCA7 lobule X compared with WT, whereas the marker of ZII⁻ PCs (*Plcb4*) was not affected (Fig. 12E). Four other central genes of the downregulated network (*Prkg1*, *Gabbr1*, *Gng13*, and *Rgs8*) also showed decreased expression in SCA7 lobule X. Together, the data indicate a particular vulnerability of ZII⁺ PCs in SCA7 mouse cerebellum.

Finally, to identify mechanisms that could account for the downregulation of the 67 PC identity genes, we first looked at RORa (RAR-related orphan receptor α), a key transcription factor involved in PC differentiation and survival (Gold et al., 2003) and showing downregulation in SCA1, SCA2, and SCA7 mice (Table 2). Among the 67 PC genes, 19 genes were known RORa-target genes (Gold et al., 2003; Sarachana and Hu, 2013) (Table 2), suggesting that RORa dysfunction accounts for PC gene deregulation. We then performed *in silico* analysis of 2 kb promoter sequence of the 67 PC genes to search for *de novo* motifs and transcription factors binding sites using MEME, TOMTOM, AME, or FIMO (Bailey et al., 2009). The analysis did not reveal major enrichment of other transcription factor binding motifs in the promoter of the 67 PC identity genes affected, compared with control sequences (e.g., shuffled promoter sequences or promoter sequences of 67 PC-enriched nonderegulated genes) (data not shown).

Deregulation of gene expression may depend on alteration of diverse processes, including chromatin structure, nucleosomal occupancy, and histone modifications, which play important roles in transcriptional regulation. Given the presence of ATXN7 in the histone-modifying SAGA complex, we determined whether the bulk level of histone marks regulated by SAGA were altered in SCA7 cerebellum. The level of H2Bub was significantly increased ($p=0.0072$) in SCA7^{140Q/5Q} cerebellum compared with WT, whereas the level of H3K9ac showed no significant difference (Fig.

13A). However, a significant decrease ($p=0.0003$) of H3K9ac was observed in the more severely affected SCA7^{140Q/140Q} homozygous mice (Fig. 13B). Together, this suggests that mutant ATXN7 differentially alters the histone-modifying activities of SAGA complex along the progression of cerebellar pathology and could impact on transcription of cerebellar genes.

Discussion

We characterized the behavioral, molecular, and cellular phenotypes of a new SCA7 knock-in mice. By analyzing cell type-specific gene deregulation as well as morphologic and functional alterations of the cerebellum, PCs came out as the most affected cerebellar cell type by decreased expression of identity genes, critical for their spontaneous firing and synaptic functions. These observations suggest disease mechanisms primarily altering the maintenance of PC differentiation, and are consistent with similar pathologic features of SCA7 mouse photoreceptors in this and earlier studies. The same PC identity genes were also affected in presymptomatic SCA1 and SCA2 mice, indicating converging pathomechanisms of PC vulnerability in these SCAs.

Retinal, PNS, and CNS features of SCA7 mice

The SCA7^{140Q/5Q} line combines cardinal features observed in adult SCA7 patients, including retinal, cerebral, cerebellar, and peripheral nerve pathologies (Fig. 14). Many of these phenotypes were not reported in previous models, such as alterations of RPE, Bruch's membrane, peripheral nerve, and different cerebral and brainstem regions. SCA7^{140Q/5Q} photoreceptor dysfunction correlates with progressive reduced expression of photoreceptor identity genes, such as opsins and the disappearance of outer segments. In zebrafish, knockdown of *atxn7* impedes the formation of outer segments during photoreceptor differentiation (Yanicostas et al., 2012; Carrillo-Rosas et al., 2018). Together, this suggests that mATXN7 toxicity alters a normal function of ATXN7 in the maintenance of outer segments, a cell type-specific structure characteristic of photoreceptor differentiation (Swaroop et al., 2010). Alterations of RPE and Bruch's membrane warrant further investigation as they are essential for photoreceptor visual function. Interestingly, homogeneous deposits observed between RPE and basement membrane resemble sub-RPE deposits reported in Malattia Leventinese mouse model (Marmorstein et al., 2007), a dominantly inherited macular degenerative disease.

Peripheral pathologies account for SCA7^{140Q/5Q} neurologic phenotype. The reduced motor peripheral activities observed at 32 weeks are because of lesions of myelin and myelinated fibers of sciatic nerve. Nonmyelinated fibers are also altered and might affect a sensory component. These findings are consistent with abnormal motor and sensory nerve conductions observed in SCA7 patients (Salas-Vargas et al., 2015).

SCA7^{140Q/5Q} mice present decreased volume of selected brain regions at 24 weeks, including corpus callosum, hippocampus,

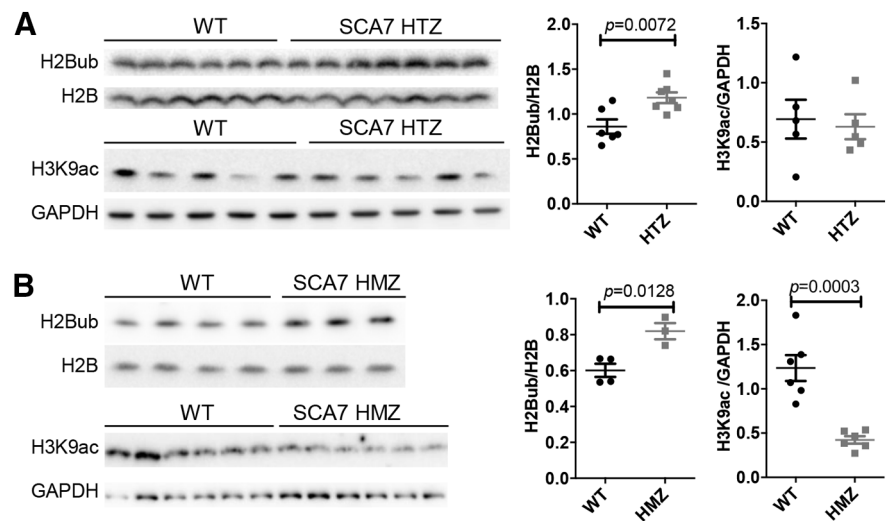


Figure 13. Alteration of SAGA-dependent histone marks in SCA7 cerebellum. **A**, Western blot analyses showing that the bulk level of monoubiquitinated histone H2B (H2Bub) is significantly increased in the cerebellum of SCA7^{140Q/5Q} heterozygous mice (23 weeks) compared with WT, whereas the bulk level of acetylated lysine 9 of histone H3 (H3K9ac) is not affected. **B**, Western blot analyses showing the increased bulk level of H2Bub and the decreased bulk level of H3K9ac in the cerebellum of SCA7^{140Q/140Q} homozygous mice (12 weeks) compared with WT littermates. Immunodetected signals were quantified in Fiji and normalized using the level of H2B and GAPDH. Data are mean \pm SEM. Two-tailed Student's *t* test.

and cortical regions, which parallels observations of human SCA7 (Rub et al., 2008; Horton et al., 2013; Adanyeguh et al., 2018). Recent studies showed altered functional connectivity between patients' cerebellum and hippocampus or parahippocampal areas that may account for specific memory dysfunctions (Alcauter et al., 2011; Hernandez-Castillo et al., 2013, 2016; Chirino et al., 2018). Interestingly, hippocampal neurons showed very early accumulation of mATXN7 (data not shown) and alteration of short-term synaptic plasticity in SCA7^{266Q/5Q} mice (Yoo et al., 2003). The cerebellar cortex presented no significant atrophy, which can be because of variability of MRI volume measurement in our imaging setup. Morphometric analysis of cerebellar sections showed that the vermis width is slightly, but significantly, smaller before the onset of the motor symptoms. At end-disease stage (52 weeks), SCA7^{140Q/5Q} brain showed additional atrophy of the pons and somatosensory cortex, anterior commissure, internal capsule, and the fimbria of the hippocampus. Overall, brain alterations in the SCA7^{140Q/5Q} mice recapitulate many characteristics of human SCA7.

Consistent with alterations of CNS and PNS, SCA7^{140Q/5Q} mice show progressive motor dysfunctions in a variety of experimental paradigms. At motor dysfunction onset, body composition, day and night food intake (data not shown), and normalized muscle strength were normal. The progressive visual impairment might affect the motor performance. However, to perceive their environment, mice primarily use on their excellent olfactory system, vomeronasal organ, and highly developed whiskers (Ache and Young, 2005; Diamond et al., 2008). The motor tests used in this study do not rely much on vision and are common first line tests for preclinical trials in mice.

PC pathology of SCA7 mice

PCs in SCA7^{140Q/5Q} mice show morphologic alterations of soma and synapses, impairment of spontaneous firing, and early and progressive repression of genes involved in firing and synaptic functions. PC pacemaking activities are essential for normal cerebellar functions and are shaped by a

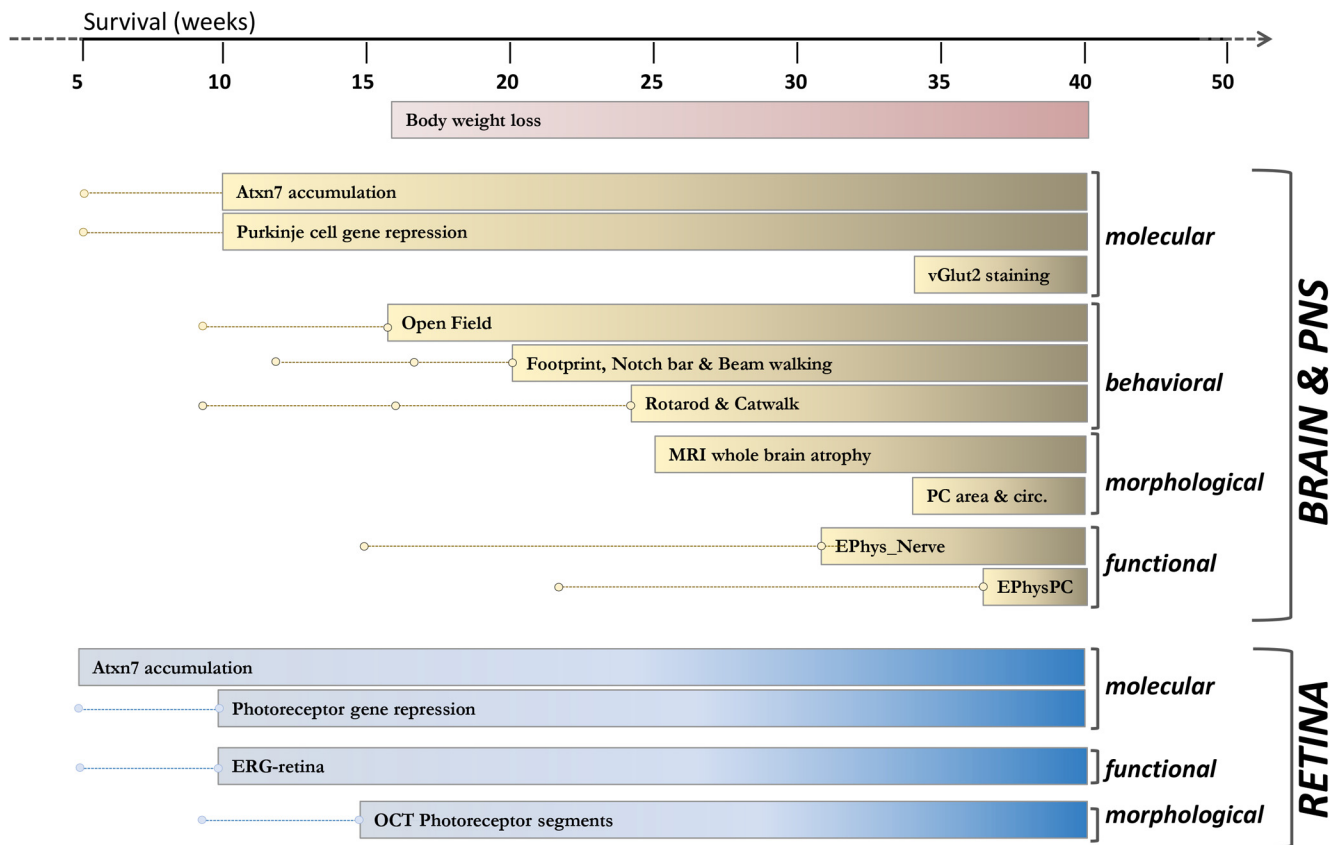


Figure 14. Summary of onset and progression of SCA7 mouse phenotypes. Dots and lines indicate analytic time points before phenotype onset. Bars represent phenotype onset and progression until 40 weeks of age.

complex interplay between Ca^{2+} , Na^+ , and K^+ conductance (Raman and Bean, 1999). In several ataxia models mutated in ion channel genes, PCs present a lower rate of spontaneous firing and/or an irregular firing pattern (Hansen et al., 2013; Hoxha et al., 2018; Bushart and Shakkottai, 2019). PCs in SCA7 mice fire with a higher regularity (low CV_2) in lobules VI and IX/X, and a lower frequency in lobule VI, than in WT. The downregulation of PC genes associated with potassium channels (Table 2) may account for alterations of pace-making activity. The absence of major morphologic alteration of MCL associated with low CV_2 of PCs was reported in ataxic *waddles* mice mutated in *Car8* gene (White et al., 2016). Interestingly, *Car8* is one of the 83 PC genes downregulated in SCA7 mice. The PC CV_2 of *waddles* mice was improved by chlorzoxazone, a pharmacological agent increasing the probability of opening of Ca^{2+} -dependent K^+ channels (White et al., 2016).

SCA7 PCs in lobule VI and IX/X present different excitability impairment that may be linked to different morphologic alteration (smaller soma in VI and altered circularity in IX/X). Based on the topographical organization of the olivo-cortico-cerebellar network (Apps and Hawkes, 2009), lobule-specific differences in PC firing rate between WT and SCA7 may suggest that defects are associated to specific cerebellar tasks.

Synaptic functions integrating afferent signals that arrive from CF, PF, or interneurons are essential to control the output of PCs, and mutations affecting the function of synaptic circuits lead to ataxia (Hoxha et al., 2018). SCA7^{140Q/5Q} dysfunction at CF-PC synapses is revealed by the reduced vGLUT2 immunolabeling in the MCL, whereas downregulation of PC genes encoding

postsynaptic membrane-associated proteins involved in glutamate signaling and LTD, such as *GLURδ2* (coded by *Grid2*), *GRID2ip*, *GABBR1*, and *TRPC3*, indicates functional alteration of PF-PC synapses (Kashiwabuchi et al., 1995; Tabata et al., 2004; Kato et al., 2012; Hawkes, 2014).

There is strong interest in identifying converging pathways of PC pathology across SCAs to improve our understanding of polyQ pathogenesis and to identify common potential targets for therapeutic intervention (Smeets and Verbeek, 2014). We identified 67 PC identity genes downregulated in SCA7 and in early symptomatic SCA1 and SCA2 mice (Hansen et al., 2013; Ingram et al., 2016) (Table 2), suggesting that they are primary targets of the pathogenesis in these SCAs. These PC genes compose a downregulated network involving hub proteins, such as *RGS8*, *PLCB3*, and *PRKG1* and point out toward alteration of LTD, cGMP-PKG signaling, and phosphatidylinositol signaling pathways. This downregulated network further suggests that PCs located in ZII^+ stripes are particularly vulnerable in SCA1, SCA2, and SCA7. The dysfunction of ZII^+ PC subclass in SCA7 mice is further supported by the concomitant decreased expression of ZII^+ associated genes (*Aldoc*, *Plcb3*, *Kctd12*) and PC firing impairment in IX/X of the vermis, which are enriched in ZII^+ PCs. MRI analysis indicated that lobule X present atrophy in most SCA7 patients (Chirino et al., 2018).

Loss of PC identity gene expression

Our study determined cerebellar cell type-specific gene deregulation in SCA7 mouse cerebellum. PCs differ from other cell types by a high number of cell identity genes that are downregulated. Many of these genes are essential for major PC functions

(spontaneous firing and synaptic functions involving glutamate signaling and LTD) and are mutated in other genetic ataxias (Table 2). One emerging concept is that selective transcription factors that specify the acquisition of neuron-type identity during development continue to function later to maintain identity of postmitotic neuronal type (Holmberg and Perlmann, 2012; Deneris and Hobert, 2014). Dysfunction of such key transcription factors is proposed to account for neurodegenerative disorders. RORa is highly expressed in fetal PC and is essential for their maturation (Boukhtouche et al., 2006) and maintaining adult PC characteristics (Chen et al., 2013). RORa expression is decreased in the cerebellum of SCA1, SCA2, and SCA7, together with many RORa-regulated PC identity genes, suggesting that RORa transcriptional program of PC maintenance is disrupted in these SCAs. Previous studies showed that mATXN7 alters the transactivation activity of RORa in cultured cells (Strom et al., 2005), and that postnatal loss of *Rora* expression worsened neurodegeneration of PCs in SCA1 mice (Serra et al., 2006), while increasing RORa level (through partial loss of TIP60) delayed cerebellar pathology (Gehrking et al., 2011).

Studies established that epigenetic regulation at super-enhancers is involved in the expression of cell identity genes (Hnisz et al., 2013; Whyte et al., 2013). In Huntington's disease, neuronal identity genes regulated by super-enhancers are preferentially downregulated in the disease striatum (Achour et al., 2015). Our study revealed that mATXN7 alters the level of both epigenetic marks (H3K9ac and H2Bub) dependent of SAGA function in SCA7 mouse cerebellum. Previous studies showed that mATXN7 aggregates can sequester components of SAGA as well as CBP, which is responsible for H3K27 acetylation on active enhancers (Yvert et al., 2001; Lan et al., 2015). Therefore, further genome-wide investigation of SAGA- and CBP-dependent epigenetic marks might provide insights into mechanisms leading to loss neuron identity gene expression in SCA7.

References

- Abou-Sleymane G, Chalmel F, Helmlinger D, Lardenois A, Thibault C, Weber C, Merienne K, Mandel JL, Poch O, Devys D, Trottier Y (2006) Polyglutamine expansion causes neurodegeneration by altering the neuronal differentiation program. *Hum Mol Genet* 15:691–703.
- Ache BW, Young JM (2005) Olfaction: diverse species, conserved principles. *Neuron* 48:417–430.
- Achour M, Le Gras S, Keime C, Parmentier F, Lejeune FX, Boutillier AL, Neri 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.
- Adanyeguh IM, Perlberg V, Henry PG, Rinaldi D, Petit E, Valabregue R, Brice A, Durr A, Mochel F (2018) Autosomal dominant cerebellar ataxias: imaging biomarkers with high effect sizes. *Neuroimage Clin* 19:858–867.
- Alcauter S, Barrios FA, Diaz R, Fernandez-Ruiz J (2011) Gray and white matter alterations in spinocerebellar ataxia type 7: an in vivo DTI and VBM study. *Neuroimage* 55:1–7.
- Aleman TS, Cideciyan AV, Volpe NJ, Stevanin G, Brice A, Jacobson SG (2002) Spinocerebellar ataxia type 7 (SCA7) shows a cone-rod dystrophy phenotype. *Exp Eye Res* 74:737–745.
- Anders S, Pyl PT, Huber W (2015) HTSeq: a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* 31:166–169.
- Apps R, Hawkes R (2009) Cerebellar cortical organization: a one-map hypothesis. *Nat Rev Neurosci* 10:670–681.
- Arancillo M, White JJ, Lin T, Stay TL, Sillitoe RV (2015) In vivo analysis of Purkinje cell firing properties during postnatal mouse development. *J Neurophysiol* 113:578–591.
- Bailey TL, Boden M, Buske FA, Frith M, Grant CE, Clementi L, Ren J, Li WW, Noble WS (2009) MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Res* 37:W202–W208.
- Boukhtouche F, Doulazmi M, Frederic F, Dusart I, Brugg B, Mariani J (2006) RORalpha, a pivotal nuclear receptor for Purkinje neuron survival and differentiation: from development to ageing. *Cerebellum* 5:97–104.
- Bushart DD, Shakkottai VG (2019) Ion channel dysfunction in cerebellar ataxia. *Neurosci Lett* 688:41–48.
- Carrillo-Rosas S, Weber C, Fievet L, Messaddeq N, Karam A, Trottier Y (2018) Loss of zebrafish Ataxin-7, a SAGA subunit responsible for SCA7 retinopathy, causes ocular coloboma and malformation of photoreceptors. *Hum Mol Genet* 28:912–927.
- Cerminara NL, Lang EJ, Sillitoe RV, Apps R (2015) Redefining the cerebellar cortex as an assembly of non-uniform Purkinje cell microcircuits. *Nat Rev Neurosci* 16:79–93.
- Chen XR, Heck N, Lohof AM, Rochefort C, Morel MP, Wehrle R, Doulazmi M, Marty S, Cannaya V, Avci HX, Mariani J, Rondi-Reig L, Vodjdani G, Sherrard RM, Sotelo C, Dusart I (2013) Mature Purkinje cells require the retinoic acid-related orphan receptor-alpha (RORalpha) to maintain climbing fiber mono-innervation and other adult characteristics. *J Neurosci* 33:9546–9562.
- Chen YC, Gatchel JR, Lewis RW, Mao CA, Grant PA, Zoghbi HY, Dent SY (2012) Gcn5 loss-of-function accelerates cerebellar and retinal degeneration in a SCA7 mouse model. *Hum Mol Genet* 21:394–405.
- Chirino A, Hernandez-Castillo CR, Galvez V, Contreras A, Diaz R, Beltran-Parral L, Fernandez-Ruiz J (2018) Motor and cognitive impairments in spinocerebellar ataxia type 7 and its correlations with cortical volumes. *Eur J Neurosci* 48:3199–3211.
- Chort A, Alves S, Marinello M, Dufresnois B, Dornbierer JG, Tesson C, Latouche M, Baker DP, Barkats M, El Hachimi KH, Ruberg M, Janer A, Stevanin G, Brice A, Sittler A (2013) Interferon beta induces clearance of mutant ataxin 7 and improves locomotion in SCA7 knock-in mice. *Brain* 136:1732–1745.
- Chou AH, Chen CY, Chen SY, Chen WJ, Chen YL, Weng YS, Wang HL (2010) Polyglutamine-expanded ataxin-7 causes cerebellar dysfunction by inducing transcriptional dysregulation. *Neurochem Int* 56:329–339.
- Custer SK, Garden GA, Gill N, Rueb U, Libby RT, Schultz C, Guyenet SJ, Deller T, Westrum LE, Sopher BL, La Spada AR (2006) Bergmann glia expression of polyglutamine-expanded ataxin-7 produces neurodegeneration by impairing glutamate transport. *Nat Neurosci* 9:1302–1311.
- Dansithong W, Paul S, Figueroa KP, Rinehart MD, Wiest S, Pflieger LT, Scoles DR, Pulst SM (2015) Ataxin-2 regulates RGS8 translation in a new BAC-SCA2 transgenic mouse model. *PLoS Genet* 11:e1005182.
- David G, Abbas N, Stevanin G, Durr A, Yvert G, Cancel G, Weber C, Imbert G, Saudou F, Antoniou E, Drabkin H, Gemmill R, Giunti P, Benomar A, Wood N, Ruberg M, Agid Y, Mandel JL, Brice A (1997) Cloning of the SCA7 gene reveals a highly unstable CAG repeat expansion. *Nat Genet* 17:65–70.
- David G, Durr A, Stevanin G, Cancel G, Abbas N, Benomar A, Belal S, Lebre AS, Abada-Bendib M, Grid D, Holmberg M, Yahyaoui M, Hentati F, Chkili T, Agid Y, Brice A (1998) Molecular and clinical correlations in autosomal dominant cerebellar ataxia with progressive macular dystrophy (SCA7). *Hum Mol Genet* 7:165–170.
- Deneris ES, Hobert O (2014) Maintenance of postmitotic neuronal cell identity. *Nat Neurosci* 17:899–907.
- Dhenain M, Delatour B, Walczak C, Volk A (2006) Passive staining: a novel ex vivo MRI protocol to detect amyloid deposits in mouse models of Alzheimer's disease. *Magn Reson Med* 55:687–693.
- Diamond ME, von Heimendahl M, Knutsen PM, Kleinfeld D, Ahissar E (2008) 'Where' and 'what' in the whisker sensorimotor system. *Nat Rev Neurosci* 9:601–612.
- Doyle JP, Dougherty JD, Heiman M, Schmidt EF, Stevens TR, Ma G, Bupp S, Shrestha P, Shah RD, Doughty ML, Gong S, Greengard P, Heintz N (2008) Application of a translational profiling approach for the comparative analysis of CNS cell types. *Cell* 135:749–762.
- Feil R, Hartmann J, Luo C, Wolfsgruber W, Schilling K, Feil S, Barski JJ, Meyer M, Konnerth A, De Zeeuw CI, Hofmann F (2003) Impairment of LTD and cerebellar learning by Purkinje cell-specific ablation of cGMP-dependent protein kinase I. *J Cell Biol* 163:295–302.
- Friedrich B, Euler P, Ziegler R, Kuhn A, Landwehrmeyer BG, Luthi-Carter R, Weiller C, Hellwig S, Zucker B (2012) Comparative analyses of Purkinje cell gene expression profiles reveal shared molecular abnormalities in models of different polyglutamine diseases. *Brain Res* 1481:37–48.
- Fujita H, Aoki H, Ajioka I, Yamazaki M, Abe M, Oh-Nishi A, Sakimura K, Sugihara I (2014) Detailed expression pattern of aldolase C (Aldoc) in the

- cerebellum, retina and other areas of the CNS studied in Aldoc-Venus knock-in mice. *PLoS One* 9:e86679.
- Furrer SA, Waldherr SM, Mohanachandran MS, Baughn TD, Nguyen KT, Sopher BL, Damian VA, Garden GA, La Spada AR (2013) Reduction of mutant ataxin-7 expression restores motor function and prevents cerebellar synaptic reorganization in a conditional mouse model of SCA7. *Hum Mol Genet* 22:890–903.
- Garcia S, Fourcaud-Trocmé N (2009) OpenElectrophy: an electrophysiological data- and analysis-sharing framework. *Front Neuroinform* 3:1–10.
- Gatchel JR, Watase K, Thaller C, Carson JP, Jafar-Nejad P, Shaw C, Zu T, Orr HT, Zoghbi HY (2008) The insulin-like growth factor pathway is altered in spinocerebellar ataxia type 1 and type 7. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:1291–1296.
- Gehrking KM, Andresen JM, Duvick L, Lough J, Zoghbi HY, Orr HT (2011) Partial loss of Tip60 slows mid-stage neurodegeneration in a spinocerebellar ataxia type 1 (SCA1) mouse model. *Hum Mol Genet* 20:2204–2212.
- Gold DA, Baek SH, Schork NJ, Rose DW, Larsen DD, Sachs BD, Rosenfeld MG, Hamilton BA (2003) ROR α coordinates reciprocal signaling in cerebellar development through sonic hedgehog and calcium-dependent pathways. *Neuron* 40:1119–1131.
- Gruol DL, Franklin CL (1987) Morphological and physiological differentiation of Purkinje neurons in cultures of rat cerebellum. *J Neurosci* 7:1271–1293.
- Hansen ST, Meera P, Otis TS, Pulst SM (2013) Changes in Purkinje cell firing and gene expression precede behavioral pathology in a mouse model of SCA2. *Hum Mol Genet* 22:271–283.
- Hausser M, Clark BA (1997) Tonic synaptic inhibition modulates neuronal output pattern and spatiotemporal synaptic integration. *Neuron* 19:665–678.
- Hawkes R (2014) Purkinje cell stripes and long-term depression at the parallel fiber-Purkinje cell synapse. *Front Syst Neurosci* 8:41.
- Helmlinger D, Hardy S, Abou-Sleymane G, Eberlin A, Bowman AB, Gansmuller A, Picaud S, Zoghbi HY, Trottier Y, Tora L, Devys D (2006) Glutamine-expanded ataxin-7 alters TFTC/STAGA recruitment and chromatin structure leading to photoreceptor dysfunction. *PLoS Biol* 4:e67.
- Helmlinger D, Hardy S, Sasorith S, Klein F, Robert F, Weber C, Miguet L, Potier N, Van-Dorsselaer A, Wurtz JM, Mandel JL, Tora L, Devys D (2004) Ataxin-7 is a subunit of GCN5 histone acetyltransferase-containing complexes. *Hum Mol Genet* 13:1257–1265.
- Hernandez-Castillo CR, Alcauter S, Galvez V, Barrios FA, Yescas P, Ochoa A, Garcia L, Diaz R, Gao W, Fernandez-Ruiz J (2013) Disruption of visual and motor connectivity in spinocerebellar ataxia type 7. *Mov Disord* 28:1708–1716.
- Hernandez-Castillo CR, Galvez V, Diaz R, Fernandez-Ruiz J (2016) Specific cerebellar and cortical degeneration correlates with ataxia severity in spinocerebellar ataxia type 7. *Brain Imaging Behav* 10:252–257.
- Hnisz D, Abraham BJ, Lee TI, Lau A, Saint-Andre V, Sigova AA, Hoke HA, Young RA (2013) Super-enhancers in the control of cell identity and disease. *Cell* 155:934–947.
- Holmberg J, Perlmann T (2012) Maintaining differentiated cellular identity. *Nat Rev Genet* 13:429–439.
- Holt GR, Softky WR, Koch C, Douglas RJ (1996) Comparison of discharge variability in vitro and in vivo in cat visual cortex neurons. *J Neurophysiol* 75:1806–1814.
- Horton LC, Frosch MP, Vangel MG, Weigel-DiFranco C, Berson EL, Schmammann JD (2013) Spinocerebellar ataxia type 7: clinical course, phenotype-genotype correlations, and neuropathology. *Cerebellum* 12:176–193.
- Hoxha E, Balbo I, Miniaci MC, Tempia F (2018) Purkinje cell signaling deficits in animal models of ataxia. *Front Synaptic Neurosci* 10:6.
- Ingram M, Wozniak EA, Duvick L, Yang R, Bergmann P, Carson R, O'Callaghan B, Zoghbi HY, Henzler C, Orr HT (2016) Cerebellar transcriptome profiles of ATXN1 transgenic mice reveal SCA1 disease progression and protection pathways. *Neuron* 89:1194–1207.
- Karam A, Trottier Y (2018) Molecular mechanisms and therapeutic strategies in spinocerebellar ataxia type 7. *Adv Exp Med Biol* 1049:197–218.
- Kashiwabuchi N, Ikeda K, Araki K, Hirano T, Shibuki K, Takayama C, Inoue Y, Kutsuwada T, Yagi T, Kang Y, Aizawa S, Mishina M (1995) Impairment of motor coordination, Purkinje cell synapse formation, and cerebellar long-term depression in GluR delta 2 mutant mice. *Cell* 81:245–252.
- Kato AS, Knierman MD, Siuda ER, Isaac JT, Nisenbaum ES, Bredt DS (2012) Glutamate receptor delta2 associates with metabotropic glutamate receptor 1 (mGluR1), protein kinase Cgamma, and canonical transient receptor potential 3 and regulates mGluR1-mediated synaptic transmission in cerebellar Purkinje neurons. *J Neurosci* 32:15296–15308.
- Kim D, Perrea G, Trapnell C, Pimentel H, Kelley R, Salzberg SL (2013) TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol* 14:R36.
- Klockgether T (2011) Update on degenerative ataxias. *Curr Opin Neurol* 24:339–345.
- Kramer A, Green J, Pollard J Jr, Tugendreich S (2014) Causal analysis approaches in Ingenuity Pathway Analysis. *Bioinformatics* 30:523–530.
- Kratz A, Beguin P, Kaneko M, Chimura T, Suzuki AM, Matsunaga A, Kato S, Bertin N, Lassmann T, Vigot R, Carninci P, Plessy C, Launey T (2014) Digital expression profiling of the compartmentalized transcriptome of Purkinje neurons. *Genome Res* 24:1396–1410.
- La Spada AR, Fu YH, Sopher BL, Libby RT, Wang X, Li LY, Einum DD, Huang J, Possin DE, Smith AC, Martinez RA, Koszdin KL, Treuting PM, Ware CB, Hurlley JB, Ptacek LJ, Chen S (2001) Polyglutamine-expanded ataxin-7 antagonizes CRX function and induces cone-rod dystrophy in a mouse model of SCA7. *Neuron* 31:913–927.
- Lan X, Koutelou E, Schibler AC, Chen YC, Grant PA, Dent SY (2015) Poly(Q) expansions in ATXN7 affect solubility but not activity of the SAGA deubiquitinating module. *Mol Cell Biol* 35:1777–1787.
- Lein ES, Hawrylycz MJ, Ao N, Ayres M, Bensinger A, Bernard A, Boe AF, Boguski MS, Brockway KS, Byrnes EJ, Chen L, Chen L, Chen TM, Chi Chin M, Chong J, Crook BE, Czaplinska A, Dang CN, Datta S, Dee NR, et al. (2007) Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature* 445:168–176.
- Love MI, Huber W, Anders S (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 15:550.
- Marmorstein LY, McLaughlin PJ, Peachey NS, Sasaki T, Marmorstein AD (2007) Formation and progression of sub-retinal pigment epithelium deposits in Efemp1 mutation knock-in mice: a model for the early pathogenic course of macular degeneration. *Hum Mol Genet* 16:2423–2432.
- Martin JJ (2012) Spinocerebellar ataxia type 7. *Handb Clin Neurol* 103:475–491.
- Martin JJ, Krols L, Ceuterick C, Van Broeckhoven C, Van Regemorter N, Hayer-Delatte F, Brucher JM, de Barsey T, Sziwowski H, Evrard P, Tassignon MJ, Smet-Dieleman H, Willems PJ (1994) On an autosomal dominant form of retinal-cerebellar degeneration: an autopsy study of five patients in one family. *Acta Neuropathol* 88:277–286.
- Metz M, Gassmann M, Fakler B, Schaeren-Wiemers N, Bettler B (2011) Distribution of the auxiliary GABAB receptor subunits KCTD8, 12, 12b, and 16 in the mouse brain. *J Comp Neurol* 519:1435–1454.
- Michalik A, Martin JJ, Van Broeckhoven C (2004) Spinocerebellar ataxia type 7 associated with pigmentary retinal dystrophy. *Eur J Hum Genet* 12:2–15.
- Mikhaleva A, Kannan M, Wagner C, Yalcin B (2016) Histomorphological phenotyping of the adult mouse brain. *Curr Protoc Mouse Biol* 6:307–332.
- Mookerjee S, Papanikolaou T, Guyenet SJ, Sampath V, Lin A, Vitelli C, DeGiacomo F, Sopher BL, Chen SF, La Spada AR, Ellerby LM (2009) Posttranslational modification of ataxin-7 at lysine 257 prevents autophagy-mediated turnover of an N-terminal caspase-7 cleavage fragment. *J Neurosci* 29:15134–15144.
- Niewiadomska-Cimicka A, Trottier Y (2019) Molecular targets and therapeutic strategies in spinocerebellar ataxia type 7. *Neurotherapeutics* 16:1074–1096.
- Niewiadomska-Cimicka A, Hache A, Trottier Y (2020) Gene deregulation and underlying mechanisms in spinocerebellar ataxias with polyglutamine expansion. *Front Neurosci* 14:571.
- Raman IM, Bean BP (1999) Ionic currents underlying spontaneous action potentials in isolated cerebellar Purkinje neurons. *J Neurosci* 19:1663–1674.
- Rub U, Brunt ER, Seidel K, Gierga K, Mooy CM, Kettner M, Van Broeckhoven C, Bechmann I, La Spada AR, Schols L, den Dunnen W, de Vos RA, Deller T (2008) Spinocerebellar ataxia type 7 (SCA7): widespread brain damage in an adult-onset patient with progressive visual

- impairments in comparison with an adult-onset patient without visual impairments. *Neuropathol Appl Neurobiol* 34:155–168.
- Salas-Vargas J, Mancera-Gervacio J, Velázquez-Pérez L, Rodríguez-Labrada R, Martínez-Cruz E, Magaña JJ, Durand-Rivera A, Hernández-Hernández O, Cisneros B, Gonzalez-Piña R (2015) Spinocerebellar ataxia type 7: a neurodegenerative disorder with peripheral neuropathy. *Eur Neurol* 73:173–178.
- Sarachana T, Hu VW (2013) Genome-wide identification of transcriptional targets of RORA reveals direct regulation of multiple genes associated with autism spectrum disorder. *Mol Autism* 4:14.
- Sato A, Sekine Y, Saruta C, Nishibe H, Morita N, Sato Y, Sadakata T, Shinoda Y, Kojima T, Furuichi T (2008) Cerebellar development transcriptome database (CDT-DB): profiling of spatio-temporal gene expression during the postnatal development of mouse cerebellum. *Neural Netw* 21:1056–1069.
- Serra HG, Duvick L, Zu T, Carlson K, Stevens S, Jorgensen N, Lysholm A, Burright E, Zoghbi HY, Clark HB, Andresen JM, Orr HT (2006) RORalpha-mediated Purkinje cell development determines disease severity in adult SCA1 mice. *Cell* 127:697–708.
- Sillitoe RV, Hawkes R (2002) Whole-mount immunohistochemistry: a high-throughput screen for patterning defects in the mouse cerebellum. *J Histochem Cytochem* 50:235–244.
- Smeets CJ, Verbeek DS (2014) Cerebellar ataxia and functional genomics: identifying the routes to cerebellar neurodegeneration. *Biochim Biophys Acta* 1842:2030–2038.
- Stoyas CA, Bushart DD, Switonski PM, Ward JM, Alaghata A, Tang MB, Niu C, Wadhwa M, Huang H, Savchenko A, Gariani K, Xie F, Delaney JR, Gaasterland T, Auwerx J, Shakkottai VG, La Spada AR (2020) Nicotinamide pathway-dependent Sirt1 activation restores calcium homeostasis to achieve neuroprotection in spinocerebellar ataxia type 7. *Neuron* 105:630–644.e639.
- Strom AL, Forsgren L, Holmberg M (2005) A role for both wild-type and expanded ataxin-7 in transcriptional regulation. *Neurobiol Dis* 20:646–655.
- Swaroop A, Kim D, Forrest D (2010) Transcriptional regulation of photoreceptor development and homeostasis in the mammalian retina. *Nat Rev Neurosci* 11:563–576.
- Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, Forslund K, Heller D, Huerta-Cepas J, Simonovic M, Roth A, Santos A, Tsafou KP, Kuhn M, Bork P, Jensen LJ, von Mering C (2015) STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res* 43:D447–D452.
- Tabata T, Araishi K, Hashimoto K, Hashimoto Y, van der Putten H, Bettler B, Kano M (2004) Ca²⁺ activity at GABAB receptors constitutively promotes metabotropic glutamate signaling in the absence of GABA. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:16952–16957.
- van de Warrenburg BP, Notermans NC, Schelhaas HJ, van Alfen N, Sinke RJ, Knoers NV, Zwarts MJ, Kremer BP (2004) Peripheral nerve involvement in spinocerebellar ataxias. *Arch Neurol* 61:257–261.
- White JJ, Arancillo M, King A, Lin T, Miterko LN, Gebre SA, Sillitoe RV (2016) Pathogenesis of severe ataxia and tremor without the typical signs of neurodegeneration. *Neurobiol Dis* 86:86–98.
- Whyte WA, Orlando DA, Hnisz D, Abraham BJ, Lin CY, Kagey MH, Rahl PB, Lee TI, Young RA (2013) Master transcription factors and mediator establish super-enhancers at key cell identity genes. *Cell* 153:307–319.
- Yanicostas C, Barbieri E, Hibi M, Brice A, Stevanin G, Soussi-Yanicostas N (2012) Requirement for zebrafish ataxin-7 in differentiation of photoreceptors and cerebellar neurons. *PLoS One* 7:e50705.
- Yefimova MG, Messaddeq N, Karam A, Jacquard C, Weber C, Jonet L, Wolfrum U, Jeanny JC, Trottier Y (2010) Polyglutamine toxicity induces rod photoreceptor division, morphological transformation or death in Spinocerebellar ataxia 7 mouse retina. *Neurobiol Dis* 40:311–324.
- Yoo SY, Pennesi ME, Weeber EJ, Xu B, Atkinson R, Chen S, Armstrong DL, Wu SM, Sweatt JD, Zoghbi HY (2003) SCA7 knockin mice model human SCA7 and reveal gradual accumulation of mutant ataxin-7 in neurons and abnormalities in short-term plasticity. *Neuron* 37:383–401.
- Yvert G, Lindenberg KS, Picaud S, Landwehrmeyer GB, Sahel JA, Mandel JL (2000) Expanded polyglutamines induce neurodegeneration and transneuronal alterations in cerebellum and retina of SCA7 transgenic mice. *Hum Mol Genet* 9:2491–2506.
- Yvert G, Lindenberg KS, Devys D, Helmlinger D, Landwehrmeyer GB, Mandel JL (2001) SCA7 mouse models show selective stabilization of mutant ataxin-7 and similar cellular responses in different neuronal cell types. *Hum Mol Genet* 10:1679–1692.



Broad Influence of Mutant Ataxin-3 on the Proteome of the Adult Brain, Young Neurons, and Axons Reveals Central Molecular Processes and Biomarkers in SCA3/MJD Using Knock-In Mouse Model

Kalina Wiatr¹, Łukasz Marczak¹, Jean-Baptiste Pérot², Emmanuel Brouillet², Julien Flament² and Maciej Figiel^{1*}

¹ Institute of Bioorganic Chemistry, Polish Academy of Sciences, Poznań, Poland, ² Université Paris-Saclay, Centre National de la Recherche Scientifique, Commissariat à l'Energie Atomique, Direction de la Recherche Fondamentale, Institut de Biologie François Jacob, Molecular Imaging Research Center, Neurodegenerative Diseases Laboratory, Fontenay-aux-Roses, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Matthew L. MacDonald,
University of Pittsburgh, United States

Reviewed by:

Clevo Nobrega,
University of Algarve, Portugal
Utpal Das,
University of California, San Diego,
United States

*Correspondence:

Maciej Figiel
mfigiel@ibch.poznan.pl

Received: 25 January 2021

Accepted: 01 April 2021

Published: 17 June 2021

Citation:

Wiatr K, Marczak Ł, Pérot J-B, Brouillet E, Flament J and Figiel M (2021) Broad Influence of Mutant Ataxin-3 on the Proteome of the Adult Brain, Young Neurons, and Axons Reveals Central Molecular Processes and Biomarkers in SCA3/MJD Using Knock-In Mouse Model. *Front. Mol. Neurosci.* 14:658339. doi: 10.3389/fnmol.2021.658339

Spinocerebellar ataxia type 3 (SCA3/MJD) is caused by CAG expansion mutation resulting in a long polyQ domain in mutant ataxin-3. The mutant protein is a special type of protease, deubiquitinase, which may indicate its prominent impact on the regulation of cellular proteins levels and activity. Yet, the global model picture of SCA3 disease progression on the protein level, molecular pathways in the brain, and neurons, is largely unknown. Here, we investigated the molecular SCA3 mechanism using an interdisciplinary research paradigm combining behavioral and molecular aspects of SCA3 in the knock-in ki91 model. We used the behavior, brain magnetic resonance imaging (MRI) and brain tissue examination to correlate the disease stages with brain proteomics, precise axonal proteomics, neuronal energy recordings, and labeling of vesicles. We have demonstrated that altered metabolic and mitochondrial proteins in the brain and the lack of weight gain in Ki91 SCA3/MJD mice is reflected by the failure of energy metabolism recorded in neonatal SCA3 cerebellar neurons. We have determined that further, during disease progression, proteins responsible for metabolism, cytoskeletal architecture, vesicular, and axonal transport are disturbed, revealing axons as one of the essential cell compartments in SCA3 pathogenesis. Therefore we focus on SCA3 pathogenesis in axonal and somatodendritic compartments revealing highly increased axonal localization of protein synthesis machinery, including ribosomes, translation factors, and RNA binding proteins, while the level of proteins responsible for cellular transport and mitochondria was decreased. We demonstrate the accumulation of axonal vesicles in neonatal SCA3 cerebellar neurons and increased phosphorylation of SMI-312 positive adult cerebellar axons, which indicate axonal dysfunction in SCA3. In summary, the SCA3 disease mechanism is based on the broad influence of mutant ataxin-3 on the neuronal proteome. Processes

central in our SCA3 model include disturbed localization of proteins between axonal and somatodendritic compartment, early neuronal energy deficit, altered neuronal cytoskeletal structure, an overabundance of various components of protein synthesis machinery in axons.

Keywords: spinocerebellar ataxia type 3 (SCA3), Machado-Joseph disease (MJD), ataxin-3, neurodegenerative, proteome, axon, vesicular transport, energy metabolism

INTRODUCTION

Spinocerebellar ataxia type 3 (SCA3), also known as Machado-Joseph disease (MJD), is a neurodegenerative, late-onset, genetic disorder caused by the expansion of CAG repeats in the coding region of the ATXN3 gene (>50 in patients) (McLoughlin et al., 2020). This mutation leads to an expanded polyglutamine (polyQ) tract in the ataxin-3 protein, causing a toxic gain of function (Orr and Zoghbi, 2007). SCA3 patients most typically display imbalance, motor incoordination, and neurodegeneration in the cerebellum, brainstem, spinal cord, and cerebral cortex (Bettencourt and Lima, 2011). Although the disease-causative mutation is known, the exact molecular and cellular mechanisms of SCA3 remain unclear. Several lines of evidence point to the disruption of axon organization and, therefore, connections between brain structures as one of the main traits in SCA3 pathogenesis (de Rezende et al., 2015; Farrar et al., 2016; Lu et al., 2017). Moreover, axonal impairment was observed in central nervous system (CNS) and peripheries in the form of white matter defects on magnetic resonance imaging (MRI) and peripheral axonal neuropathy in SCA3 patients (D'Abreu et al., 2009; Graves and Guiloff, 2011; Rezende et al., 2018). Axonal impairment may be related to the fact that mutant ataxin-3 aberrantly interacts with microtubules affecting cytoskeleton dynamics in neurons and forms inclusions in axons (Mazzuchelli et al., 2009; Seidel et al., 2010; Chen et al., 2012). Also, mitochondrial impairment is a component of axonal damage in neurodegeneration, and likely plays a role in SCA3 pathogenesis (Da Silva et al., 2019). We recently demonstrated that gross transcriptional changes are absent in the pre-symptomatic SCA3 brain of the Ki91 mouse model; however, dysregulations of proteins and phosphoproteins occurred in these animals, pointing at protein homeostasis as a more general and early trait in disease pathogenesis (Switonski et al., 2015; Wiatr et al., 2019).

The ataxin-3 protein is a particular type of protease, a deubiquitinase, and it has been previously demonstrated that the function in the mutant version of the protein is compromised (Neves-Carvalho et al., 2015), which should have a significant influence on the brain proteome. Therefore, the investigation

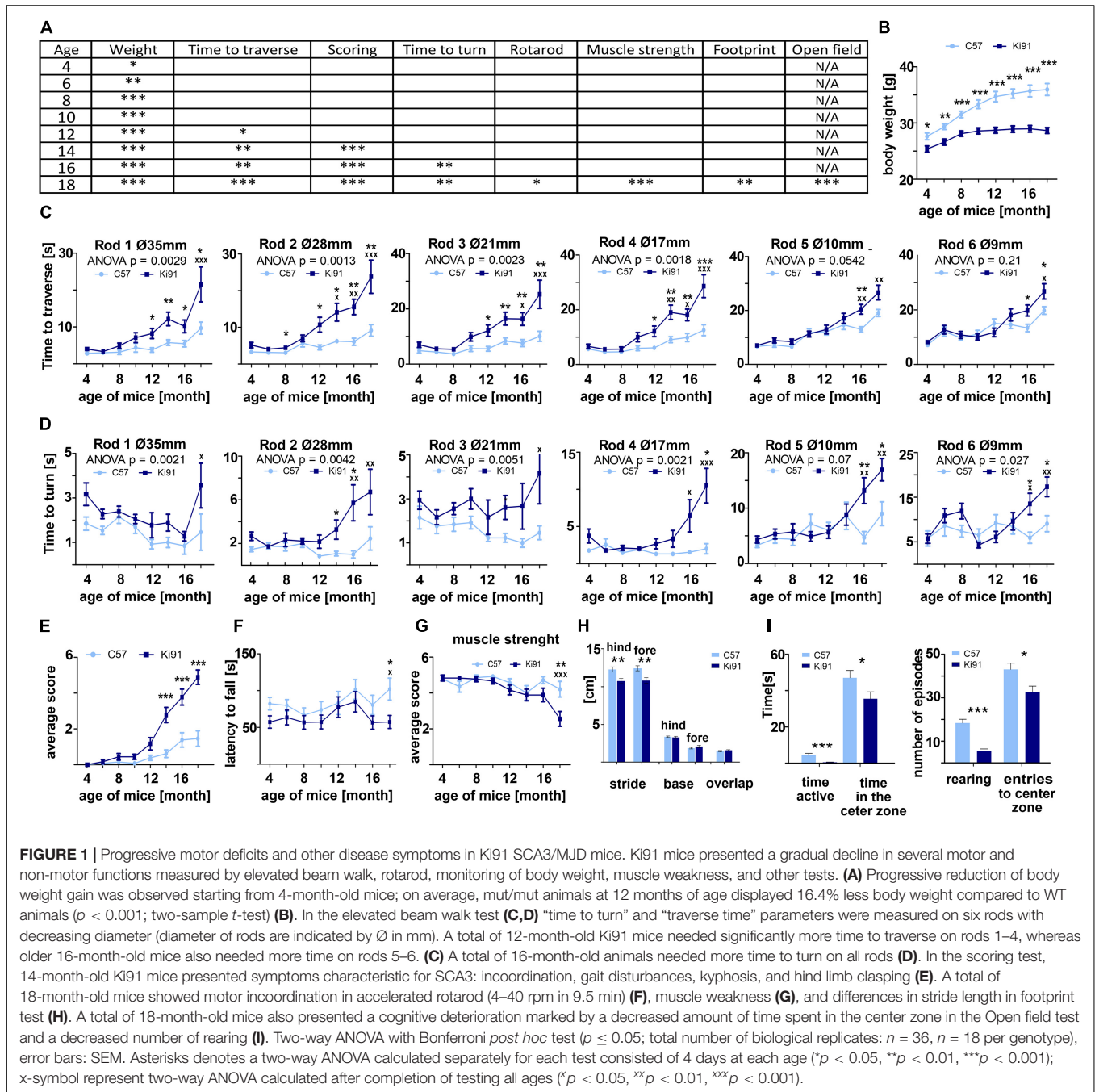
of proteins seems to be the strongest candidate to discover pathogenic mechanisms or identify the cluster of disease mechanisms. The number of known biomarkers and proteins reliably linked to SCA3 pathogenic processes is still relatively low. Surprisingly, the global model picture of SCA3 disease progression on the protein level, showing the most crucial proteins and pathways in the brain, and neurons, has not been generated and published previously. Therefore in the present work, we aimed to identify protein dysregulations and pathogenic processes in SCA3 on various levels, *in vitro*, and *in vivo*. We designed a research pipeline consisting of three complementary proteomic approaches, mouse behavior, and necessary functional validation assays to unveil with increased resolution the most critical processes influencing the SCA3 pathogenesis. The pipeline combines proteomics paralleled to behavioral milestones of SCA3 Ki91 and correlative proteomics for displaying the proteome linked to disease severity. In the third and the most focused approach, we used targeted proteomics of somatodendritic and axonal compartments from young SCA3 neurons. Our results indicate that the SCA3 disease mechanism is based on the broad influence of mutant ataxin-3 on the neuronal proteome affecting classes of proteins responsible for several central molecular processes. These include disturbed localization of proteins between axonal and somatodendritic compartment, early neuronal energy deficit, altered neuronal cytoskeletal structure, an overabundance of protein synthetic machinery in axons, and altered vesicular trafficking pointing at affected axonal maintenance.

RESULTS

The SCA3 in Ki91 Mice Gradually Progresses and Demonstrates Discrete Early and Late Phenotypes

We have previously demonstrated that by 2 months of age, Ki91 mice show no motor symptoms or other behavioral abnormalities, and we additionally defined the spectrum of Ki91 motor deficits using 14-month-old animals (Wiatr et al., 2019). Upon completing our longitudinal behavioral tests (4–18 months), we now demonstrate that the homozygous Ki91 model gradually develops disease symptoms resembling disease progression in SCA3 patients. Based on the large volume of longitudinal behavioral data (Figure 1), we have distinguished three stages of behavioral symptom development in Ki91 animals ($n = 36$). The first stage consists of progressive failure to gain body weight (4-month-old) followed by the early symptomatic stage (12-month-old), characterized by gait

Abbreviations: ANOVA, analysis of variance; BP, biological process; CPDB, ConsensusPath Database; CC, cellular compartment; CNS, central nervous system; DIV, days *in vitro*; ECAR, extracellular acidification rate; FC, fold change; MJD, Machado-Joseph disease; MS, mass spectrometry; mo, month-old, MF, molecular function; mRFP, monomeric red fluorescent protein; MRI, magnetic resonance imaging; mRNP, messenger ribonucleoprotein; NF, neurofilament; OCR, oxygen consumption rate; OXPHOS, oxidative phosphorylation; polyQ, polyglutamine; PCA, principal component analysis; SCA3, Spinocerebellar ataxia type 3; TCA, tricarboxylic acid cycle; WT, wildtype.



ataxia and motor incoordination. The final, symptomatic phase (18-month-old animals) is characterized by severe loss of balance and coordination, gait ataxia, dystonia, and muscle weakness (Figure 1A). Reduced rate of body weight gain was observed as the first symptom in 4-month-old Ki91 mice ($p < 0.05$; two-sample t -test), and the difference between Ki91 and wild-type (WT) littermates increased with age [$p < 0.001$; two-sample t -test, two-way analysis of variance (ANOVA), Bonferroni; Figure 1B]. At the age of 8 months, Ki91 mice stopped gaining weight, and their weight was stable across further ages (Figure 1B) while the WT animals still regularly

gained weight. First motor symptoms occurred in 12-month-old animals, which performed worse in the elevated beam walk (Figure 1C). Ki91 took more time to traverse rods (diameter: 35, 28, 21, and 17 mm) and committed more foot slips while performing the task ($p < 0.05$; two-way ANOVA, Bonferroni). As the disease progressed, 14-month-old Ki91 demonstrated overall deterioration of phenotype, including gait disturbances, loss of coordination, and balance, and several Ki91 animals demonstrated hindlimb claspings and kyphosis in the scoring test ($p < 0.0001$; one- and two-way ANOVA, Bonferroni) (Figure 1E). Next, 16-month-old Ki91 mice needed more time

to turn on a rod (diameter: 28, 17, 10, and 9 mm) in the elevated beam walk test ($p < 0.05$; two-way ANOVA, Bonferroni), showing loss of balance (**Figure 1D**). Besides, 18-month-old Ki91 mice demonstrated incoordination in the Rotarod ($p < 0.05$; two-way ANOVA, Bonferroni; **Figure 1F**), reduced muscle strength ($p < 0.001$; one- and two-way ANOVA, Bonferroni; **Figure 1G**), shorter stride, which indicated further gait disturbances in the footprint test ($p < 0.001$; two-sample t -test, ANOVA, Bonferroni; **Figure 1H**), and decreased activity and anxiety in the open field test ($p < 0.05$; two-sample t -test; **Figure 1I**). In this last test, Ki91 mice showed significantly less time spent moving ($p < 0.0001$; two-sample t -test), as well as decreased vertical activity (rearing) ($p < 0.0001$; two-two-sample t -test), a smaller number of the entries, and less time spent in the center zone ($p < 0.05$; two-sample t -test). Since mice showed differences in body weight, we ensured that no correlation existed between body weight and behavioral tests in each age to exclude the effect of the animals' weight on the results ($p < 0.05$, correlation test).

Ki91 SCA3/MJD Mice Demonstrate Multiple Brain Region Atrophy and the Presence of Atxn3 Inclusions Throughout the Brain

Magnetic resonance imaging was used on *ex vivo* brains of 18 months old animals ($n = 6$ per genotype) to measure brain volumes in Ki91 and WT mice (**Figures 2A,B**). As measured by MRI image segmentation, whole-brain volume showed significant global atrophy of the brain in Ki91 mice (-7% , $p < 0.001$; **Figure 2A**). When looking at regions volume, several structures seem particularly atrophied as parietal-temporal cortex (-11% , $p < 0.01$), entorhinal, piriform and motor cortexes (-11% each, $p < 0.05$), corpus callosum (-7.5% , $p < 0.05$), striatum (-11% , $p < 0.05$), septum (-11% , $p < 0.01$), pons (-12% , $p < 0.01$), and hypothalamus (-8% , $p < 0.05$) (**Figure 2B**). There was no significant atrophy in the hippocampus, and cerebellar atrophy was not determined due to MRI coil performance at the end of the brain. Fractional Anisotropy (FA) was also investigated as a biomarker of the integrity of tissue organization. FA was significantly decreased in dentate gyrus (-17% , $p < 0.01$), and stratum granulosum (-19% , $p < 0.05$) (**Figure 2C**).

Next, we have performed brain sections from 18-month-old Ki91 and staining using the anti-ataxin-3 antibody (**Figure 3**). We found that all brain areas, including the cerebral cortex, striatum, midbrain, hippocampus, cerebellum, DCN, and pons, demonstrated intensive positive signals in the form of both inclusions and diffuse staining of cellular structures ($n = 4$; **Figures 3A–E**). In particular, intense anti-ataxin-3 staining was present in cell nuclei, and many cells demonstrated large inclusions (**Figure 3A**). Interestingly, a significant number of smaller and larger ataxin-3-positive inclusions were scattered along the neurites (particularly axons labeled by SMI-312 axonal marker) in the cerebellum (**Figures 3C,E**). Although we could not measure cerebellum atrophy by MRI, we determined that the inclusions are rich in the cerebellum, indicating an intense pathogenic process. In the cerebellum, the large inclusions were

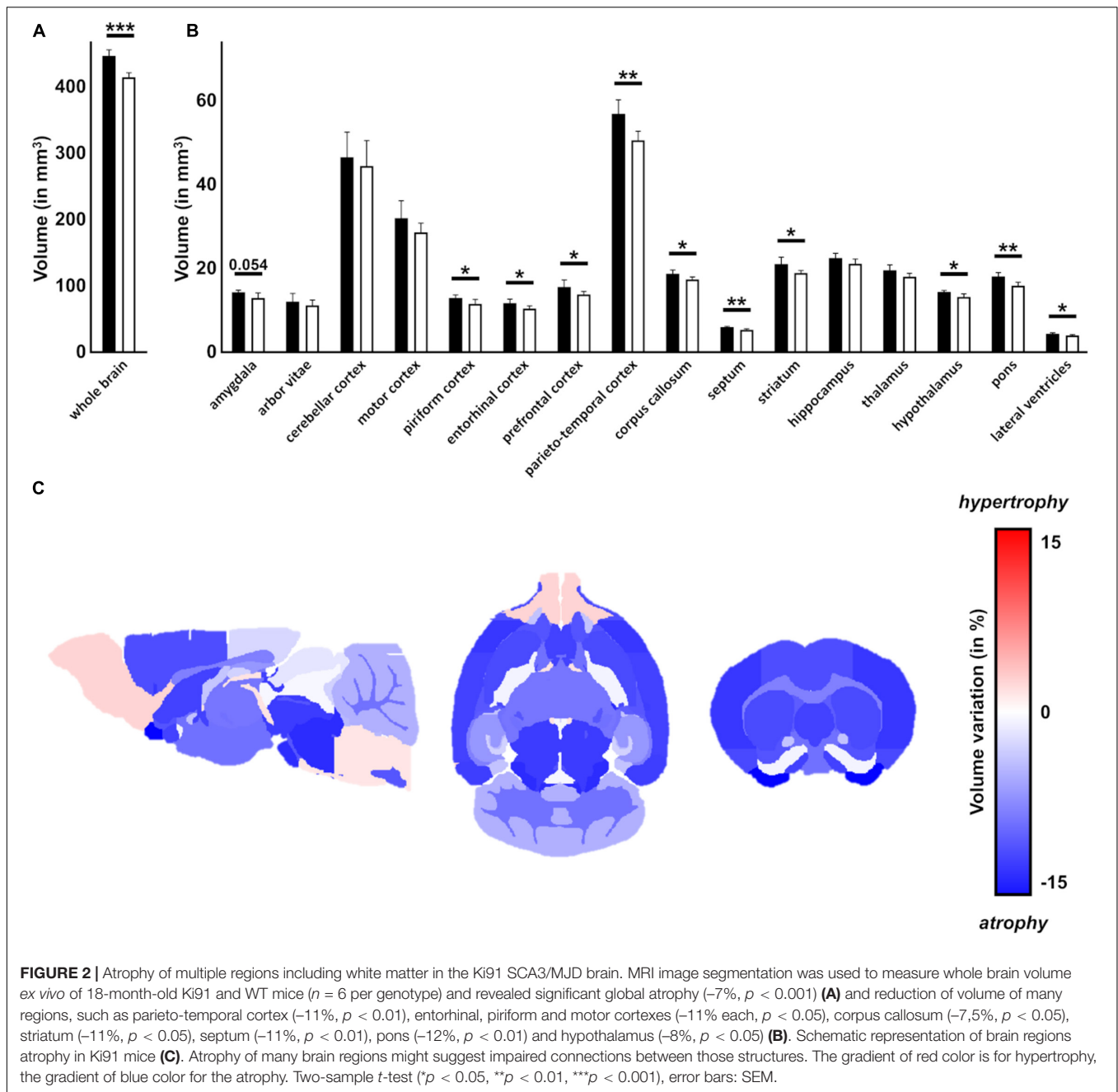
predominantly present in the DCN area, white matter, and in some cells located in the granular layer (**Figures 3B,D**). Many of the atxn3 inclusions were ubiquitinated (**Supplementary Figures 1A,B, 2**). Considering widespread brain atrophy and the inclusions in all regions, we reasoned that the brain pathogenic SCA3 processes are multi-region and multi-thread. Therefore we selected the cerebellum and cerebral cortex to represent both classically reported SCA3 pathogenesis in the hindbrain and postulated SCA3 pathogenesis in more frontal parts of the brain.

Proteomics Parallel to Behavioral Milestones Implicates Disturbed Metabolism, Cytoskeleton, and Vesicular Trafficking in Ki91 SCA3/MJD Mice

Parallel to behavioral experiments and based on the occurrence of symptoms in behavioral tests, we have selected four mouse ages (4, 10, 12, and 14-month-old, $n = 4$ per genotype) to analyze proteomic changes in the cerebral cortex (entire region collected for analysis) and cerebellum. In detail, 4-month-old Ki91 animals displayed reduced body weight gain; a 10-months stage was just before the onset of motor symptoms, while 12 and 14-month-old mice showed a decline in motor functions (**Figure 1**); therefore, the protein dysregulation in those ages would be most relevant. The principal component analysis (PCA) mostly demonstrated distinct clustering of the Ki91 and WT datasets (**Supplementary Figures 3A,B**). Altogether, we identified 115, 126, 212, and 75 proteins that were significantly dysregulated ($p < 0.05$; two-sample t -test) in the cerebellum of 4-, 10-, 12-, and 14-month-old Ki91 mice, respectively (**Supplementary Table 1 and Supplementary Figure 3C**). In comparison, 178, 89, 170, and 279 proteins were significantly dysregulated ($p < 0.05$; two-sample t -test) in the cerebral cortex of 4-, 10-, 12-, and 14-month-old Ki91 animals, respectively (**Supplementary Table 2 and Supplementary Figure 3C**).

In order to reveal molecular pathways and cellular compartments (CCs), which might contribute to the SCA3 pathogenesis, we performed an analysis of dysregulated proteins using the ConsensusPath database (CPDB; pathways and GO CC for each age; level 4 and 5; $q < 0.01$). For simplicity, we have arbitrarily grouped pathways and CCs identified in CPDB into five categories for the cerebral cortex (**Figure 4A**) and cerebellum (**Figure 4B**) based on their biological relations and similarity. Lists of proteins with the highest log₂-fold changes (log₂-FC) belonging to five categories are presented for the cerebral cortex (**Figure 4C**) and cerebellum (**Figure 4D**).

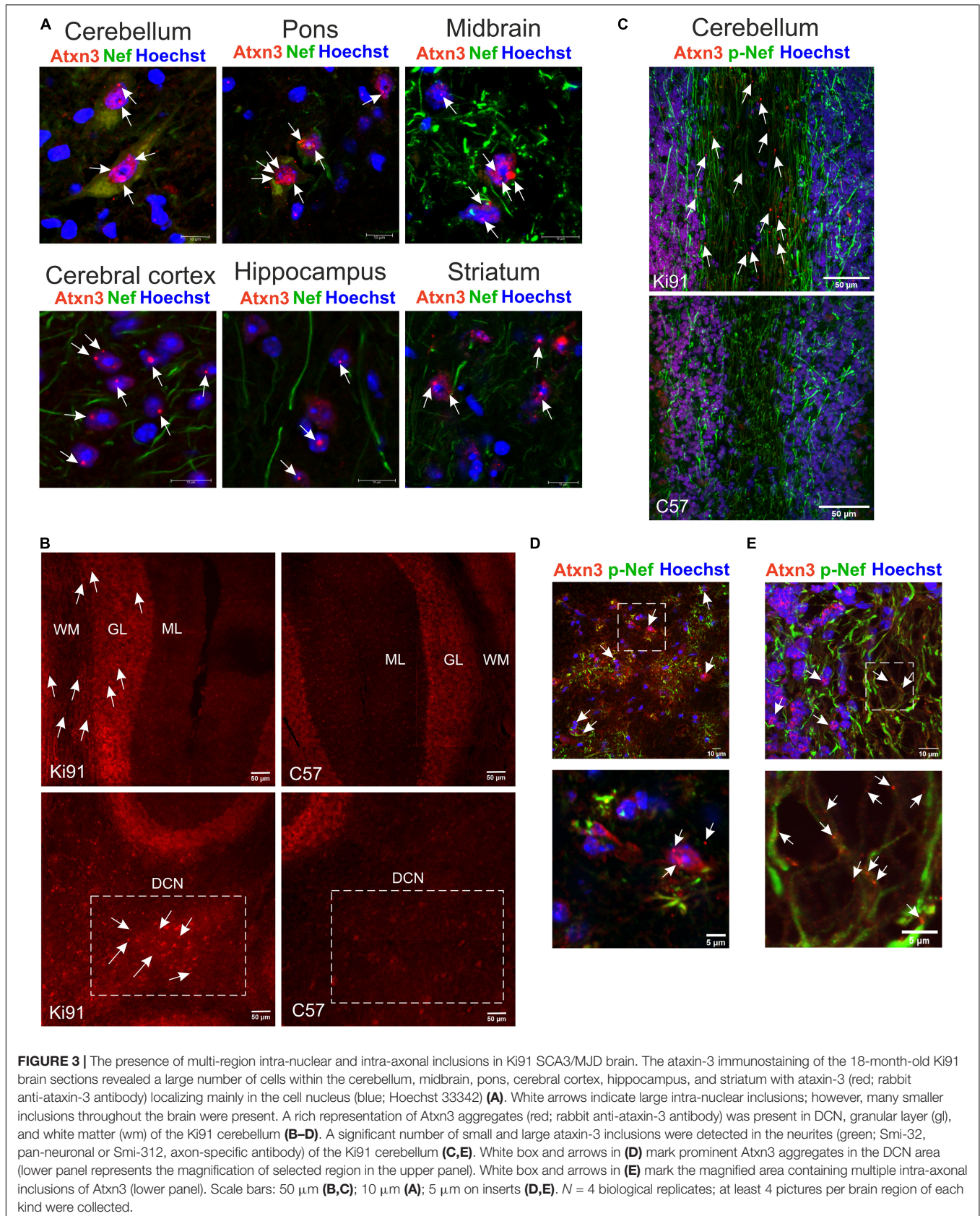
The first category was related to vesicular transport and endocytosis. Cytoplasmic vesicles and extracellular exosomes were the localization for 24–32 and 33–51% of dysregulated proteins in every dataset from the cortex (**Figure 4A**) and similarly 21–24 and 45–51% in the cerebellum (**Figure 4B**). Moreover, vesicle-mediated transport and clathrin-mediated endocytosis are predicted to be disturbed in both the cerebral cortex (Vamp2, Cltb, and Rab10; **Figure 4C**) and cerebellum (Rab11b, Napa, Nsf, and Rab3d; **Figure 4D**).



The second category included dysregulated proteins involved in synaptic transmission. There was a relative increase in the number of altered proteins in older 12–14 month-old Ki91 mice in the cerebral cortex compared to younger ages (4–10-month-old). For instance, pathways such as “transmission across chemical synapses” contained $\sim 6\%$ of dysregulated proteins in 4–10-month-old vs. $\sim 10\%$ in 12–14% and “synaptic vesicle cycle” $\sim 3\%$ vs. 7% , respectively (Figure 4A). Proteins related to SNARE complex and synaptic vesicles such as Syn3, Syp, Sv2a, and Syt7 were dysregulated (Figure 4C). Interestingly, most of the proteins with a function in the synapse showed decreased levels in the cerebral cortex of older 12–14-month-old Ki91 mice

(Figure 4C). In the cerebellum, dysregulated proteins of synaptic vesicles or synapses were less frequent compared to the cortex (Figure 4B) and included Sv2a, Syt2, and Kcna2 (Figure 4D). In both tested tissues, downregulation of Car2, Qdpr, and Glul, were detected in most of the tested ages (Figures 4C,D), which we also validated using vacuum dot-blot assay ($p < 0.05$; two-sample *t*-test; Supplementary Figure 4). Glul, Car2, and Qdpr play a role in the metabolism of amino acids and neurotransmitters, and Qdpr level is slightly and gradually dropping down across ages (Supplementary Tables 1, 2).

The third category was referring to altered proteins playing a role in regulating cytoskeletal structure and function.



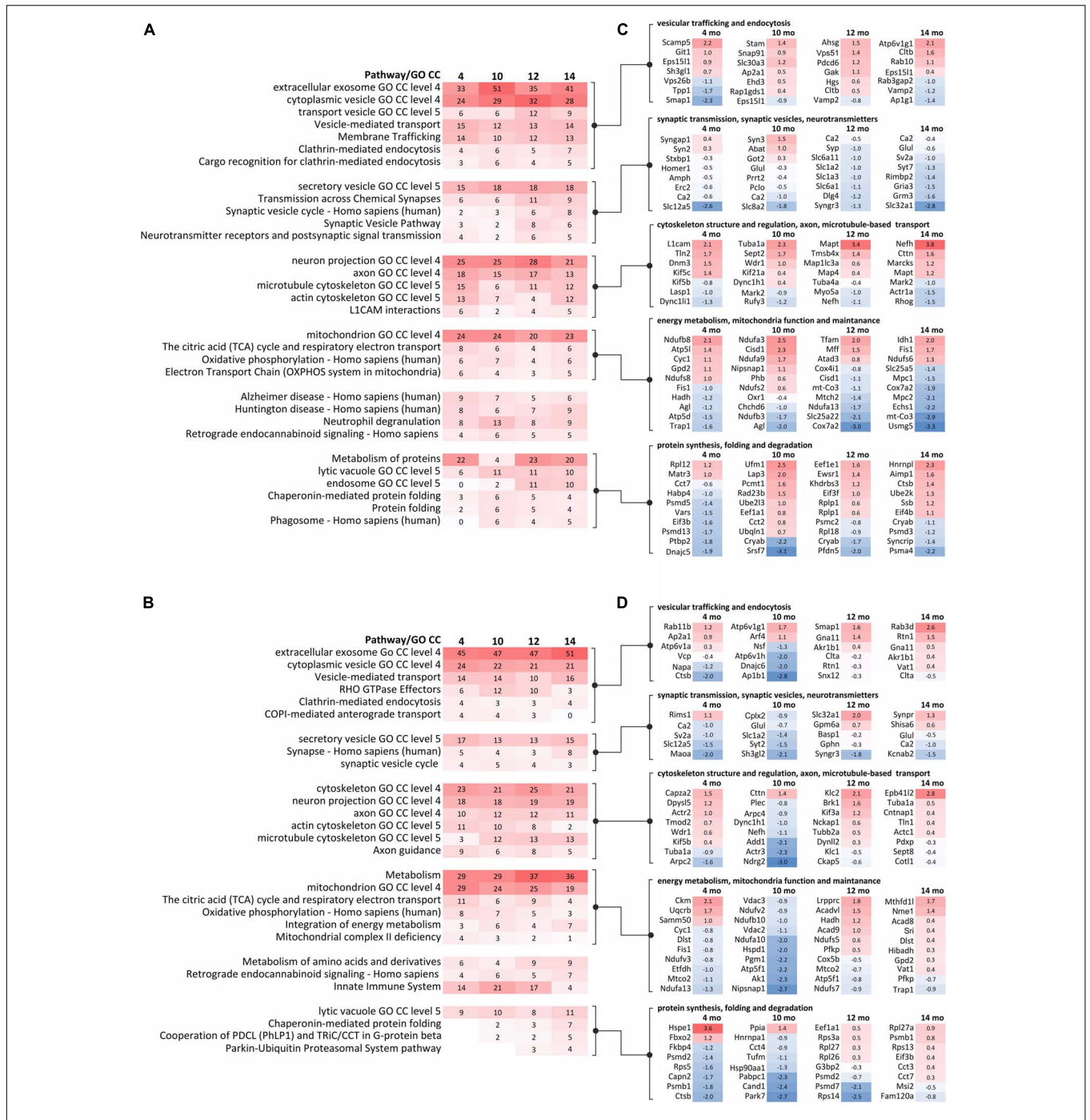


FIGURE 4 | GO term and pathway analysis of dysregulated proteins identified in proteomics at behavioral milestones in the Ki91 SCA3/MJD mouse brain implicate vesicular transport, cytoskeleton, protein metabolism, and mitochondrial function. Bioinformatic analysis of biological pathways and subcellular localization of dysregulated proteins ($p < 0.05$; two-sample t -test, $n = 4$ per genotype) during disease progression in the cerebral cortex (A) and cerebellum (B) was assessed using ConsensusPath database (CPDB); pathways p -value cut-off < 0.01 ; GO terms cellular component, p -value cut-off < 0.01 , level 3, 4). The heatmaps present changes of pathways and subcellular localization involving dysregulated proteins ($p < 0.05$; two-sample t -test) over the course of the disease in four tested ages (4, 10, 12, and 14-month-old) by showing what percentage of dysregulated proteins in each set is assigned to the particular pathway or subcellular region (numbers). The gradient of red color denotes a higher percentage of dysregulated proteins (more intense color) to a lower percentage of dysregulated proteins (less intense color). The five groups of pathways and GO terms arranged in blocks in (A,B) are linked to the corresponding lists of dysregulated proteins ($p < 0.05$; two-sample t -test) with the highest log2-FC in each tested age, assigned to five arbitrary categories in the cerebral cortex (C) and cerebellum (D). The categories were formed based on the analysis of pathways and GO terms and are as follows: (1) vesicular trafficking and endocytosis; (2) synaptic transmission, synaptic vesicles, and neurotransmitters; (3) cytoskeleton structure and regulation, axon, and microtubule-based transport; (4) energy metabolism, mitochondria function, and maintenance; and (5) protein synthesis, folding, and degradation. The lists of dysregulated proteins are also presented as heatmaps with numbers representing log2-FC (C,D). The gradient of red color is for upregulated proteins, blue color for downregulated proteins.

Dysregulated proteins localized to neuronal projections (axons and dendrites) constituted between 21 and 28% in the cortex and ~ 18% in the cerebellum (Figures 4A,B). Proteins assigned to cytoskeletal localization included actin (cortex: Actr1a; cerebellum: Arpc2 and Actr3), microtubules (cortex: Tubal1 and Mapt) and neurofilaments (cortex and cerebellum: Nefh) (Figures 4C,D). Disturbances of the cytoskeleton structure may lead to cellular transport defects, and there were many proteins directly regulating anterograde and retrograde axonal transport. For instance, in the cerebral cortex, dysregulated proteins involved in anterograde microtubule-based transport were Kif5c, Kif5b, and Kif21a and retrograde transport: Dnm3, Dync1li1, Dync1h1, and microtubule-associated proteins: Map1lc3a and Mark2 (Figure 4C). In the cerebellum, proteins involved in the anterograde microtubule-based transport included Kif5b, Klc1, Klc2, and Kif3a, and in retrograde transport Dync1h1 and Dynll2 (Figure 4D).

The fourth category involved many dysregulated proteins related to energy metabolism and mitochondria maintenance (Figures 4A–D). Proteins predicted to localize in mitochondrion were between 20–24 and 19–29% in the cortex and cerebellum, respectively (Figures 4A,B). The top pathway involving dysregulated proteins in the Ki91 cerebellum was metabolism (Figure 4B). Moreover, the number of proteins dysregulated in the cerebellum and associated with metabolism increases with age (4–10-month-old: ~ 29%; 12–14-month-old: ~ 36%; Figure 4B). Proteins related to tricarboxylic acid cycle (TCA) and oxidative phosphorylation (OXPHOS) are dysregulated in the cerebral cortex (mitochondrial proteins Ndufb8 with; Ndufa3, Ndufs6, and mt-Co3; Figure 4C) and cerebellum (Ndufa13, Ndufa10, and Ndufs7; Figure 4D). There were also dysregulated proteins responsible for mitochondria fission (Fis1 and Mff) and mitochondrial chaperons (Hspd1 and Trap1) (Figures 4C,D). Also, several proteins with altered levels mostly related to metabolism were linked to Alzheimer's and Huntington disease in both the cerebellum and cerebral cortex (Figures 4A,B).

The fifth category included dysregulated proteins involved in protein metabolism. In the case of the cerebral cortex, there are 4–23% dysregulated proteins involved in the metabolism of proteins (Figure 4A). Noteworthy, the number of dysregulated proteins predicted to localize in lysosomes, endosomes, and phagosomes is higher in the cortex of older mouse (Figures 4A,B). Similarly, the number of altered proteins involved in protein folding and “Parkin-Ubiquitin Proteasomal System pathway” is increasing with age in the Ki91 cerebellum (Figure 4B). Dysregulated proteins in this category involve also various ribosomal subunits and translation factors (cortex: Rpl12 and Eif3b; cerebellum: Rpl27a), proteasome subunits (cortex: Psmd13 and Psma4; cerebellum: Psmb1 and Psmd7), and chaperons (cortex: Dnajc5 and Cryab; cerebellum: Hspe1 and Park7) (Figures 4C,D). Downregulation of Cryab, which was one of the most frequently identified proteins implicated in the pathology of neurodegenerative disease (Zhu and Reiser, 2018), was confirmed with vacuum dot blot assay ($p < 0.05$; two-sample t -test) in the cerebral cortex (10, 14, and 18-month-old; Supplementary Figure 4A) and cerebellum (18-month-old; Supplementary Figure 4B). Of note, most of the proteasome subunits and

chaperons demonstrated decreased levels in both tested tissues (Figures 4C,D).

Proteomics Correlative With SCA3 Behavioral Phenotype in 18-Month-Old Ki91 Mice Reveals Dysregulated Proteins Involved in Transport, Cytoskeleton, Synapse, and Mitochondria

Our correlative proteomic approach aimed to discover dysregulated proteins in the brain of animals that demonstrated consistent behavioral phenotype to establish a more exact relationship between the protein biomarkers and the degree of SCA3 disease severity (Supplementary Figure 5). Therefore, after the endpoint of behavioral studies (18 months), the animals were grouped by the intensity of phenotype, and three phenotype subgroups were established in the Ki91 cohort: severe, moderate, and mild ($n = 4$). The selection was based on score assessment on the 0–5 scale (Kruskal–Wallis test, $p < 0.05$) (Supplementary Figure 6A). The scores 0 or 1 represented the “mild phenotype” group, score 2 or 3 was the “moderate phenotype” group, and 4 or 5 was the “severe phenotype” group. The cerebellum and cerebral cortex were collected from each group, and the tissues were subjected to proteomics (Supplementary Table 3 and Supplementary Figures 5A,B). The analysis of dysregulated proteins revealed that protein levels in the moderate group were mostly in between the level of the severe and mild group, demonstrating a gradual pattern of protein dysregulation in Ki91 mice (Supplementary Figures 6B,C). Therefore in further data processing, we focused on the protein levels in severe and mild phenotype.

We found that in the cerebellum of the Ki91 animals with the severe phenotype ($n = 4$), there were heat shock protein Dnaj1 and a nuclear importin Kpna4 upregulated compared to WT animals (WT; $n = 10$) (Supplementary Figure 6B). Another member of the importin family, Kpna3, was previously shown to control the nuclear localization of ataxin-3 (Sowa et al., 2018). There were also five upregulated proteins in the mild phenotype ($n = 4$) – Pvalb, Pak1, Kif5c, and neurofilaments (Nefl and Nefm). Pak1, a kinase implicated in vesicle-mediated transport and regulation of cytoskeleton dynamics, and Kif5c involved in microtubule-based transport, were also downregulated in severe phenotype (Supplementary Figure 6B). Moreover, in the severe group, there were also other downregulated proteins playing a pivotal role in transport along the microtubule (Klc1, Kif5c, Vat1l, and Map4) and notably Purkinje cell protein 4 (Pcp4), which was not dysregulated in mild phenotype (Supplementary Figure 6B). Noteworthy, mitochondrial proteins were downregulated in both severe and mild phenotypes. Mitochondrial chaperone Timm9 showed lower levels in the “severe” group, while Ndufb5 and Fasn were downregulated in the “mild” group (Supplementary Figure 6B).

In the cerebellar cortex, the only upregulated protein was a subunit of mitochondrial ATP synthase, Atp5a1 (Supplementary Figure 6C). Proteins commonly downregulated in both severe and mild phenotype (Supplementary Figure 6C) included Glul, already identified in the proteomics performed

parallel to behavioral milestones and myelin protein Cnp, ubiquitinating enzyme Ube2n, transcription factor Tceb1, and Snx12 involved in intracellular trafficking. In the mild group only, there were downregulated proteins associated with synaptic vesicles and post-synaptic density (Akap5, Bsn, Pclo, and Gprin1; **Supplementary Figure 6C**). Whereas in a “severe” group, there were downregulated proteins related to intracellular transport and cytoskeleton (Snx12, Dlg3, Dnm2, Cap2, and Atcay), and mitochondrial protein Cox7a2 (**Supplementary Figure 6C**).

Altogether, we identified a set of proteins involved in intracellular and microtubule-based transport downregulated in the cerebellum and cerebral cortex of Ki91 mice displaying severe phenotype. Downregulated proteins in the “mild” phenotype were related to mitochondria in the cerebellum and synapse in the cerebral cortex. Proteins upregulated in the cerebellum were associated with cytoskeleton and neurofilaments in the “mild” group. Cellular processes and compartments associated with dysregulated proteins in “severe” phenotype were related to mitochondria, intracellular and microtubule-based transport, synaptic vesicles, and the cytoskeleton. Most of these processes and compartments were also identified in our approach parallel to behavioral milestones. An essential neuronal structure, which connected those terms, is the axon, which requires high energy production, highly efficient trafficking of cargoes toward its end, and is a location of synaptic vesicle release. Therefore, we further decided to go to the next level of neuronal complexity in our proteomic investigation and selectively explore proteins dysregulated in the SCA3 axons.

Targeted Axonal Proteomics Indicates the Abnormal Localization of Proteins Between Axons and Soma Such as Cytoskeletal, Vesicular Proteins, and Highly Increased Translation Machinery in Ki91 SCA3 Neurons

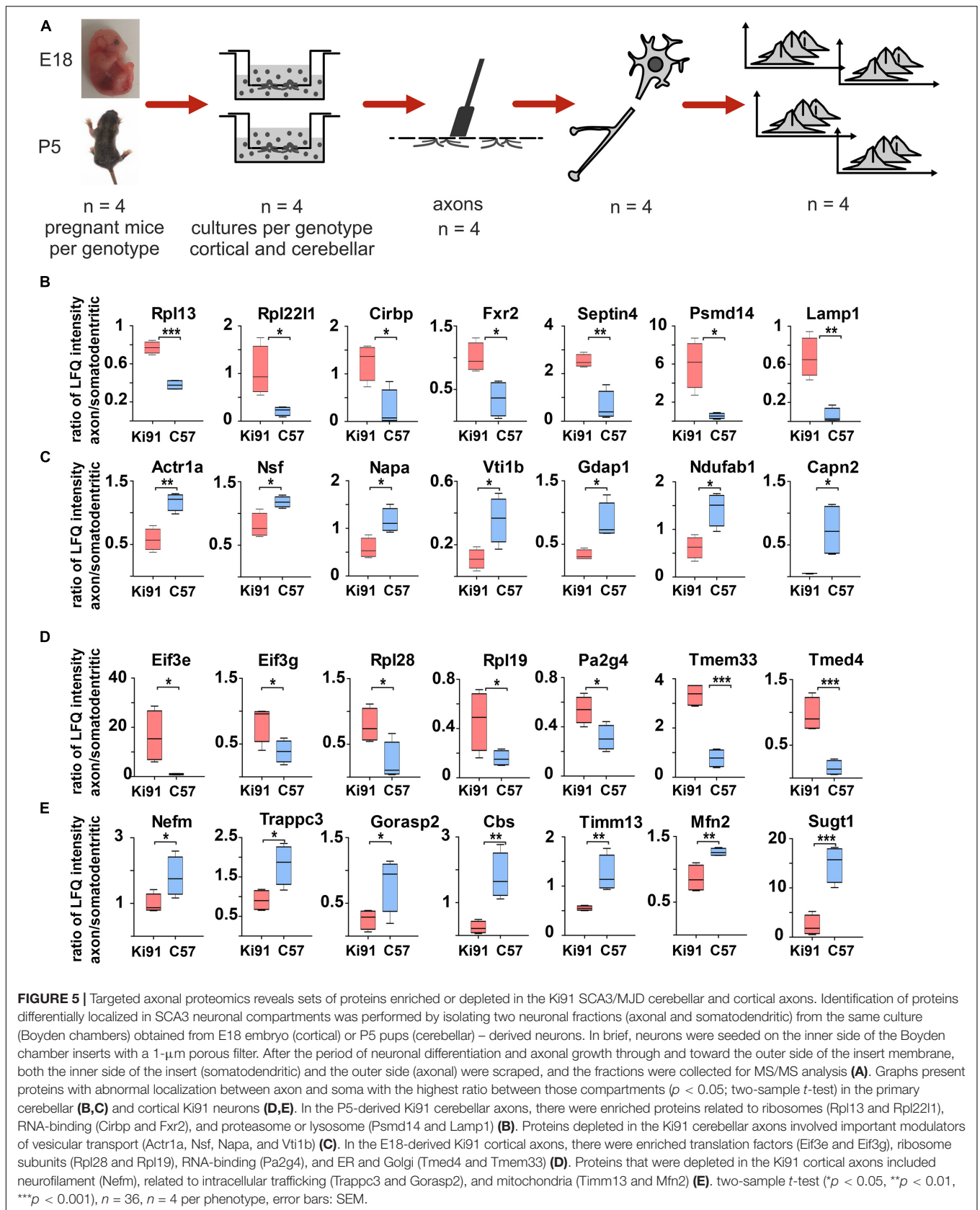
Our next aim was to define with high precision the specific processes which highly contribute to axonal dysfunction in SCA3 already at a very early level of neuronal maturation stage, where no neuronal damage takes place, and therefore no secondary post-symptomatic events occur. Therefore, we performed the analysis of enriched or decreased proteins in axons of the cerebellar (young postnatal; P5) and cortical neurons (embryonal; E18) growing in Boyden chambers ($n = 4$ per genotype; **Figure 5A**).

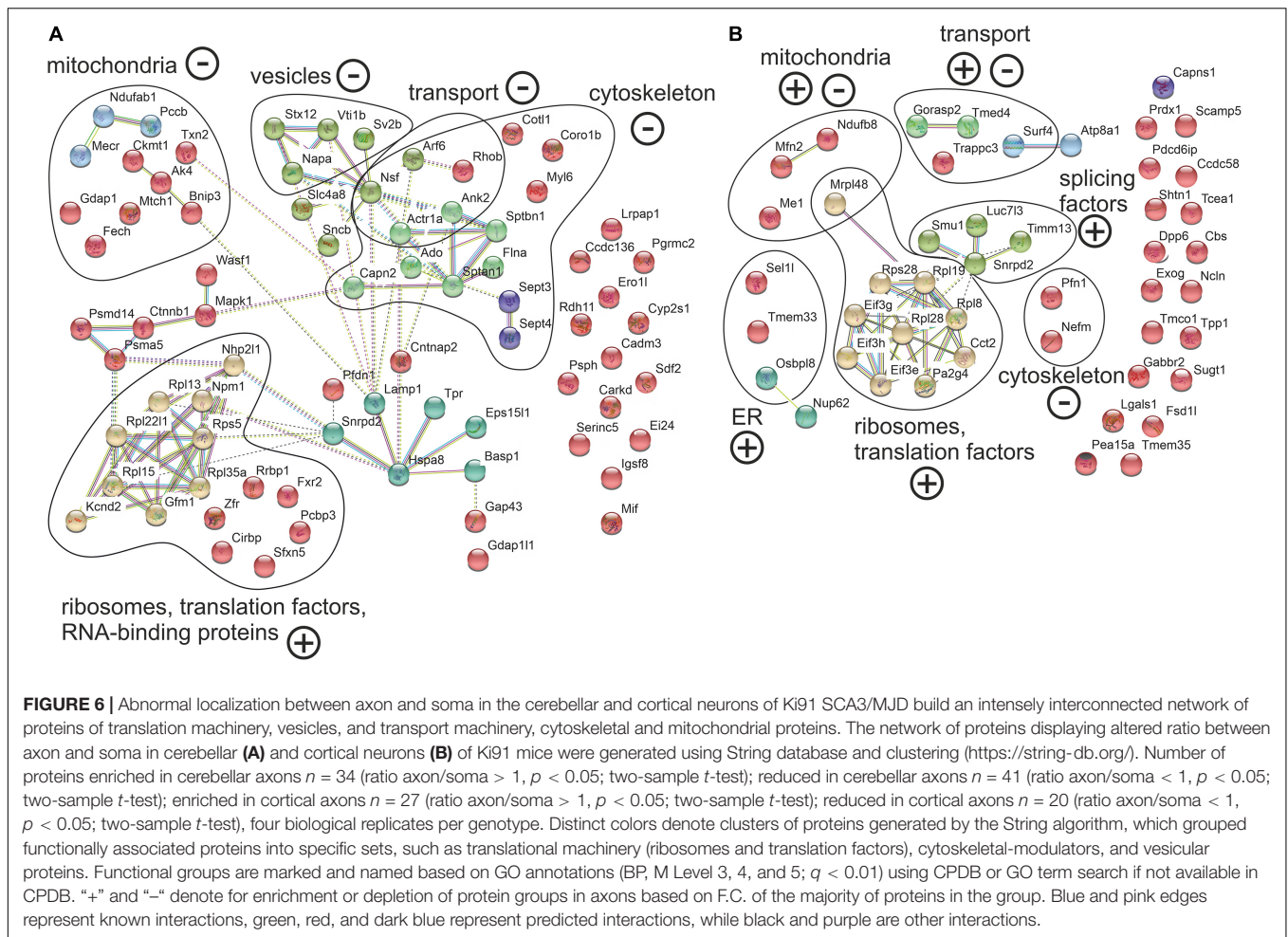
Both somatodendritic and axonal protein extracts were subjected to MS/MS proteomics, and the “raw levels” for each protein for both compartments were determined (**Supplementary Table 4**). To normalize the protein levels within fractions originating from neurons on the same filter, we calculated the protein level ratio between the axonal and somatodendritic compartments for each WT and Ki91 sample/filter (**Supplementary Table 4**). Such normalization

has proved very solid since the comparison of soma/axon ratios within the single genotype (WT or Ki91) demonstrated that the most significant difference was the abundance of nuclear proteins, such as histones, and nuclear enzymes characteristic for the somatodendritic compartment (ratio axon to soma < -3 ; **Supplementary Table 4**). Coherently, the PCA graph demonstrates a clear separation between axonal and somatodendritic samples (**Supplementary Figures 7C,D**).

Subsequently, we compared protein level ratios between WT and Ki91 SCA3/MJD neurons to calculate the fold change and estimate if the protein was enriched or depleted in axons ($p < 0.05$; two-sample *t*-test; **Supplementary Table 4**). In the cerebellar neurons, there were 34 proteins enriched (ratio axon/soma > 1 , $p < 0.05$; two-sample *t*-test; $n = 4$) and 41 proteins depleted (ratio axon/soma < 1 , $p < 0.05$; two-sample *t*-test; $n = 4$) in Ki91 vs. WT axons (**Figures 5B,C** and **Supplementary Tables 5, 6**). There were 27 and 20 such proteins in cortical neurons, respectively (**Figures 5D,E** and **Supplementary Tables 7, 8**). The analysis of proteins in both cerebellar and cortical Ki91 axons revealed a common functional characteristic. The majority of the axon-enriched proteins in SCA3 samples were related to the upregulation of protein production and degradation (**Figures 5B,D, 6A,B** and **Supplementary Tables 6, 8**). Strongly upregulated was the translation machinery, in particular the initiation step and nonsense-mediated decay together with the RNA binding proteins, including Cirbp (FC = 4.92; **Figure 5B**), which stabilizes mRNAs involved in cell survival during stress (Liao et al., 2017). Highly upregulated were the proteasome subunits and chaperones enriched in cerebellar Ki91 axons (Psm14, Psm5, and Hspa8; **Supplementary Table 6**) and cortical Ki91 axons (Sel1l and Cct2; **Supplementary Table 8**), which altogether might be related to the neuronal response to cellular stress and misfolded proteins in SCA.

In contrast, proteins that were reduced in Ki91 axons comparing to WT were in the majority related to the actin cytoskeleton and vesicle-mediated transport, which may indicate the axonal structural dysfunction (**Figures 5C,E, 6A,B** and **Supplementary Tables 5, 7**). In Ki91 cerebellar axons, there were reduced levels of 13 proteins related to cytoskeleton, including 8 proteins regulating actin function (**Figures 5C, 6A** and **Supplementary Table 5**). The actin cytoskeleton is involved not only in maintaining the proper structure of the axon but also plays a pivotal role in the short-range transport, selection of cargoes targeted to the axon tip, formation of synapses, and scaffold for the mitochondria in the growth cone (Kevenaar and Hoogenraad, 2015). Along this line, we identified eight mitochondrial proteins with a lower ratio axon vs. soma in cerebellar SCA3 samples as compared to WT (**Figures 5C, 6A** and **Supplementary Table 5**). Altogether, this may indicate the disrupted delivery of mitochondria to the proper axon area due to the deregulated function of the actin cytoskeleton. Moreover, there are also proteins with a reduced level in cerebellar Ki91 axons directly related to intracellular trafficking (Actr1a, Ank2, Arf6, Nsf, and Rhob), synaptic/SNARE vesicles (Sv2b, Napa, and Vti1b), and COPI-mediated transport from ER to Golgi (Napa, Actr1a, Nsf,





Sptan1, Sptbn, and Ank2) (Figures 5C, 6A and Supplementary Table 5).

In cortical Ki91 axons, there were generally fewer proteins identified with lower ratio axons to the soma (Figure 5E and Supplementary Table 7). However, there were also proteins related to mitochondria, transport, and cytoskeleton, including neurofilament medium-chain (Nefm), playing an essential role in axonal function (Figures 5E, 6B and Supplementary Table 7).

Impairment of Mitochondrial Metabolic Potential in Ki91 SCA3/MJD Primary Cerebellar Neurons

Spinocerebellar ataxia type 3 patients show decreased BMI, and similarly, SCA3 Ki91 mice fail to gain weight. Moreover, our proteomic approaches identified mitochondria and energy metabolism failure in Ki91. The direct investigation of energy metabolism in presymptomatic young SCA3 neurons was not performed previously; therefore, it is unknown if the mitochondrial phenotype occurs early in SCA3 and if mitochondrial dysfunction is a primary contributor to the SCA3 pathology or only the secondary result of putative

mice and patient dysphagia. To address whether energy metabolism is disturbed in Ki91 neurons, we performed Cell Energy Phenotype Test with Seahorse XFP analyzer. The assay was performed on primary cerebellar neurons in days *in vitro* 3 (DIV3), 11, 18, and 21 ($n = 6$ per genotype and stage; Figures 7A–C). The oxygen consumption rate (OCR) and extracellular acidification rate (ECAR) were measured over time at baseline and stressed conditions (injection of oligomycin and FCCP mixture) (Supplementary Figure 8). Then, the metabolic potential of neurons was evaluated by calculating changes after stress conditions relative to baseline. The test demonstrated a significant increase in the ECAR metabolic potential in both Ki91 and WT neurons in every tested stage ($p < 0.0001$; two-sample t -test; Figures 7A,B). Likewise, an increase of the OCR metabolic potential was observed in WT neurons and Ki91 neurons, but only in DIV11 and 21 ($p < 0.05$; two-sample t -test; Figures 7A,B). Furthermore, under stressed conditions, the levels of ECAR were diminished in Ki91 neurons compared to WT in DIV3, 18, and 21 ($p < 0.001$; two-sample t -test; Figures 7A,C). Interestingly, both baseline and stressed OCR was increased in Ki91 neurons compared to WT in DIV 3 and 11 ($p < 0.0001$; two-sample t -test; DIV11 baseline $p = 0.13$; Figures 7A,C),

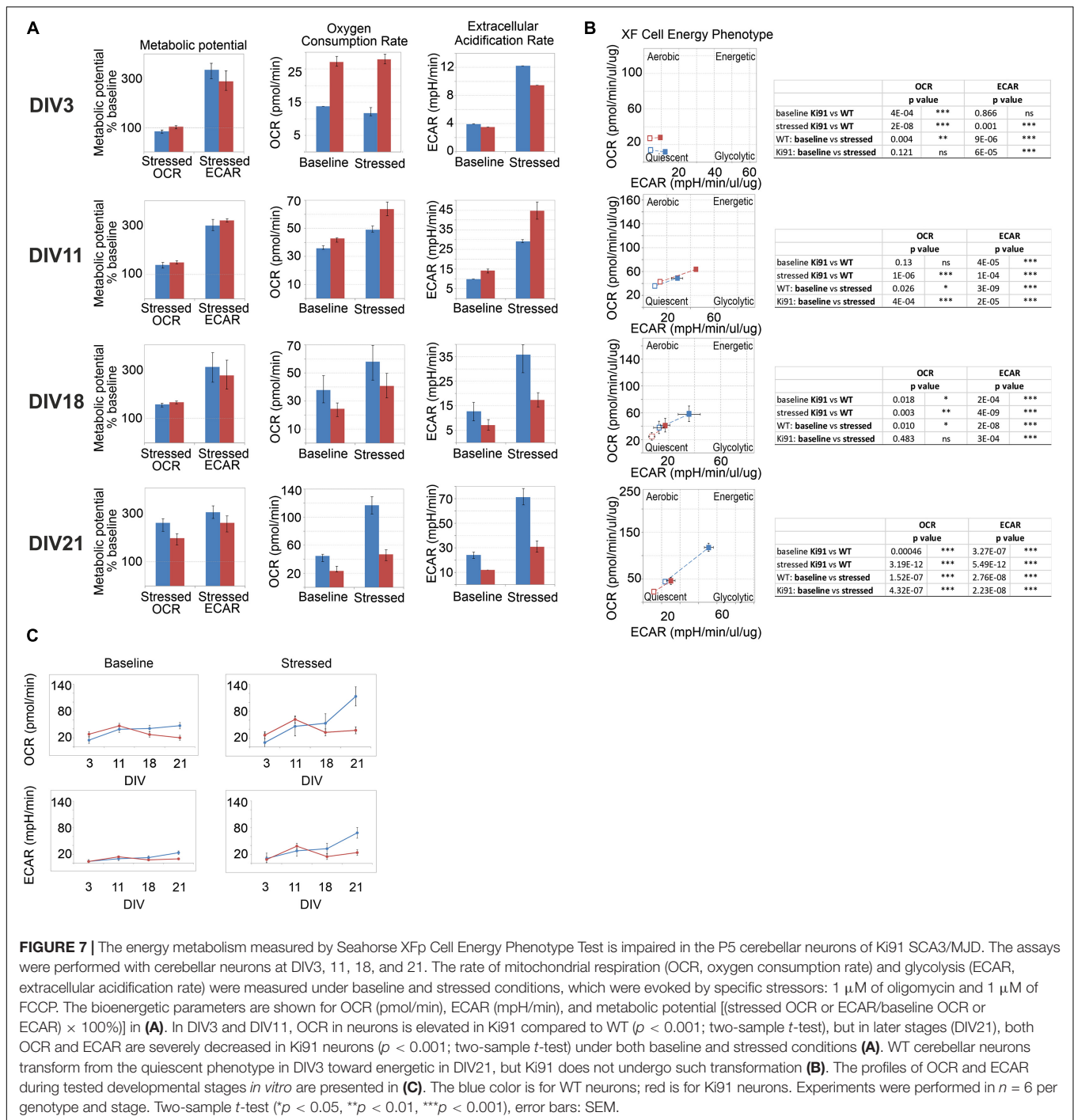


FIGURE 7 | The energy metabolism measured by Seahorse XFp Cell Energy Phenotype Test is impaired in the P5 cerebellar neurons of Ki91 SCA3/MJD. The assays were performed with cerebellar neurons at DIV3, 11, 18, and 21. The rate of mitochondrial respiration (OCR, oxygen consumption rate) and glycolysis (ECAR, extracellular acidification rate) were measured under baseline and stressed conditions, which were evoked by specific stressors: 1 μM of oligomycin and 1 μM of FCCP. The bioenergetic parameters are shown for OCR (pmol/min), ECAR (mpH/min), and metabolic potential [(stressed OCR or ECAR/baseline OCR or ECAR) \times 100%]) in (A). In DIV3 and DIV11, OCR in neurons is elevated in Ki91 compared to WT ($p < 0.001$; two-sample t -test), but in later stages (DIV21), both OCR and ECAR are severely decreased in Ki91 neurons ($p < 0.001$; two-sample t -test) under both baseline and stressed conditions (A). WT cerebellar neurons transform from the quiescent phenotype in DIV3 toward energetic in DIV21, but Ki91 does not undergo such transformation (B). The profiles of OCR and ECAR during tested developmental stages *in vitro* are presented in (C). The blue color is for WT neurons; red is for Ki91 neurons. Experiments were performed in $n = 6$ per genotype and stage. Two-sample t -test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$), error bars: SEM.

while in later stages, the trend was reversed and in DIV18 and 21 it was significantly decreased ($p < 0.01$; two-sample t -test; Figures 7A,C).

Overall, these data demonstrate that the potential for energy production is impaired in cerebellar Ki91 neurons. The glycolysis rate shows fluctuations in both baseline and stressed conditions. On the other hand, mitochondrial respiration shows a coherent pattern, which starts with an increase under both tested conditions, following by a decrease. The study

demonstrates that energy deficit occurs early in SCA3 neurons, and therefore it is not a secondary event resulting from previous neuronal damage.

Assessment of Vesicle State in Neurites of Ki91 SCA3/MJD Cerebellar Neurons

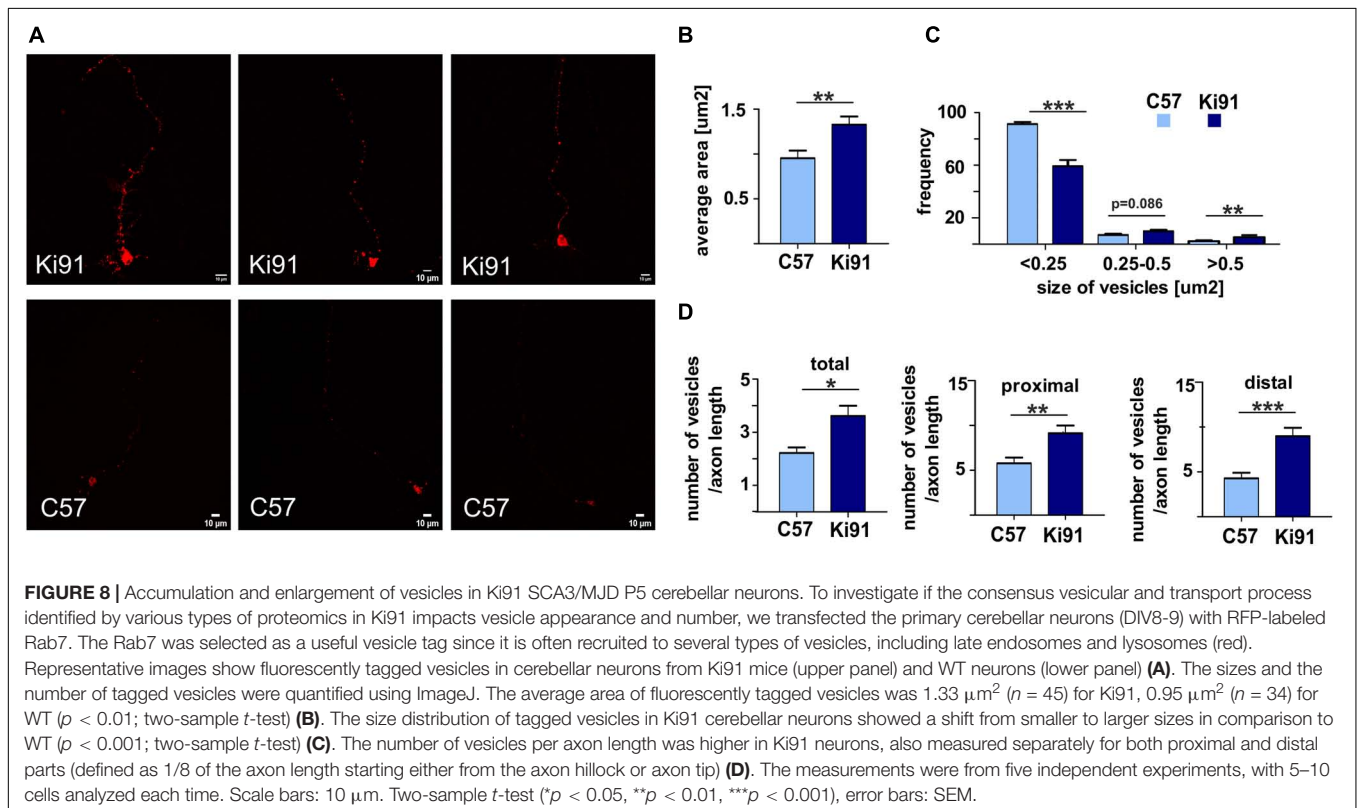
All proteomic approaches collectively demonstrated altered levels of proteins building cellular vesicles or regulating intracellular

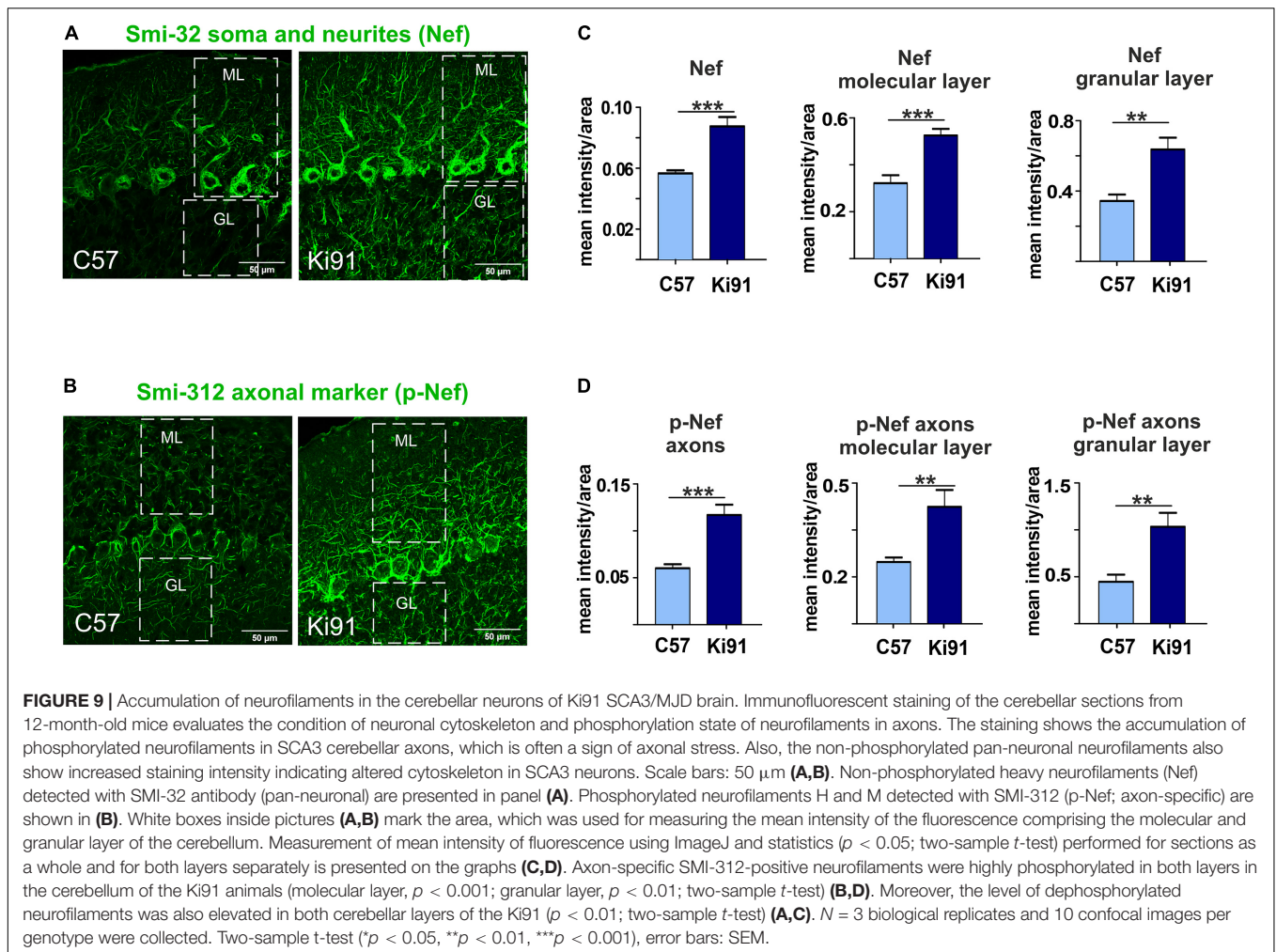
vesicular trafficking. Therefore, our next goal was to assess a state of vesicles using the functional assay based on the labeling of neuronal vesicles using Rab7, a vesicular protein commonly occurring in late endosomes, lysosomes, and other types of vesicles that are undergoing active transport in axons and dendrites. Therefore we transfected monomeric red fluorescent protein (mRFP)-tagged Rab7 to SCA3 primary cerebellar neurons (neuron cultures isolated from three different sets of P5 pups, five independent transfections, with 5–10 neurons analyzed each time; **Figure 8A**).

We found that the average area of vesicles labeled with fluorescently tagged Rab7 was significantly (*t*-test, $p < 0.01$) increased by 40% in Ki91 as compared to WT neurons (**Figure 8B**). Distribution of vesicle size showed that Ki91 neurons had a lower number of small vesicles ($<0.25 \mu\text{m}^2$) and a higher number of large vesicles ($>0.5 \mu\text{m}^2$) (*t*-test, $p < 0.01$; **Figure 8C**). We did not detect any differences in the shape of vesicles. However, there was a significant increase in the number of vesicles normalized to the length of the measured axon (*t*-test, $p < 0.05$; **Figure 8D**). To assess whether Rab7-loaded vesicles accumulate in either the axon's proximal or distal region, we also calculated the number of vesicles in those regions, arbitrarily defined as 1/8 of the axon length starting either from the axon hillock or axon tip. There was a significant increase in the number of vesicles in the proximal region (*t*-test, $p < 0.01$) by 58% in Ki91 as compared to WT neurons and in the distal part (*t*-test, $p < 0.001$) by 110% (**Figure 8D**).

Ki91 SCA3/MJD Neurons Show Increased Phosphorylation of Axon-Specific Neurofilaments, Indicating the Stress of the Axonal Cytoskeleton

The proteomic approaches and, in particular, the axonal proteomics demonstrated that several classes of dysregulated proteins in SCA3 are located in the axonal compartment. We also found the ataxin-3-positive inclusions along axons in the cerebellum by co-staining with axon-specific marker smi-312 antibody (axon-specific p-Nef). The phosphorylation state of axonal neurofilaments reflects the health of the neuronal cytoskeleton. Therefore we further explored whether the structure and phosphorylation status of neurofilaments are disturbed in the SCA3 model. We assessed the phosphorylated and non-phosphorylated neurofilaments (axon-specific p-Nef and neuronal Nef; **Figure 9**) on immunostained sagittal brain slices from 12-month-old Ki91 and WT mice using. Increased phosphorylation of neurofilaments is often a sign of defective transport and maintenance also related to mitochondria. We found that both p-Nef levels (SMI-312 antibody) and non-phosphorylated Nef levels (SMI-32 antibody) were significantly increased in the cerebellum of SCA3 mice compared to WT animals (*t*-test, $p < 0.001$; $n = 3$ and five pictures per genotype; **Figures 9A–D**). In detail, we found increased levels of Nef in soma, dendrites, and axons of Purkinje cells (*t*-test, $p < 0.01$; **Figures 9A,C**). The increased level of axon-specific p-Nef was detected in axons of the molecular layer and axons of the granular





layer and white matter (t -test, $p < 0.001$; **Figures 9B,D**). The altered phosphorylation of axons in the SCA3 Ki91 model may be related to disturbed protein and mitochondria localization and their transport in axons.

DISCUSSION

Very little is known about the proteome in the SCA3 brain, and it may be one of the reasons for the incomplete understanding of the disease mechanism and delay in finding a cure. Although there are transcriptomic alterations in symptomatic SCA3 animal models, knowledge about changes in levels of the proteins is still missing (Toonen et al., 2018; Zeng et al., 2018). Moreover, we previously demonstrated the lack of transcriptomic changes in the pre-symptomatic SCA3 mice (Wiatr et al., 2019). Here, we aimed to investigate the brain profile of altered proteins in the SCA3 knock-in model to unveil a consensus set of most critical molecular programs governing the disease and identify protein biomarkers. In detail, we aimed to investigate the proteome using three different approaches: at the *in vivo* level, at the CC level, and in relation to disease progression and

severity. Once the consensus set of altered candidate processes was established, we aimed to test if we can identify their physiological fingerprints by simple, functional assays, preferably using primary presymptomatic neurons.

We first performed a longitudinal behavioral study between 4 and 18 months of age of Ki91 (Switonski et al., 2015) to establish SCA3 behavioral and phenotypic milestones suitable for the investigation of brain proteome. The first milestone in symptomatic Ki91 mice was the reduced body weight gain identified in 4-month-old animals. Statistically significant gait ataxia at 12-month-old Ki91 was the second milestone, and the last milestone was the severe motor disturbances and progression of other symptoms in 18-month-old animals. Altogether, homozygous Ki91 represents a model of SCA3 progression and gradation of symptoms observed in SCA3 patients (Coutinho and Andrade, 1978; Jacobi et al., 2015; Pulido-Valdeolivas et al., 2016; Coarelli et al., 2018).

In the next step, we determined a range of affected brain areas by the MRI and detection of ataxin-3-positive inclusions using advanced, symptomatic Ki91 animals. The inclusions were present in almost all brain areas of both the posterior and frontal brain parts. The intra-nuclear inclusions dominated

in the cerebellum, mainly in the white matter, DCN, and in pons and midbrain; however, they were also present in the cerebral cortex, hippocampus, and striatum. Importantly, we have seen highly abundant ataxin-3-positive inclusions in SMI-312-positive cerebellar axons in white matter. The intra-axonal inclusions were also previously detected in nerves and various tracts in SCA3/MJD patients (Seidel et al., 2010). Also, the changes observed by brain MRI in Ki91 were not localized to one structure, but the atrophy was spreading on several brain regions, including frontal parts, cerebellum, and brainstem. Moreover, brain areas rich in axons such as the corpus callosum are atrophied in Ki91. Therefore, exploring our behavioral, neuropathologic, and MRI results led to selecting the consensus set of brain regions for further experiments. To identify molecular SCA3 pathogenesis by our three-way proteomic approach, we selected two representative brain regions: the cerebellum and cerebellar cortex. Both regions demonstrated a high number of inclusions; particularly, the cerebellum was affected more than other brain regions. Besides, the cerebral cortex demonstrated very pronounced atrophy on MRI. Even if it was not possible to determine cerebellar volume change on MRI (technical limitation of MRI setup), our previous works detected atrophy of Purkinje cells and occurrence of reactive gliosis by immunohistochemistry (Switonski et al., 2015). Also, the behavioral motor signs indicated the involvement of cerebellum atrophy. Such a selection of brain regions for further experiments involves both classically reported SCA3 pathogenesis in the hindbrain and postulated SCA3 pathogenesis in more frontal parts of the brain (Schmidt et al., 2019; Guo J. et al., 2020).

Our first proteomic approach corresponded to Ki91 behavioral milestones where we selected tissue from animals at the age of 4 months (lack of weight gain), 10 months (mice on the verge of behavioral phenotype), 12 months (motor decline statistically significant), and 14 months (an additional symptomatic age). The second proteomic approach, called “correlative,” was aimed to identify dysregulated proteins and processes in mouse subjects with carefully characterized and matching phenotype severity. The first two proteomic approaches offered insights into the disease pathogenesis at the level of tissue and disease stage; however, the perspective of cellular level and CCs were still missing in both approaches. Therefore we employed a third, targeted proteomics approach where we separately assessed proteins in somatodendritic and axonal compartments of primary neurons isolated from embryos or pups. An additional advantage of such primary neuronal SCA3 culture is the possibility of validation if processes discovered in two other approaches may occur early in the disease development.

The first pathogenic process, which was consensus among the proteomic approaches in our work, is the disturbed energy metabolism. We demonstrated many dysregulated proteins related to the mitochondrial compartment, which corresponds with the reduced body weight gain in Ki91. Notably, the BMI of SCA3 patients is significantly lower, and BMI decrease correlated with faster disease progression (Diallo et al., 2017; Yang et al., 2018). The energy metabolism was the most common pathway, and the proteins related

to metabolism were dysregulated already in 4-month-old presymptomatic Ki91 mice. For instance, many OXPHOS-related proteins, such as Nduf subunits, Aco2, and mt-Co proteins and several metabolic proteins such as Gpd2, Cs, Gpi, Pkm, Wdr1, Sdha, Ddx1, and Aldh1l1 demonstrated altered levels and were previously identified in AD, HD, and SCA1 (Sorolla et al., 2008; Sánchez et al., 2016; Lunnon et al., 2017). Similarly, the correlative approach also revealed downregulated mitochondrial proteins such as mitochondrial chaperone Timm9, Ndufb5, and Fasn in both “mild” and “severe” phenotype, which suggest that disturbances of energy production is the primary pathology of SCA3. Several mitochondrial proteins were also depleted in axons compared to the somatodendritic compartment in SCA3 neurons, which may indicate the disrupted delivery of mitochondria to nerve terminals. The most frequently dysregulated protein, which we propose as one of a SCA3 biomarker candidate in both tested brain regions, is carbonic anhydrase 2 (Ca2). Ca2 is linked to a mechanism controlling an increased transport of lactate, which is an important energy source for neurons (Stridh et al., 2012; Karus et al., 2015).

Since many proteomic changes pointed out pathways related to energy metabolism, our first functional assay measured mitochondrial respiration and glycolysis rate in cultured cerebellar Ki91 neurons kept for DIV 3, 11, 18, and 21, which reflected the culture differentiating from young to more mature neurons. Commonly, the typical culture of such neurons and also our WT neurons represented a developing dependency on OXPHOS since mature neurons rely on OXPHOS to meet energy demands. In turn, SCA3 neurons demonstrated a lack of increase in OXPHOS dependency and even a slight drop in oxygen consumption during neuronal maturation. SCA3 neurons under stress reached their maximal OCR already as young as DIV 11 as compared to WT neurons, which reached the maximum at DIV 21. At DIV 3 and 11, SCA3 neuronal progenitors show higher overall oxygen consumption; therefore, at this early stage, the neurons may already be in deficiency of energy, or its production is aberrant. In the case of older SCA3 neurons with highly developed processes, a dramatic difference in energy metabolism compared to WT neurons can also be related to the failure of energy production in axons.

Overall, we demonstrated that the number of dysregulated proteins related to metabolism, lysosomes, endosomes, and protein folding increases with Ki91 age and is noticeably higher in older 10–14-month-old Ki91 mice, which represent the phase of the motor symptoms development. Moreover, the most advanced disease stage marked by highly reduced body weight, anxiety, and severe motor symptoms in 18-month-old animals is also characterized by the excessive size of Atxn3 inclusions and were observed both in the nuclei and axons, whereas in pre-symptomatic 2-month old SCA3 mice ataxin-3-positive aggregates were relatively smaller and detected only in cell nuclei (Wiatr et al., 2019).

Recent discoveries emphasize the role of degeneration of “wiring” between brain structures and axonal deficits as one of the main pathogenic events in neurodegenerative disorders (Sánchez-Valle et al., 2016; Ferrari Bardile et al., 2019; Casella et al., 2020). Also, in SCA3, the axonal defects and white matter

abnormalities are prominent disease symptoms (de Rezende et al., 2015; Farrar et al., 2016; Lu et al., 2017). Our proteomic approaches jointly demonstrated that the largest population of proteins with altered levels was involved in vesicular transport and endocytosis as a second consensus molecular process candidate in SCA3. Vesicular trafficking is crucial for axon maintenance, synaptic signaling, releasing, and recycling of neurotransmitters. Our proteomic data demonstrate highly downregulated levels of proteins related to vesicle transport or trans-synaptic signaling (Nrgn, Sh3gl1, Vamp2, Syngap1, Bsn, Syt7, Homer1, Rims1, Pclo, and Erc2; SNARE complex). Several vesicular Rab proteins were also dysregulated, such as Rab11b, Rab3d, and Rab10. Other Rab proteins were also dysregulated in SCA3/MJD patients (Sittler et al., 2018). Besides, there were dysregulated proteins related to protein metabolism localized to endosomes, exosomes, and lysosomes. Many of these proteins are involved in neurodegenerative diseases such as AD and HD (Skotte et al., 2018; Mendonça et al., 2019), and their loss brings significant neurological consequences (Yoo et al., 2001; Santos et al., 2017; Salpietro et al., 2019; Falck et al., 2020). Moreover, Qdpr (human homolog: DHPR) and Glul proteins responsible for neurotransmitters' metabolism are progressively downregulated throughout the SCA3 course in the Ki91 cerebellum and cortex. Both proteins are essential for proper CNS function (Breuer et al., 2019; Kurosaki et al., 2019; Zhou et al., 2019).

The 3rd consensus SCA3 candidate process was termed by us "the regulation of cytoskeletal structure and function" with dysregulated proteins localizing to neuronal processes. Coherently with vesicle trafficking, our proteomic results also revealed dysregulation of neurofilament proteins (NFs), such as heavy chain NF-H in both the cerebral cortex and cerebellum. Disturbed energy metabolism in neurons is often related to defects in the cellular cytoskeleton and phosphorylation state of NF-H, in particular, resulting in aberrant axonal transport of mitochondria (Jung et al., 2000; Shea and Chan, 2008). Furthermore, proteomic data contained dysregulated proteins pivotal for microtubular cytoskeleton stability and axon organization. Dysregulated proteins were also involved in anterograde and retrograde microtubule-based transport (Kif5c, Kif5b, Kif21a, Klc1, Klc2, and Kif3a; Dnm3, Dync1li1, Dync1h1, and Dynll2), in particular in "severe" phenotype, which may suggest that disruption of axonal transport contributes to increased severity of SCA3 symptoms. Among the microtubular proteins, Tau (Gao et al., 2018) was elevated in the cerebral cortex of symptomatic Ki91 mice, RhoG (Zinn et al., 2019), and dysregulated group of proteins that are also enriched in oligodendrocytes such as Cryab protein stabilizing cytoskeleton and previously proposed as a component of therapeutic strategy (Ghosh et al., 2007; Houck and Clark, 2010; Cox and Ecroyd, 2017; Zhu and Reiser, 2018). Dysregulation of Cryab, RhoG, Mbp, and Marcks indicates that oligodendrocytic processes and myelination contribute to axon dysfunction in SCA3 (Ishikawa et al., 2002; Guimarães et al., 2013; Zhang et al., 2017; Rezende et al., 2018). In addition, we previously identified altered levels of mRNA related to oligodendrocyte differentiation and function in older SCA3 mice (Wiatr et al., 2019). Interestingly, several oligodendrocytic marker proteins dysregulated in our proteomic

studies, such as Plp, Qdpr, Mbp, and Mog were predicted to localize in extracellular vesicles (EVs). EVs are often released by oligodendrocytes and deliver trophic support for axons but may also transfer pathogenic triggers (Krämer-Albers et al., 2007; Porro et al., 2019).

The investigation of two candidate consensus processes related to vesicle transport and neuronal cytoskeleton required a targeted proteomic approach focused on axons. The proteins that were deficient in SCA3 axons were associated with vesicles, axonal transport, and mitochondria. Depleted proteins suggesting altered transport along the axon in Ki91 included proteins interacting or forming dynactin complex, required for mitochondria and endosome/lysosome and synaptic vesicles transport along the axons, such as Actr1a and Ank2 (Holleran et al., 1996; Moughamian et al., 2013; Lorenzo et al., 2014). Besides, there were also essential cytoskeletal proteins involved in regulating axonal transport and actin dynamics, Arf6 and its interactor RhoB, targeted by Arf6 to endosomes (Eva et al., 2017; Zaoui et al., 2019). Components of SNAREs responsible for vesicular trafficking were also depleted in SCA3 axons, such as Napa (a.k.a. α -SNAP), Vti1b, and Nsf. Lower levels of Napa, Nsf, and Actr1a were also identified by the "parallel" proteomic approach in the cerebellum of Ki91 mice. Of note, Nsf is the ATPase indispensable for membrane fusion and for regenerating active SNAREs. Nsf depletion results in the arrest of membrane trafficking and, consequently, neuronal damage and death (Stenbeck, 1998; Emperador-Melero et al., 2018; Yuan et al., 2018). In particular, disturbed axonal transport may affect delivery and proper localization of mitochondria since we detected several essential mitochondrial proteins with diminished levels in Ki91 axons.

In addition to defective energy metabolism, all of our proteomic approaches identified the vesicular processes and cytoskeletal structure and regulation processes in the SCA3 Ki91 brain. In addition to vesicular and cytoskeletal localization, most dysregulated proteins identified in proteomics were predicted to localize in axons. Therefore we designed two simple assays to detect functional fingerprints of vesicular and cytoskeletal phenotypes in neurons. We decided to load the neuronal vesicles with fluorescent Rab7 protein as the universal, external marker often occurring in a variety of vesicle species. We were able to detect the accumulation of vesicles in cell bodies and in the processes of SCA3 neurons. Moreover, the vesicles were enlarged in SCA3 neuronal processes. The second assay was based on immunostaining detection of axonal cytoskeleton phosphorylation to assess a putative pathogenic process related to the axonal cytoskeleton. We used the SMI-312 antibody, an axon-specific marker (phosphorylated NFs), and detected highly increased phosphorylation in the 12-month-old Ki91 cerebellum compared to WT cerebellum. Non-phosphorylated NFs (SMI-32; pan-neuronal staining) were also increased in the SCA3 Ki91 cerebellum. Accumulation and aggregation of phosphorylated neurofilaments in axons is a biomarker indicating axonal damage, which may disturb the transport of vesicles and mitochondria. Moreover, in neurodegenerative disorders and SCA3, the NFs could serve as a biomarker (Li et al., 2019).

Lastly, axonal proteomics in Ki91 has also demonstrated highly enriched protein translation machinery represented by ribosomal proteins, various RNA-binding proteins, and translation initiation factors (**Supplementary Tables 5, 7**). Protein synthetic machinery is intensively transported to the axons in response to cellular stress (Baleriola and Hengst, 2015). We detected the signs of cellular stress by identifying elevated Tpp1 and Tmem33 proteins, which play a role in unfolded protein response (UPR) (Sakabe et al., 2015; Mukherjee et al., 2019). Along this line, protein chaperons and proteasome subunits (Cct2 and Pmsd14) were highly enriched in SCA3 Ki91 axons. Moreover, ribosomal and RNA-binding proteins are also compounds of RNP granules (mRNPs, messenger ribonucleoproteins) or stress granules, both holding mRNAs translationally repressed (Sossin and DesGroseillers, 2006; El Fatimy et al., 2016). One of the crucial components of the granules is Fxr2 (Chyung et al., 2018), which is highly enriched in Ki91 cerebellar axons. Interestingly, vesicular platforms in axons were recently identified as carriers of translation machinery, mRNPs, and structure responsible for axonal mitochondria maintenance (Cioni et al., 2019). Furthermore, it was also demonstrated that protein inclusions specifically impair the transport of endosomes and autophagosomes (Volpicelli-Daley et al., 2014; Guo W. et al., 2020). Also, locally active translation machinery and local energy production are long known phenomena in axons since it provides critical substrates even to the most distal part of the neuronal terminals. However, in the case of accumulation of the polyQ proteins, such an organization of protein synthesis in long processes may accelerate neuronal dysfunction. In such a case, upregulated translation machinery may be a “vicious cycle” for the accumulation of polyQ proteins in axons, gradually aggravating the disease and leading to profound neuronal dysfunction.

CONCLUSION

Spinocerebellar ataxia type 3 molecular disease mechanism is insufficiently explored. Ataxin-3 is ubiquitin protease, but very little is known about the broader influence of mutant protein on other proteins in the SCA3 brain. The missing knowledge about the proteome may be one of the reasons for the incomplete understanding of the disease mechanism and lack of cure. Therefore, we present the first global model picture of SCA3 disease progression based on the alterations in protein levels in the brain and embryonic SCA3 axons, combined with an *in vivo* behavioral study and neuropathology. We propose the most relevant pathogenic processes in SCA3 involving disturbed energy metabolism, impairment of the vesicular system, cell and axon structure, and altered protein homeostasis. We demonstrate that the consensus processes identified in the SCA3 Ki91 brains show their functional signs in the primary pre-symptomatic neurons, and therefore may be the first steps of pathogenesis. Our data have demonstrated for the first time that one of the essential pathogenic aspects of SCA3 is the faulty localization of proteins between axons and soma. Further signs of affected SCA3 axons are vesicle accumulation and increased

neurofilament phosphorylation. The important novel finding is the highly increased axonal localization of proteins involved in the translation machinery in SCA3. It is possible that local mutant protein production in axons may accelerate neuronal dysfunction; therefore, upregulated translation machinery in axons may aggravate the disease. Moreover, we identified a variety of molecular signatures related to mitochondria in the SCA3/MJD Ki91 model, and we show that the earliest global process which occurs already in the neonatal neurons is the OXPHOS and glycolysis deficits. For the first time, we demonstrate that the young developing SCA3 neurons fail to undergo the transition from glycolytic to OXPHOS phenotype typical for normal neurons. Summarizing, we revealed that the SCA3 disease mechanism is related to the broad influence of mutant ataxin-3 on the brain, neuronal and axonal proteome, and disruption of the proper localization of axonal and somatodendritic proteins and organelles such as vesicles, translation machinery, and mitochondria (**Figure 10**).

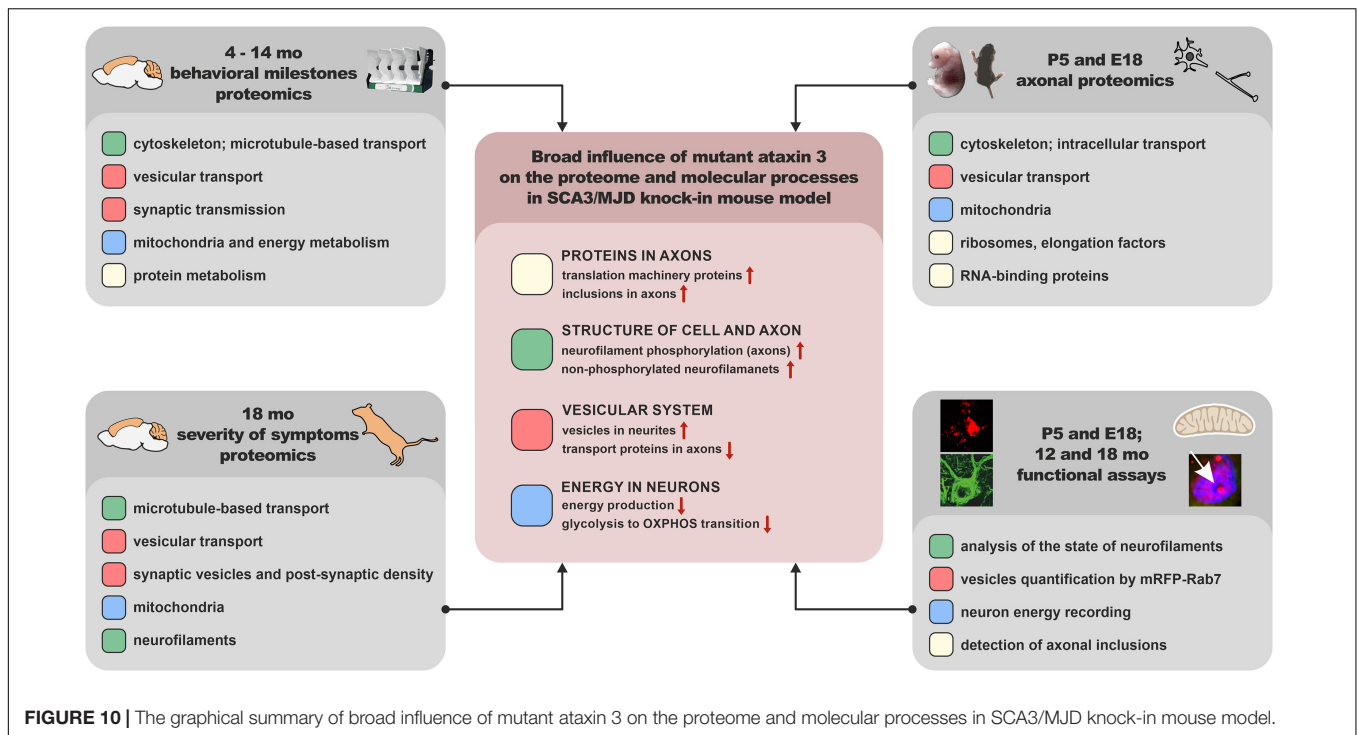
MATERIALS AND METHODS

Animals

Maintaining and breeding were performed at standard conditions with an 18/6-h light/dark cycle and water and food *ad libitum*. No differences in food or water intake between Ki91 and WT mice were observed. The animals were marked using numerical ear tags (National Band & Tag Company, Newport, RI, United States). The stress level of the animals was minimized throughout all procedures and animal handling. The animal experimentation and handling were approved and monitored by the Local Ethical Commission for Animal Experiments in Poznań. The animals were sacrificed according to AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals by placing them in the programmable CO₂ chamber (Rothacher Medical, Heitenried, Switzerland). Homozygous SCA3 Ki91 animals contained between 103 and 132 CAG repeats on a single mutant ataxin3 allele. SCA3 Ki91 mice (C57BL/6 background) and age-matched WT littermates bred in-house were used for behavioral tests ($n = 36$) and collecting brain tissues for proteomic analysis ($n = 32$, and $n = 21$, after behavioral tests), validation of proteomics ($n = 32$), MRI ($n = 12$) and immunostaining ($n = 8$, after behavioral tests and $n = 6$ from a separate cohort of 12-month-old animals). The cerebellum and cerebral cortex for proteomic analysis were collected from 4, 10, 12, 14, and 18 month-old animals, which corresponded to the timepoints of behavioral testing. An experimental group consisted of four mutant mice vs. four WT littermates (proteomics: 4, 10, 12, and 14-month-old and immunostaining), and 11 mutant mice vs. 10 WT littermates (proteomics: 18-month-old).

Behavioral Studies

Mice were trained and tested for motor deficits, starting from 4-month-old animals, and consequently every 2 months, until the age of 18-month-old in a cohort of 18 mutant mice vs. 18 WT littermates. Tests included accelerating rotarod (4–40 rpm in 9.5 min), elevated beam walk (diameter of rods: 35, 28, 21,



17, and 9 mm) as previously described (Switonski et al., 2015), and additionally in 18-month-old animals open field test in which locomotor activity and zone preferences in the experimental cage (50 cm²) were analyzed and measured during 10 min. Each test consisted of 1 training day (T) and 3 consecutive days of measurement. We also performed scoring tests designed for evaluation of the ataxia phenotype in mouse models (Guyenet et al., 2010), wire test for evaluating muscle strength, and footprint for gait ataxia. For gait analysis, the forelimbs of the mice were stained with black and hindlimbs with red non-toxic paint. Mice were placed on a sheet of paper inside a tunnel (80 × 10 cm). Only the middle part of a series of steps was measured for the distance between two steps (stride length), for- and hindlimb base, and overlapping between for- and hindlimb. All mice were weighed during each testing session. Graphing and statistics were performed on PrismVR software (San Diego, CA, United States), using ANOVA with Bonferroni *post hoc* test.

Magnetic Resonance Imaging and Image Analysis

After PFA perfusion of the mice, brains ($n = 6$ per genotype) were removed and stained by a one-week soaking in Gadolinium solution (Dotarem, Guerbet, France) in PBS at 2.5 mM. This protocol enhances the signal- and contrast-to-noise ratios on MR images of fixed brains (Dhenain et al., 2006). *Ex vivo* MRI experiments were performed on a horizontal 11.7 T Bruker scanner (Bruker, Ettlingen, Germany). A quadrature cryoprobe (Bruker, Ettlingen, Germany) was used for radiofrequency transmission and reception. Diffusion Tensor Imaging (DTI) data were acquired using Echo Planar Imaging sequence (Resolution = 100 × 100 × 200 μm³, TR = 3,000 ms,

TE = 28 ms, 60 directions). To preserve their integrity and avoid deformations, brains were kept inside skulls for *ex vivo* MRI experiments. Anatomical images were co-registered in the same space to create a study template. Transformations to match the study template to an atlas composed of a high-resolution template and a map of region's labels adapted from the Allen mouse brain Atlas (Lein et al., 2007) were calculated. Finally, transformations to match the study template and labels to each anatomic image were calculated. The automated segmentation pipeline was performed using an in-house python library (Samma-MRI¹).

Protein Sample Preparation

Protein extraction was performed as previously described (Wiatr et al., 2019). Mouse brain tissues were homogenized with a Mixer Mill MM400 (Retch, Haan, Germany), followed by a threefold cycle of freezing and thawing and bath sonication (3 × 3-min). Protein concentration was estimated using Quant kit (GE Healthcare, Chicago, IL, United States). Ten-microgram aliquots of proteins were diluted with 15 μl of 50 mM NH₄HCO₃ and reduced with 5.6 mM DTT for 5 min at 95°C. Samples were then alkylated with 5 mM iodoacetamide for 20 min in the dark at RT. Subsequently, the proteins were digested with 0.2 μg of sequencing-grade trypsin (Promega, Madison, WI, United States) overnight at 37°C.

Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry

The analysis of the proteome was performed with the use of Dionex UltiMate 3000 RSLC nanoLC system connected to

¹<https://github.com/samma-mri/samma-mri>

the Q Exactive Orbitrap mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, United States). Peptides derived from in-solution digestion were separated on a reverse-phase Acclaim PepMap RSLC nanoViper C18 column (75 $\mu\text{m} \times 25 \text{ cm}$, 2 μm granulation) using acetonitrile gradient (from 4 to 60%, in 0.1% formic acid) at 30°C and a flow rate of 300 nL/min (for 230 min). The spectrometer was operated in data-dependent MS/MS mode with survey scans acquired at a resolution of 70,000 at m/z 200 in MS mode and 17,500 at m/z 200 in MS2 mode. Spectra were recorded in the scanning range of 300–2,000 m/z in the positive ion mode. Higher energy collisional dissociation (HCD) ion fragmentation was performed with normalized collision energies set to 25. Swiss-Prot mouse database was used for protein identification with a precision tolerance set to 10 ppm for peptide masses and 0.08 Da for fragment ion masses. Raw data obtained for each dataset were processed by MaxQuant 1.5.3.30 version for protein identification and quantification. Protein was considered as successfully identified if the Andromeda search engine found at least two peptides per protein, and a peptide score reached the significance threshold $\text{FDR} = 0.01$.

Obtained data were exported to Perseus software ver. 1.6.1.3 (part of MaxQuant package; Munich, Germany). Numeric data were transformed to a logarithmic scale, and each sample was annotated with its group affiliation. Proteins only identified by site, reverse database hits, and contaminants were removed from the results. Next, data were filtered based on valid values for proteins. Proteins that contained valid values in 75% of samples in at least one group were included as valid hits. Before statistical analysis, normalization of data was performed by subtracting the median from each value in a row. A two-sample t -test was performed on analyzed sample data with p -value < 0.05 was considered as significant, and differentiating proteins were normalized using the Z -score algorithm for the hierarchical clustering of data.

Bioinformatic Analysis of Proteomic Data

Proteins were grouped using the CPDB according to the pathways (pathway enrichment p -value cut-off < 0.01), GO term by molecular function (MF), biological process (BP), and cellular component (GO term B, MF level 5, CC level 4 and 5, p -value cut-off < 0.01). CPDB integrates data from 30 different resources, including such databases as Reactome, KEGG, and BioCarta (Kamburov et al., 2013). Next, common pathways and GO terms for four datasets separately in both tissues (4, 10, 12, and 14 months of age) containing the highest relative number of dysregulated proteins and p -values were selected. The relative number of dysregulated proteins was calculated as a number of dysregulated proteins involved in the pathway or GO term divided by the total number of dysregulated proteins in a given dataset (%). For each analysis, the names of genes corresponding to the names of dysregulated proteins were used. In the separate analysis, we performed identification of cell types in the brain, which are affected by pathogenesis with the use of the Dropviz tool (Saunders et al., 2018) for the cerebellum and cerebral cortex. Significantly dysregulated ($p < 0.05$) proteins identified from label-free proteomic and experiments were included together into two tissue groups based on origin from the cerebellum

and cortex. Relative expression is presented in Dropviz as the number of transcripts per 100,000 in the cluster. The analysis of proteins displaying altered ratio between axon and soma in cerebellar and cortical neurons of Ki91 mice was performed using the String database² and clustering tool (MCL clustering, inflation parameter = 6).

Vacuum Dot Immunoblot

Before use in the dot blot assay, each antibody was validated with western blot assay (WB). WB was performed as previously described (Wiatr et al., 2019). Cerebellum and cortex samples were harvested from 16 homozygous Ki91 animals and 16 WT littermates; $n = 4$ mice per tested age (4, 10, 14, and 18 months of age) and per each genotype. The protein concentration was estimated using a Pierce BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, United States). The nitrocellulose membrane and Whatman filters (all GE Healthcare, Chicago, IL, United States) were washed two times with Milli-Q H₂O and two times with Tris-Buffered Saline (TBS) by vacuum filtration. A total of 2.5 μg of each protein sample in 50 μL of PB lysis buffer with PMSF cocktail inhibitor (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, United States) was spotted on nitrocellulose membrane and washed two times with TBS by vacuum filtration, and then allowed to air-dry. The blots were stained with Ponceau S solution and blocked with 5% non-fat milk in PBS/0.05% Tween-20 for 1 h at RT and subsequently incubated at 4°C overnight with the following primary antibodies: rabbit anti-MBP (1:1,000; Cell Signaling, Danvers, MA, United States), mouse anti-CRYAB (1:1,000; Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa City, IA, United States), mouse anti-GLUL (1:1,000; BioLegend, San Diego, CA, United States), rabbit anti-CA2 (1:2,000; ProteinTech, Rosemont, IL, United States), rabbit anti-QDPR (1:2,000; ProteinTech, Rosemont, IL, United States). The blots were probed with the respective HRP-conjugated secondary antibody (anti-rabbit or anti-mouse, 1:2,000; Jackson Immuno Research, Suffolk, United Kingdom). The immunoreaction was detected using the ECL substrate (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, United States).

Primary Neuron Culture and Transfection

Primary neuron cultures were derived from Ki91 and C57 mice according to AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals. Cortices were dissected from E18 mouse embryos and cerebella from P5 pups. Cortical neurons were dissociated by trypsin (Merck, Darmstadt, Germany) diluted 10 \times , and cerebellar neurons were dissociated by trypsin diluted 5 \times . Cells were washed two times in a disassociation medium consisting of HBSS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, United States), supplemented with 0.1% glucose, 1 \times penicillin-streptomycin (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, United States), then two times in a plating medium consisting of Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), 1 \times CTS GlutaMAX-I supplement, 1 \times penicillin-streptomycin (all Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, United States). Clumps of tissue debris were allowed to settle to the bottom of a 15 ml tube, and the supernatant containing

²<https://string-db.org/>

dissociated cells was centrifuged for 3 min at 1,300 rpm. Cells were seeded onto coverslips, tissue culture inserts (Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Austria), or Seahorse XFp Cell Culture Miniplates (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, United States) coated with poly-D-lysine (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, United States). Neurons were maintained in conditioned Neurobasal medium (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, United States) supplemented with 2% B27 supplement, 1× CTS GlutaMAX-I supplement, 1× penicillin-streptomycin (all Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, United States), 1× apo-transferrin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, United States), and N2 (0.005 mg/ml insulin, 0.0161 mg/ml putrescin, 30 nM Na-Selenite, 51 nM T3, 20 nM progesterone) in a humidified incubator with 5% O₂ and 5% CO₂ in air at 37°C. The maintenance medium was replenished with half-feed changes every 2–3 days. For transfection, cells were seeded at a density of 2×10^5 cells/well onto coverslips in 24-well culture plates. Neurons were transfected at DIV 3–4 with mRFP-Rab7 (Addgene plasmid # 14436³; dgene_14436) at a concentration of 0.8 μg DNA per well using Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, United States) followed by fixation (4% PFA, 15 min in RT) and confocal imaging at DIV 7–11 from three biological replicates and five independent transfections. An approximately 10–15% transfection efficiency was achieved.

Isolation of Axons

Dissociated neurons (cortical and cerebellar) were seeded at a density of 1×10^6 cells/well onto tissue culture inserts containing porous membrane (1 μm pores; Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Austria) in a 6-well cell culture plates. The bottom compartment medium was supplemented with 15 ng/ml of BDNF (PeproTech, London, United Kingdom) so that it could act as a chemoattractant for axons growing through the insert membrane. Axonal fraction and the fraction containing neuronal body with dendrites were isolated by carefully detaching the cellular contents from the inner and outer insert membrane surface with a cell scraper in TAEB buffer (Merck, Darmstadt, Germany) four times, alternating the direction by 90° each time. Axons were collected after 11 days in culture because, after DIV14, dendrites, which grow at a slower rate, are also detected on the other side of the porous membrane. Before isolation of the axon part, the inner membrane surface was scrubbed with a cotton-tipped applicator, and the membranes were cut out from the insert. To examine whether the separation of axons from the somatodendritic part was correctly performed, we also immunostained culture filters isolated from the Boyden chamber before and after scraping off the cell bodies, with immunofluorescence assay (β-III-tubulin, 1:500; Burlington, MA, United States) and nuclear dye Hoechst (**Supplementary Figures 5A,B**). The presence of axons on the outer site of the membrane was examined, and the purity of the obtained axonal fraction was evaluated with nuclear and axonal markers (**Supplementary Table 3**). The axon isolation procedures were adapted from Unsain et al. (2014).

³<http://n2t.net/addgene:14436>

Seahorse XFp Cell Energy Phenotype Test

Seahorse XFp Cell Energy Phenotype assays (Seahorse, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, United States) were performed according to the manufacturer's instructions on an XFp instrument. Dissociated cerebellar neurons were seeded at a density of 5,300 or 12,500 cells/well onto culture mini plates with the protocol described in the section "Primary neuron culture and transfection." The assays were performed at DIV3, 11, 18, and 21. On the day of assay, the XF assay medium was supplemented with 25 mM glucose, 0.5 mM pyruvate, and 2 mM glutamine, and the pH adjusted to 7.4. After assay performance, cells were lysed with PB1× buffer, and protein concentration was measured, and the obtained values were used for data normalization. Data analysis was performed using the Seahorse XFe Wave software and the Seahorse XF Cell Energy Phenotype Test Report Generator. The baseline OCR/ECAR ratio was higher than 4 only in DIV3, which means that the stressed ECAR parameter, in this case, may include both glycolysis and mitochondrial activity.

Immunofluorescence Staining

The animals were deeply anesthetized and transcardially perfused using saline, followed by 4% PFA. The brains were removed, post-fixed in 4% PFA for 48 h, and cryopreserved with graded sucrose (10–20–30%) over 72 h. The 20 or 30-μm parasagittal mouse brain sections were cut using a cryostat at –20°C and collected on SuperFrost Plus slides (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, United States). The sections were processed immediately. The HIER procedure was applied by incubation of the sections in citrate buffer (pH 9.0) for 30 min at 60°C. The sections were blocked via incubation in 4% normal goat serum in TBS for 1 h. For immunofluorescent staining, the sections were incubated overnight at 4°C with the primary mouse anti-ataxin-3 antibody 1H9 (1:200; kindly provided by Yvon Trottier), rabbit anti-ataxin-3 (1:200; ProteinTech, Rosemont, IL, United States), rabbit anti-ubiquitin (1:500; Z0458, Dako, Jena, Germany), mouse SMI-32 against non-phosphorylated heavy and medium neurofilament subunits (1:1,000) and mouse SMI-312 against phosphorylated heavy and medium neurofilaments (1:1,000) (Biolegends, San Diego, CA, United States), and subsequently with the anti-mouse or anti-rabbit antibody labeled by AlexaFluor488, Dylight594, or AlexaFluor647 (1:400; Jackson ImmunoResearch; Suffolk, United Kingdom). The sections were end-stained with Hoechst 33342 (Sigma) nuclear stain at 1:1,000 and embedded in Fluoroshield (Sigma) mounting medium.

Image Acquisition and Quantification

Confocal images were acquired using two microscope systems. The first system was Opera LX (PerkinElmer) using 40× water objective, 200 ms exposure time, and 50–70% laser power. For each picture, 25–50 confocal sections were collected, from which 10 sections were dissected for further analysis. The second system was TCS SP5 II (Leica Microsystems; Poland), using oil immersion 63× objective with a sequential acquisition setting. For fluorescent quantification, images were acquired using the

same settings at a resolution of 1024×1024 pixels and 100 Hz. Confocal sections (8–10) were acquired to a total Z-stack thickness of $0.13 \mu\text{m}$. For each condition, we performed three independent cultures; and five independent transfections from which 46 pictures of Ki91 and 33 pictures of WT were collected and analyzed. For analyzing the state of mrFp-Rab7+ vesicles in fixed neurons, we selected axons, which were distinguished from dendrites based on known morphological characteristics: greater length and sparse branching (Banker and Cowan, 1979). For immunostaining of mouse brains, we used four slices, and randomly acquired from each slice, ≥ 5 fields were. Offline analysis of the image Z-stack was performed using the open-source image-processing package Fiji/ImageJ. Morphometric measurements were performed using Fiji/ImageJ. Measured data were imported into Excel software for analysis. The thresholds in all images were set to similar levels. Data were obtained from at least three independent experiments, and the number of cells or imaging sections used for quantification is indicated in the figures. All statistical analyses were performed using the Student's *t*-test and are presented as mean \pm SEM.

Statistical Analysis

The data regarding behavioral experiments were subjected to a two-way ANOVA, followed by Bonferroni post-tests. *p*-values of less than 0.05 were considered significant. Identification of proteins on raw proteomic data was performed by the Andromeda search engine in Mascot using the following inclusion criteria: at least two different peptides per protein were identified per sample, and a total peptide score reached the significance threshold FDR = 0.01. Identified proteins matching the inclusion criteria were subjected to further statistical analysis with a two-sample *t*-test, and dysregulation of protein level reaching *p*-value < 0.05 was considered as significant. Kruskal–Wallis test was used to perform a score assessment in the 0–5 scale of mild, moderate, and severe phenotype in 18-month-old animals (*p*-value < 0.05).

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets presented in this study can be found in online repositories. The names of the repository/repositories and accession number(s) can be found below: PRIDE, PXD024945.

ETHICS STATEMENT

The animal study was reviewed and approved by the Local Ethical Committee for Animal Experiments in Poznań.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MF was responsible for the research concept and obtaining funding, conceived, designed, and supervised all experiments, and analyzed the data. KW and ŁM performed all proteomic experiments. KW analyzed the data, designed and performed

all experiments except of MRI. EB, J-BP, and JF performed the MRI experiment and analyzed the data. MF and KW wrote the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This work was supported by the grant from the National Science Centre (grant number 2013/10/E/NZ4/00621), the European Research Projects On Rare Diseases (JTC 2017) grant from the National Centre for Research and Development (grant numbers: ERA-NET-E-RARE-3/III/TreatPolyQ/08/2018 and ERA-NET-E-RARE-3/III/SCA-CYP/09/2018), and a grant of Polish Ministry of Science and Higher Education for young scientists GM_KW_ICHB.

ACKNOWLEDGMENTS

Proteomic mass spectrometry analyses were performed in the Laboratory of Mass Spectrometry (European Centre for Bioinformatics and Genomics; ECBiG; IBCH, PAS, Poznań, Poland). Confocal imaging was performed using the facilities in the Laboratory of Subcellular Structures Analysis and Laboratory of Molecular Assays (IBCh, PAS, Poland). Primary neuron cultures were maintained in the Cell and Tissue Culture Laboratory (IBCh, PAS, Poland). We thank Adam Plewinski for his help in maintaining the colonies of mice. We also thank Joanna Mieloch for help in maintaining the animals. We also thank Magdalena Surdyka and Łukasz Przybył for collecting tissues, which were sent for MRI. We also thank Yvon Trotter for kindly providing anti-ataxin-3 1H9 antibody and Ari Helenius for supplying mRFP-Rab7 plasmid via Addgene (#14437). We also thank Chengbiao Wu and Ruinan Shen for help with the analysis of Rab-7 transfection in Fiji. We also thank Krzysztof Sobczak for kindly providing a vacuum dot-blot apparatus.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnmol.2021.658339/full#supplementary-material>

Supplementary Table 1 | MS/MS proteomic data for each tested age (4, 10, 12, and 14-month-old) in the parallel approach in the cerebellum.

Supplementary Table 2 | MS/MS proteomic data for each tested age (4, 10, 12, and 14-month-old) in the parallel approach in the cerebral cortex.

Supplementary Table 3 | MS/MS proteomic data for 18-month-old Ki91 cerebellum and cortex in the correlative approach.

Supplementary Table 4 | MS/MS proteomic data for the of protein levels in somatodendritic and axon compartment in cerebellar and cortical samples.

Supplementary Table 5 | Proteins depleted in Ki91 cerebellar axons.

Supplementary Table 6 | Proteins enriched in Ki91 cerebellar axons.

Supplementary Table 7 | Proteins depleted in Ki91 cortical axons.

Supplementary Table 8 | Proteins enriched in Ki91 cortical axons.

REFERENCES

- Baleriola, J., and Hengst, U. (2015). Targeting axonal protein synthesis in neuroregeneration and degeneration. *Neurotherapeutics* 12, 57–65. doi: 10.1007/s13311-014-0308-8
- Banker, G. A., and Cowan, W. M. (1979). Further observations on hippocampal neurons in dispersed cell culture. *J. Comp. Neurol.* 187, 469–493. doi: 10.1002/cne.901870302
- Bettencourt, C., and Lima, M. (2011). Machado-Joseph disease: from first descriptions to new perspectives. *Orphanet J. Rare Dis.* 6:35. doi: 10.1186/1750-1172-6-35
- Breuer, M., Guglielmi, L., Zielonka, M., Hemberger, V., Kölker, S., Okun, J. G., et al. (2019). QDPR homologues in Danio rerio regulate melanin synthesis, early gliogenesis, and glutamine homeostasis. *PLoS One* 14:e0215162. doi: 10.1371/journal.pone.0215162
- Casella, C., Lipp, I., Rosser, A., Jones, D. K., and Metzler-Baddeley, C. (2020). A critical review of white matter changes in Huntington's disease. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 35, 1302–1311. doi: 10.1002/mds.28109
- Chen, L., Stone, M. C., Tao, J., and Rolls, M. M. (2012). Axon injury and stress trigger a microtubule-based neuroprotective pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 11842–11847. doi: 10.1073/pnas.1121180109
- Chyung, E., LeBlanc, H. F., Fallon, J. R., and Akins, M. R. (2018). Fragile X granules are a family of axonal ribonucleoprotein particles with circuit-dependent protein composition and mRNA cargos. *J. Comp. Neurol.* 526, 96–108. doi: 10.1002/cne.24321
- Cioni, J.-M., Lin, J. Q., Holtermann, A. V., Koppers, M., Jakobs, M. A. H., Azizi, A., et al. (2019). Late endosomes act as mRNA translation platforms and sustain mitochondria in axons. *Cell* 176, 56.e15–72.e15. doi: 10.1016/j.cell.2018.11.030
- Coarelli, G., Brice, A., and Durr, A. (2018). Recent advances in understanding dominant spinocerebellar ataxias from clinical and genetic points of view. *Frontiers Research* 7:F1000FacultyRev-1781. doi: 10.12688/f1000research.15788.1
- Coutinho, P., and Andrade, C. (1978). Autosomal dominant system degeneration in Portuguese families of the Azores Islands. A new genetic disorder involving cerebellar, pyramidal, extrapyramidal and spinal cord motor functions. *Neurology* 28, 703–709.
- Cox, D., and Ecroyd, H. (2017). The small heat shock proteins α B-crystallin (HSPB5) and Hsp27 (HSPB1) inhibit the intracellular aggregation of α -synuclein. *Cell Stress Chaperones* 22, 589–600. doi: 10.1007/s12192-017-0785-x
- Da Silva, J. D., Teixeira-Castro, A., and Maciel, P. (2019). From pathogenesis to novel therapeutics for spinocerebellar ataxia type 3: evading potholes on the way to translation. *Neurotherapeutics* 16, 1009–1031. doi: 10.1007/s13311-019-00798-1
- D'Abreu, A., França, M., Appenzeller, S., Lopes-Cendes, I., and Cendes, F. (2009). Axonal dysfunction in the deep white matter in Machado-Joseph disease. *J. Neuroimaging Off. J. Am. Soc. Neuroimaging* 19, 9–12. doi: 10.1111/j.1552-6569.2008.00260.x
- de Rezende, T. J. R., D'Abreu, A., Guimarães, R. P., Lopes, T. M., Lopes-Cendes, I., Cendes, F., et al. (2015). Cerebral cortex involvement in Machado-Joseph disease. *Eur. J. Neurol.* 22, e23–e24. doi: 10.1111/ene.12559
- Dhenain, M., Delatour, B., Walczak, C., and Volk, A. (2006). Passive staining: a novel ex vivo MRI protocol to detect amyloid deposits in mouse models of Alzheimer's disease. *Magn. Reson. Med.* 55, 687–693. doi: 10.1002/mrm.20810
- Diallo, A., Jacobi, H., Schmitz-Hübsch, T., Cook, A., Labrum, R., Durr, A., et al. (2017). Body mass index decline is related to spinocerebellar ataxia disease progression. *Mov. Disord. Clin. Pract.* 4, 689–697. doi: 10.1002/mdc3.12522
- El Fatimy, R., Davidovic, L., Tremblay, S., Jaglin, X., Dury, A., Robert, C., et al. (2016). Tracking the fragile X mental retardation protein in a highly ordered neuronal ribonucleoproteins population: a link between stalled polyribosomes and RNA granules. *PLoS Genet.* 12:e1006192. doi: 10.1371/journal.pgen.1006192
- Emperador-Melero, J., Huson, V., van Weering, J., Bollmann, C., Fischer, von Mollard, G., et al. (2018). Vti1a/b regulate synaptic vesicle and dense core vesicle secretion via protein sorting at the Golgi. *Nat. Commun.* 9:3421. doi: 10.1038/s41467-018-05699-z
- Eva, R., Koseki, H., Kanamarlapudi, V., and Fawcett, J. W. (2017). EFA6 regulates selective polarised transport and axon regeneration from the axon initial segment. *J. Cell Sci.* 130, 3663–3675. doi: 10.1242/jcs.207423
- Falck, J., Bruns, C., Hoffmann-Conaway, S., Straub, I., Plautz, E. J., Orlando, M., et al. (2020). Loss of piccolo function in rats induces cerebellar network dysfunction and pontocerebellar hypoplasia Type 3-like phenotypes. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 40, 2943–2959. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2316-19.2020
- Farrar, M. A., Vucic, S., Nicholson, G., and Kiernan, M. C. (2016). Motor cortical dysfunction develops in spinocerebellar ataxia type 3. *Clin. Neurophysiol. Off. J. Int. Fed. Clin. Neurophysiol.* 127, 3418–3424. doi: 10.1016/j.clinph.2016.09.005
- Ferrari Bardile, C., Garcia-Miralles, M., Caron, N. S., Rayan, N. A., Langley, S. R., Harmston, N., et al. (2019). Intrinsic mutant HTT-mediated defects in oligodendroglia cause myelination deficits and behavioral abnormalities in Huntington disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 116, 9622–9627. doi: 10.1073/pnas.1818042116
- Gao, Y.-L., Wang, N., Sun, F.-R., Cao, X.-P., Zhang, W., and Yu, J.-T. (2018). Tau in neurodegenerative disease. *Ann. Transl. Med.* 6:175. doi: 10.21037/atm.2018.04.23
- Ghosh, J. G., Houck, S. A., and Clark, J. I. (2007). Interactive sequences in the stress protein and molecular chaperone human α B crystallin recognize and modulate the assembly of filaments. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39, 1804–1815. doi: 10.1016/j.biocel.2007.04.027
- Graves, T. D., and Guiloff, R. J. (2011). SCA3 presenting as an isolated axonal polyneuropathy. *Arch. Neurol.* 68, 653–655. doi: 10.1001/archneurol.2011.86
- Guimarães, R. P., D'Abreu, A., Yasuda, C. L., França, M. C., Silva, B. H. B., Cappabianco, F. A. M., et al. (2013). A multimodal evaluation of microstructural white matter damage in spinocerebellar ataxia type 3. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 28, 1125–1132. doi: 10.1002/mds.25451
- Guo, J., Chen, H., Biswal, B. B., Guo, X., Zhang, H., Dai, L., et al. (2020). Gray matter atrophy patterns within the cerebellum-neostriatum-cortical network in SCA3. *Neurology* 95, e3036–e3044. doi: 10.1212/WNL.00000000000010986
- Guo, W., Stoklund Dittlau, K., and Van Den Bosch, L. (2020). Axonal transport defects and neurodegeneration: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Semin. Cell Dev. Biol.* 99, 133–150. doi: 10.1016/j.semcdb.2019.07.010
- Guyenet, S. J., Furrer, S. A., Damian, V. M., Baughan, T. D., Spada, A. R. L., and Garden, G. A. (2010). A simple composite phenotype scoring system for evaluating mouse models of cerebellar ataxia. *JoVE J. Vis. Exp.* 39:e11787. doi: 10.3791/11787
- Holleran, E. A., Tokito, M. K., Karki, S., and Holzbaur, E. L. (1996). Centractin (ARP1) associates with spectrin revealing a potential mechanism to link dynactin to intracellular organelles. *J. Cell Biol.* 135, 1815–1829. doi: 10.1083/jcb.135.6.1815
- Houck, S. A., and Clark, J. I. (2010). Dynamic subunit exchange and the regulation of microtubule assembly by the stress response protein human α B crystallin. *PLoS One* 5:e11795. doi: 10.1371/journal.pone.0011795
- Ishikawa, Y., Katoh, H., Nakamura, K., Mori, K., and Negishi, M. (2002). Developmental changes in expression of small GTPase RhoG mRNA in the rat brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 106, 145–150. doi: 10.1016/s0169-328x(02)00413-8
- Jacobi, H., du Montcel, S. T., Bauer, P., Giunti, P., Cook, A., Labrum, R., et al. (2015). Long-term disease progression in spinocerebellar ataxia types 1, 2, 3, and 6: a longitudinal cohort study. *Lancet Neurol.* 14, 1101–1108. doi: 10.1016/S1474-4422(15)00202-1
- Jung, C., Yabe, J. T., Lee, S., and Shea, T. B. (2000). Hypophosphorylated neurofilament subunits undergo axonal transport more rapidly than more extensively phosphorylated subunits in situ. *Cell Motil. Cytoskeleton* 47, 120–129. doi: 10.1002/1097-0169(200010)47:2<120::AID-CM3<3.0.CO;2-6
- Kamburov, A., Stelzl, U., Lehrach, H., and Herwig, R. (2013). The ConsensusPathDB interaction database: 2013 update. *Nucleic Acids Res.* 41, D793–D800. doi: 10.1093/nar/gks1055
- Karus, C., Ziemens, D., and Rose, C. R. (2015). Lactate rescues neuronal sodium homeostasis during impaired energy metabolism. *Channels Austin Tex* 9, 200–208. doi: 10.1080/19336950.2015.1050163
- Kevenaar, J. T., and Hoogenraad, C. C. (2015). The axonal cytoskeleton: from organization to function. *Front. Mol. Neurosci.* 8:44. doi: 10.3389/fnmol.2015.00044
- Krämer-Albers, E.-M., Bretz, N., Tenzer, S., Winterstein, C., Möbius, W., Berger, H., et al. (2007). Oligodendrocytes secrete exosomes containing major myelin

- and stress-protective proteins: Trophic support for axons? *Proteomics Clin. Appl.* 1, 1446–1461. doi: 10.1002/prca.200700522
- Kurosaki, H., Yamaguchi, K., Man-Yoshi, K., Muramatsu, S.-I., Hara, S., and Ichinose, H. (2019). Administration of tetrahydrobiopterin restored the decline of dopamine in the striatum induced by an acute action of MPTP. *Neurochem. Int.* 125, 16–24. doi: 10.1016/j.neuint.2019.02.005
- Lein, E. S., Hawrylycz, M. J., Ao, N., Ayres, M., Bensinger, A., Bernard, A., et al. (2007). Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature* 445, 168–176. doi: 10.1038/nature05453
- Li, Q.-F., Dong, Y., Yang, L., Xie, J.-J., Ma, Y., Du, Y.-C., et al. (2019). Neurofilament light chain is a promising serum biomarker in spinocerebellar ataxia type 3. *Mol. Neurodegener.* 14:39. doi: 10.1186/s13024-019-0338-0
- Liao, Y., Tong, L., Tang, L., and Wu, S. (2017). The role of cold-inducible RNA binding protein in cell stress response. *Int. J. Cancer* 141, 2164–2173. doi: 10.1002/ijc.30833
- Lorenzo, D. N., Badea, A., Davis, J., Hostettler, J., He, J., Zhong, G., et al. (2014). A PIK3C3-ankyrin-B-dynactin pathway promotes axonal growth and multiorganelle transport. *J. Cell Biol.* 207, 735–752. doi: 10.1083/jcb.201407063
- Lu, M.-K., Chen, J.-C., Chen, C.-M., Duann, J.-R., Ziemann, U., and Tsai, C.-H. (2017). Impaired cerebellum to primary motor cortex associative plasticity in Parkinson's disease and spinocerebellar ataxia type 3. *Front. Neurol.* 8:445. doi: 10.3389/fneur.2017.00445
- Lunnon, K., Keohane, A., Pidsley, R., Newhouse, S., Riddoch-Contreras, J., Thubron, E. B., et al. (2017). Mitochondrial genes are altered in blood early in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 53, 36–47. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2016.12.029
- Mazzucchelli, S., De Palma, A., Riva, M., D'Urzo, A., Pozzi, C., Pastori, V., et al. (2009). Proteomic and biochemical analyses unveil tight interaction of ataxin-3 with tubulin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41, 2485–2492. doi: 10.1016/j.biocel.2009.08.003
- McLoughlin, H. S., Moore, L. R., and Paulson, H. L. (2020). Pathogenesis of SCA3 and implications for other polyglutamine diseases. *Neurobiol. Dis.* 134:104635. doi: 10.1016/j.nbd.2019.104635
- Mendonça, C. F., Kuras, M., Nogueira, F. C. S., Plá, I., Hortobágyi, T., Csiba, L., et al. (2019). Proteomic signatures of brain regions affected by tau pathology in early and late stages of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis.* 130:104509. doi: 10.1016/j.nbd.2019.104509
- Moughamian, A. J., Osborn, G. E., Lazarus, J. E., Maday, S., and Holzbaur, E. L. F. (2013). Ordered recruitment of dynactin to the microtubule plus-end is required for efficient initiation of retrograde axonal transport. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 33, 13190–13203. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0935-13.2013
- Mukherjee, A. B., Appu, A. P., Sadhukhan, T., Casey, S., Mondal, A., Zhang, Z., et al. (2019). Emerging new roles of the lysosome and neuronal ceroid lipofuscinoses. *Mol. Neurodegener.* 14:4. doi: 10.1186/s13024-018-0300-6
- Neves-Carvalho, A., Logarinho, E., Freitas, A., Duarte-Silva, S., Costa, M., do, C., et al. (2015). Dominant negative effect of polyglutamine expansion perturbs normal function of ataxin-3 in neuronal cells. *Hum. Mol. Genet.* 24, 100–117. doi: 10.1093/hmg/ddu422
- Orr, H. T., and Zoghbi, H. Y. (2007). Trinucleotide repeat disorders. *Annu. Rev. Neurosci.* 30, 575–621. doi: 10.1146/annurev.neuro.29.051605.113042
- Porro, C., Panaro, M. A., Lofrumento, D. D., Hasalla, E., and Trotta, T. (2019). The multiple roles of exosomes in Parkinson's disease: an overview. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 41, 469–476. doi: 10.1080/08923973.2019.1650371
- Pulido-Valdeolivas, I., Gómez-Andrés, D., Sanz-Gallego, I., Rausell, E., and Arpa, J. (2016). Patterns of motor signs in spinocerebellar ataxia type 3 at the start of follow-up in a reference unit. *Cerebellum Ataxias* 3:4. doi: 10.1186/s40673-016-0042-6
- Rezende, T. J. R., Paiva, J. L. R., de Martinez, A. R. M., Lopes-Cendes, I., Pedroso, J. L., Barsottini, O. G. P., et al. (2018). Structural signature of SCA3: from presymptomatic to late disease stages. *Ann. Neurol.* 84, 401–408. doi: 10.1002/ana.25297
- Sakabe, I., Hu, R., Jin, L., Clarke, R., and Kasid, U. N. (2015). TMEM33: a new stress-inducible endoplasmic reticulum transmembrane protein and modulator of the unfolded protein response signaling. *Breast Cancer Res. Treat.* 153, 285–297. doi: 10.1007/s10549-015-3536-7
- Salpietro, V., Malintan, N. T., Llano-Rivas, I., Spaeth, C. G., Efthymiou, S., Striano, P., et al. (2019). Mutations in the neuronal vesicular SNARE VAMP2 affect synaptic membrane fusion and impair human neurodevelopment. *Am. J. Hum. Genet.* 104, 721–730. doi: 10.1016/j.ajhg.2019.02.016
- Sánchez, I., Balagué, E., and Matilla-Dueñas, A. (2016). Ataxin-1 regulates the cerebellar bioenergetics proteome through the GSK3 β -mTOR pathway which is altered in Spinocerebellar ataxia type 1 (SCA1). *Hum. Mol. Genet.* 25, 4021–4040. doi: 10.1093/hmg/ddw242
- Sánchez-Valle, R., Monté, G. C., Sala-Llloch, R., Bosch, B., Fortea, J., Lladó, A., et al. (2016). White matter abnormalities track disease progression in PSEN1 autosomal dominant Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis. JAD* 51, 827–835. doi: 10.3233/JAD-150899
- Santos, T. C., Wierda, K., Broeke, J. H., Toonen, R. F., and Verhage, M. (2017). Early golgi abnormalities and neurodegeneration upon loss of presynaptic proteins Munc18-1, Syntaxin-1, or SNAP-25. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 37, 4525–4539. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3352-16.2017
- Saunders, A., Macosko, E. Z., Wysoker, A., Goldman, M., Krienen, F. M., Rivera, H., et al. (2018). Molecular diversity and specializations among the cells of the adult mouse brain. *Cell* 174, 1015.e16–1030.e16. doi: 10.1016/j.cell.2018.07.028
- Schmidt, J., Mayer, A. K., Bakula, D., Freude, J., Weber, J. J., Weiss, A., et al. (2019). Vulnerability of frontal brain neurons for the toxicity of expanded ataxin-3. *Hum. Mol. Genet.* 28, 1463–1473. doi: 10.1093/hmg/ddy437
- Seidel, K., den Dunnen, W. F. A., Schultz, C., Paulson, H., Frank, S., de Vos, R. A., et al. (2010). Axonal inclusions in spinocerebellar ataxia type 3. *Acta Neuropathol.* 120, 449–460. doi: 10.1007/s00401-010-0717-7
- Shea, T. B., and Chan, W. K.-H. (2008). Regulation of neurofilament dynamics by phosphorylation. *Eur. J. Neurosci.* 27, 1893–1901. doi: 10.1111/j.1460-9568.2008.06165.x
- Sittler, A., Muriel, M.-P., Marinello, M., Brice, A., den Dunnen, W., and Alves, S. (2018). Deregulation of autophagy in postmortem brains of Machado-Joseph disease patients. *Neuropathol. Off. J. Jpn. Soc. Neuropathol.* 38, 113–124. doi: 10.1111/neup.12433
- Skotte, N. H., Andersen, J. V., Santos, A., Aldana, B. I., Willert, C. W., Nørremølle, A., et al. (2018). Integrative characterization of the R6/2 mouse model of Huntington's disease reveals dysfunctional astrocyte metabolism. *Cell Rep.* 23, 2211–2224. doi: 10.1016/j.celrep.2018.04.052
- Sorolla, M. A., Reverter-Branchat, G., Tamarit, J., Ferrer, I., Ros, J., and Cabiscol, E. (2008). Proteomic and oxidative stress analysis in human brain samples of Huntington disease. *Free Radic. Biol. Med.* 45, 667–678. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.05.014
- Sossin, W. S., and DesGroseillers, L. (2006). Intracellular trafficking of RNA in neurons. *Traffic* 7, 1581–1589. doi: 10.1111/j.1600-0854.2006.00500.x
- Sowa, A. S., Martin, E., Martins, I. M., Schmidt, J., Depping, R., Weber, J. J., et al. (2018). Karyopherin α -3 is a key protein in the pathogenesis of spinocerebellar ataxia type 3 controlling the nuclear localization of ataxin-3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 115, E2624–E2633. doi: 10.1073/pnas.1716071115
- Stenbeck, G. (1998). Soluble NSF-attachment proteins. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 30, 573–577. doi: 10.1016/s1357-2725(97)00064-2
- Stridh, M. H., Alt, M. D., Wittmann, S., Heidtmann, H., Aggarwal, M., Riederer, B., et al. (2012). Lactate flux in astrocytes is enhanced by a non-catalytic action of carbonic anhydrase II. *J. Physiol.* 590, 2333–2351. doi: 10.1113/jphysiol.2011.220152
- Switonski, P. M., Szlachcic, W. J., Krzyzosiak, W. J., and Figiel, M. (2015). A new humanized ataxin-3 knock-in mouse model combines the genetic features, pathogenesis of neurons and glia and late disease onset of SCA3/MJD. *Neurobiol. Dis.* 73, 174–188. doi: 10.1016/j.nbd.2014.09.020
- Toonen, L. J. A., Overzier, M., Evers, M. M., Leon, L. G., van der Zeeuw, S. A. J., Mei, H., et al. (2018). Transcriptional profiling and biomarker identification reveal tissue specific effects of expanded ataxin-3 in a spinocerebellar ataxia type 3 mouse model. *Mol. Neurodegener.* 13:31. doi: 10.1186/s13024-018-0261-9
- Unsain, N., Heard, K. N., Higgins, J. M., and Barker, P. A. (2014). Production and isolation of axons from sensory neurons for biochemical analysis using porous filters. *J. Vis. Exp. JoVE*. 89: 51795. doi: 10.3791/51795
- Volpicelli-Daley, L. A., Gamble, K. L., Schultheiss, C. E., Riddle, D. M., West, A. B., and Lee, V. M.-Y. (2014). Formation of α -synuclein Lewy neurite-like

- aggregates in axons impedes the transport of distinct endosomes. *Mol. Biol. Cell* 25, 4010–4023. doi: 10.1091/mbc.E14-02-0741
- Wiatr, K., Piasecki, P., Marczak, Ł., Wojciechowski, P., Kurkowiak, M., Płoski, R., et al. (2019). Altered levels of proteins and phosphoproteins, in the absence of early causative transcriptional changes, shape the molecular pathogenesis in the brain of young presymptomatic K91 SCA3/MJD Mouse. *Mol. Neurobiol.* 56, 8168–8202. doi: 10.1007/s12035-019-01643-4
- Yang, J.-S., Chen, P.-P., Lin, M.-T., Qian, M.-Z., Lin, H.-X., Chen, X.-P., et al. (2018). Association between body mass index and disease severity in chinese spinocerebellar ataxia type 3 patients. *Cerebellum Lond. Engl.* 17, 494–498. doi: 10.1007/s12311-018-0929-2
- Yoo, B. C., Cairns, N., Fountoulakis, M., and Lubec, G. (2001). Synaptosomal proteins, beta-soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein (beta-SNAP), gamma-SNAP and synaptotagmin I in brain of patients with Down syndrome and Alzheimer's disease. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 12, 219–225. doi: 10.1159/000051261
- Yuan, D., Liu, C., and Hu, B. (2018). Dysfunction of membrane trafficking leads to ischemia-reperfusion injury after transient cerebral ischemia. *Transl. Stroke Res.* 9, 215–222. doi: 10.1007/s12975-017-0572-0
- Zaoui, K., Rajadurai, C. V., Duhamel, S., and Park, M. (2019). Arf6 regulates RhoB subcellular localization to control cancer cell invasion. *J. Cell Biol.* 218, 3812–3826. doi: 10.1083/jcb.201806111
- Zeng, L., Zhang, D., McLoughlin, H. S., Zalon, A. J., Aravind, L., and Paulson, H. L. (2018). Loss of the Spinocerebellar Ataxia type 3 disease protein ATXN3 alters transcription of multiple signal transduction pathways. *PLoS One* 13:e0204438. doi: 10.1371/journal.pone.0204438
- Zhang, Z.-H., Ma, F.-F., Zhang, H., and Xu, X.-H. (2017). MARCKS is necessary for oligodendrocyte precursor cell maturation. *Neurochem. Res.* 42, 2933–2939. doi: 10.1007/s11064-017-2324-7
- Zhou, Y., Dhaher, R., Parent, M., Hu, Q.-X., Hassel, B., Yee, S.-P., et al. (2019). Selective deletion of glutamine synthetase in the mouse cerebral cortex induces glial dysfunction and vascular impairment that precede epilepsy and neurodegeneration. *Neurochem. Int.* 123, 22–33. doi: 10.1016/j.neuint.2018.07.009
- Zhu, Z., and Reiser, G. (2018). The small heat shock proteins, especially HspB4 and HspB5 are promising protectants in neurodegenerative diseases. *Neurochem. Int.* 115, 69–79. doi: 10.1016/j.neuint.2018.02.006
- Zinn, A., Goicoechea, S. M., Kreider-Letterman, G., Maity, D., Awadia, S., Cedeno-Rosario, L., et al. (2019). The small GTPase RhoG regulates microtubule-mediated focal adhesion disassembly. *Sci. Rep.* 9:5163. doi: 10.1038/s41598-019-41558-7

Conflict of Interest: 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 © 2021 Wiatr, Marczak, Pérot, Brouillet, Flament and Figiel. 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) and the copyright owner(s) 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.

Titre : IRM multiparamétrique pour la recherche de biomarqueurs précoces des maladies par expansion de polyglutamine

Mots clés : Maladies neurodégénératives, IRM, thérapie génique, modèles animaux

Résumé : Les maladies par expansion de polyglutamine sont des maladies neurodégénératives héréditaires causées par l'expansion de répétitions CAG. Les récentes avancées en thérapie génique permettent d'espérer un traitement par extinction du gène muté responsable de la maladie. Cependant, la recherche est ralentie par la difficulté à évaluer l'efficacité de ces thérapies lorsqu'elles sont administrées à un stade précoce, quand les atteintes cérébrales dues aux mécanismes de pathogénèses sont encore potentiellement réversibles. La recherche de biomarqueurs non-invasifs de la phase présymptomatique des maladies par expansion de polyglutamine est ainsi un enjeu majeur pour le développement de thérapies. L'IRM offre une diversité d'applications qui permet de mesurer des paramètres morphométriques, métaboliques, microstructuraux ou encore fonctionnels dans le cerveau de patients ou de modèles animaux de ces maladies. Ce travail de thèse présente les résultats de trois études longitudinales d'IRM multiparamétrique réalisées sur des modèles rongeurs de la maladie de Huntington (MH) et de l'ataxie spinocérébelleuse de type 7 (ASC7).

La première étude sur le modèle CAG140 de la MH a montré une vulnérabilité de la matière blanche dans ce modèle, permettant une meilleure compréhension de la progression de la pathologie. La seconde étude montre les résultats d'un essai thérapeutique d'oligonucléotides antisens dans un modèle rat de la MH. Cet essai a permis de montrer l'efficacité de la thérapie mais a également pointé du doigt l'importance du contrôle des conditions expérimentales pour l'imagerie du métabolisme cérébral. La troisième étude présente un essai thérapeutique par ARN interférant dans un modèle souris d'ASC7. Les résultats montrent une réponse des souris à l'injection de vecteurs viraux, bien que l'effet bénéfique apporté spécifiquement par la thérapie nécessite plus d'investigations. Au global, ce travail de thèse démontre la pertinence de l'IRM longitudinale et multiparamétrique pour la recherche de biomarqueurs précoces des maladies par expansion de polyglutamine et propose des recommandations pour la conduite de ce type d'étude.

Title : Multiparametric MRI for the research of early biomarkers in polyglutamine diseases.

Keywords : Neurodegenerative diseases, MRI, gene therapy, animal models

Abstract : PolyQ diseases are inherited neurodegenerative diseases caused by the expansion of CAG repeats on a specific gene. While no efficient treatment has been discovered yet, recent advances in gene therapy let hope for a gene silencing treatment directly targeting the cause of the disease. However, evaluation of the efficacy of these therapies is compromised by the difficulty to evaluate the progression of the disease on early stages, while brain impairments are still reversible. Thus, the research of biomarkers of the presymptomatic phase of PolyQ diseases is a major issue for successful development of therapies. MRI is a versatile technique that proposes a diversity of applications with the ability to measure morphometric, metabolic, microstructural, or functional parameters in patients or in the brain of rodent models. In this thesis, we present the results of three longitudinal, multiparametric MRI studies on rodent models of Huntington's Disease (HD) and Spinocerebellar Ataxia type 7 (SCA7).

The first study, on CAG140 mouse model of HD, showed a vulnerability of white matter in this model, allowing a better understanding of pathogenesis. The second study shows the results of evaluation of an antisense oligonucleotide in a rat model of HD. This trial showed the efficacy of the treatment but also highlighted the necessity to perfectly control experimental conditions for robust metabolic imaging. The third study presents the evaluation of gene therapy by interfering RNA in a mouse model of SCA7. Results show a beneficial effect of injection of viral vectors, however the specific effect of gene silencing needs requires further investigation. Overall, this thesis work demonstrates the pertinence of longitudinal, multiparametric MRI for the research of early biomarkers of PolyQ diseases and provides recommendations for conducting this kind of study.