

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

**MÉMOIRE PRÉSENTÉ À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES**

**COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOPHYSIQUE ET BIOLOGIE CELLULAIRES**

**PAR
PIERRE ROBINSON**

**L'INFLUENCE D'UNE STIMULATION DU RÉCEPTEUR
DOPAMINERGIQUE D1 SUR L'AGRÉGATION DE LA
PROTÉINE HUNTINGTINE MUTANTE**

AVRIL 2008

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

REMERCIEMENTS

Depuis mon plus jeune âge, je me suis toujours intéressé à ce qui m'entoure, les animaux, les plantes et toutes les autres formes de vies constituant notre monde. C'est pourquoi je compris vite que ma curiosité serait satisfaite seulement en m'intéressant aux sciences sous tous leurs aspects. Au cours de mes études universitaires de 1^{er} cycle, j'ai effectué un stage en recherche biomédicale et je compris alors que c'était là le chemin que je voulais emprunter. J'ai pris conscience que la recherche est un domaine très stimulant et que la neuropharmacologie est quelque chose, qui maintenant, me passionne. C'est alors que j'ai débuté mes études de deuxième cycle dans les laboratoires du Dr. Michel Cyr, à l'Université du Québec à Trois-Rivières. Les recherches du Dr. Cyr sont orientées principalement sur la neuropharmacologie moléculaire du système de transmission dopaminergique dans les maladies de Parkinson et d'Huntington. Mes travaux de recherche ont porté principalement sur l'implication du système dopaminergique dans la maladie d'Huntington et il me fait grand plaisir de partager avec vous et l'ensemble de la communauté scientifique de l'Université du Québec à Trois-Rivières, les résultats obtenus durant ma maîtrise.

Je souhaite d'abord remercier toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de mon projet de recherche tout au long de ma maîtrise. Je veux tout d'abord remercier mon directeur qui m'a beaucoup aidé dans l'élaboration d'une stratégie de recherche, dans le développement de mon sens critique et pour la grande liberté offerte face aux orientations possibles de mon projet. J'ai par ailleurs effectué la totalité de la rédaction de l'article et de l'assemblage des figures sous la supervision de mon directeur de recherche. Mention spéciale pour Manon Lebel, étudiante au doctorat, qui m'a apporté une aide précieuse en réalisant une partie des analyses de type western blot présentées dans l'article. Je désire aussi remercier ma fiancée, Emmanuelle, et mon fils Noah, qui ont toujours été là à mes côtés pour me supporter et me montrer combien la famille est importante. Finalement, je veux remercier mes parents pour le grand soutien moral et financier qu'ils m'ont apporté au cours de mes études, sans quoi il m'aurait été impossible de réaliser mes objectifs. Merci de tout coeur à vous tous !

RÉSUMÉ

La chorée d'Huntington (Huntington's Disease – HD), est caractérisée comme étant une maladie génétique autosomique dominante causant une neurodégénérescence fatale. La mutation génétique responsable de cette maladie consiste en une addition de répétitions instables (> 39) du codon CAG ou CAA, codant pour l'acide aminé glutamine (Q) près de l'extrémité N-terminale du gène IT15 qui code pour la protéine *Huntingtin* (htt) de 350 KDa. La maladie se caractérise par la formation d'agrégats nucléaires et cytoplasmiques de la forme mutante de htt (exphtt) dans les neurones du striatum principalement. De plus, en présence de exphtt, il se produit une mort sélective des neurones du striatum chez l'humain. Les causes de cette vulnérabilité spécifique restent encore inexplicées. Les neurones du striatum sont de type GABAergiques (*i.e.* capable de synthétiser et libérer l'acide γ -aminobutyrique) et ont la particularité d'exprimer de façon majoritaire des récepteurs dopaminergiques à leur surface. Des études ont d'ailleurs récemment démontré que le système dopaminergique pourrait jouer un rôle la pathophysiologie et l'évolution de HD.

Dans le but d'investiguer la relation possible entre les récepteurs dopaminergiques et l'expression de exphtt, nous avons utilisé un modèle cellulaire provenant d'un neuroblastome humain, soit les cellules SK-N-MC. Ces cellules ont la particularité d'exprimer le D1R de façon endogène. Les cellules SK-N-MC ont été transfectées avec deux plasmides dont un codait pour la forme normale de la protéine htt (CAG25), et l'autre pour la forme mutante exphtt (CAG103), et étant tous deux annexée à la séquence d'une protéine de fusion « Enhanced Green Fluorescent Protein » (EGFP). Les résultats obtenus en immunofluorescence ont été réalisés dans le temps suite à un traitement avec un agoniste sélectif du récepteur dopaminergique D1 (D1R), le SKF-38393. Les résultats obtenus en immunofluorescence ont démontré que l'expression de la protéine normale htt est exprimée exclusivement dans le cytoplasme des cellules SK-N-MC. Dans les cellules transfectées avec CAG103, nous avons remarqué une forte augmentation dans le nombre d'agrégats nucléaires suite au traitement avec le SKF-38393 (10 μ M). Cet effet a été renversé par un antagoniste du D1R, le SCH-23390 (1 μ M) confirmant ainsi que l'effet obtenu est directement relié à l'activation du D1R. Dans le but de déterminer l'influence du traitement avec le SKF-38393 sur la survie cellulaire, nous avons effectué le compte des cellules

démontrant une fragmentation ou condensation de l'ADN (Hoechst-33342). Ces résultats ont par la suite été confirmés par le test MTT qui permet de déterminer que la viabilité cellulaire n'a pas été affectée par le traitement avec le SKF-38393. Ce qui démontre que l'effet obtenu est relié directement avec la stimulation du D1R. Finalement, ces résultats suggèrent qu'une diminution de la transmission dopaminergique, induite par l'utilisation d'inhibiteurs du récepteur D1, pourrait avoir des effets positifs sur l'agrégation de la protéine expht dans la maladie de HD et leur localisation.

Mots-clés

Agrégats, huntingtin, récepteur dopaminergique, forskolin, apoptose, striatum

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	ii
RÉSUMÉ	iii
TABLE DES MATIÈRES.....	v
LISTE DES FIGURES.....	vii
LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS.....	viii
CHAPITRE 1.....	1
INTRODUCTION.....	1
1.1 Généralités.....	1
1.2 La neuropathologie de HD.....	2
1.3 Le gène Huntington.....	4
1.4 La protéine htt.....	6
1.5 Modèles murins HD.....	7
1.5.1 Modèles knock-out.....	7
1.5.2 Modèles transgéniques.....	8
1.5.3 Modèles knock-in.....	9
1.6 Clivage de exphtt.....	10
1.7 Huntingtine et la formation d'agrégats nucléaires.....	12
1.8 Séquestration de facteurs de transcription.....	12
1.9 Implication du système dopaminergique.....	13
1.9.1 La signalisation dopaminergique.....	13
1.9.2 Le système dopaminergique.....	14
1.9.2 La huntingtin mutante et la dopamine.....	16
1.9.3 La souris DAT ^{-/-} /Hdh ^{Q92/Q92}	18
1.9.4 Les récepteurs dopaminergiques.....	18
CHAPITRE 2.....	20
HYPOTHÈSE DE RECHERCHE.....	20
2.1 Rationnelle et hypothèse du projet de recherche.....	20
CHAPITRE 3.....	22
Résumé	22
3.1 Abstract.....	25
3.2 Introduction.....	26
3.3 Experimental procedures.....	28

3.3.1	Cell culture and treatment	28
3.3.2	Transfection of cDNA constructs	28
3.3.3	MTT Cell Viability Test.....	28
3.3.4	Immunocytochemical analysis	29
3.3.5	Western blot analysis.....	29
3.3.6	Cell fractionation.....	30
3.3.7	Statistical Analysis	31
3.4	Results.....	32
3.4.1	Mutant htt triggers the formation of aggregates and affects cell viability in a time-dependent manner.	32
3.4.2	D1 receptor stimulation increases the formation of nuclear aggregates in mutant htt transfected cells.....	33
3.4.3	D1 receptor stimulation affects cell survival in mutant-htt transfected cells.....	35
3.4.4	Direct activation of adenylate cyclase replicates the effects of D1 receptor stimulation in mutant-htt transfected cells.	36
3.5	Discussion.....	36
3.6	Références.....	40
3.6	Figure legends.....	44
3.7	Figures	48
3.7.1	Figure 1 (A, B, C and D).....	48
3.7.2	Figure 2 (A, B and C).....	49
3.7.3	Figure 3 (A, B, C and D).....	50
3.7.4	Figure 4 (A, B, C and D).....	51
3.7.5	Figure 5 (A and B)	52
3.7.6	Figure 6 (A,B, C, and D).....	53
3.7.7	Figure 7 (A, B and C).....	54
	CHAPITRE 4.....	55
	CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	55
4.1	Discussion	55
4.2	Perspectives d'avenir	63
	BIBLIOGRAPHIE.....	66

LISTE DES FIGURES

Figure 1.2.1 Coupe coronale de cerveau humain démontrant les ganglions de la base.....	3
Figure 1.2.2 Coupe coronale d'un cerveau de patient atteint de HD (à gauche) comparé avec celui d'un individu normal (à droite).....	3
http://pathology.mc.duke.edu/neuropath/CNSlecture4/CNSlecture4.htm	
Figure 1.3.1 Graphique démontrant la corrélation entre le nombre de répétitions CAG et l'âge d'apparition des premiers signes cliniques.....	5
Figure 1.3.2 Différentes maladies neurodégénératives connues qui sont causées par une expansion de la répétition CAG présente sur certains gènes.....	6
Figure 1.6 Modèle tridimensionnel d'un agrégat contenant des fragments N-terminaux de la protéine mutante Huntingtin.....	11
www.stanford.edu/.../huntprot/f_p01protagr.jpg	
Figure 1.9.1 Mécanisme d'action de la Tétrabénazine	15
WWW.PRESTWICKPHARMA.COM/.../TETRABENAZINE.JPG	
Figure 1.9.2 Principales innervations dopaminergiques en provenance de la substance noire	16
Figure 1.9.3 Immunofluorescence d'une coupe sagittale de cerveau de rat (A) Marquage avec un anti-DARPP-32 et en (B) un anti-D1R.....	17
Figure 1.9.4 Schéma représentant la signalisation du récepteur dopaminergique D1.....	19

LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS

AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
DAT ^{-/-}	Modèle de souris knock-out pour le gène du transporteur de la dopamine (DAT)
CREB	cAMP-regulated element binding protein
DARPP-32	Dopamine and cyclic-AMP Regulated Phosphoprotein (32 KDa)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
et al.,	Plus de deux auteurs pour un même ouvrage
exph ^{tt}	Forme mutante de la protéine huntingtine
FBS	Fetal Bovine Serum
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
GAPDH	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
Hdh ^{Q92/Q92}	Modèle murin de HD avec 92 répétitions CAG
Htt	Protéine huntingtine
<i>i.e.</i>	(lat. <i>id est</i>), c'est à dire
MSN	Medium Spiny Neuron
NES	Nuclear Export Signal
NLS	Nuclear Localization Signal
PolyQ	Suite d'acide aminés amine glutamine (Q)
PolyP	Suite d'acide aminés amine proline (P)
TRITC	Tetramethyl Rhodamine Isothiocyanate

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1.1 Généralités

La maladie d'Huntington (Huntington's disease - HD) est une maladie génétique autosomique dominante causant une neurodégénérescence progressive et la mort éventuelle du patient. Au Canada, la prévalence est de 1/10,000 et le sex-ratio est approximativement de 1 homme pour 1 femme. HD affecte principalement les adultes d'âge moyen, entre 30 et 45 ans, et davantage ceux ayant des origines ethniques européennes ou caucasienne. Le décès du patient survient généralement 10 à 20 ans après l'apparition des premiers signes cliniques.

Le premier à avoir caractérisé la maladie de façon précise fut un médecin américain de l'Ohio, le Dr. George Huntington (1850-1916). Il publia en 1872 le premier article scientifique décrivant les symptômes rencontrés au cours de la maladie suite à des observations réalisées auprès de plusieurs individus provenant de familles atteintes de HD. Il démontra que la maladie se caractérise principalement par des symptômes qui sont davantage reliés à une perte du contrôle moteur volontaire. Les signes cliniques que l'on peut remarquer, dans un premier temps, sont tout d'abord des troubles affectifs se présentant par de l'agressivité et un désordre émotionnel qui est le plus souvent associé à une forte dépression. Par la suite, une perte d'inhibition motrice semble provoquer l'apparition de mouvements involontaires qui sont typiques de la maladie d'Huntington. Ces mouvements sont dits de type choréiformes (lat. *chorea*, gr. *khoreia* « danse ») et se décrivent comme étant un syndrome chronique caractérisé par des mouvements involontaires brefs, irréguliers, incessants et prédominants davantage à la base des membres (épaules, hanches) et aussi au niveau du visage (dyskinésies oro-faciales). D'autre part, un important problème de déglutition est observé, causant alors une perte de poids progressive considérable qui évolue en parallèle avec les dysfonctions motrices. Dans les stades plus avancés, cette perte de poids corporel nécessite que le patient soit intubé pour ingérer la nourriture étant donné que la déglutition est un mouvement volontaire contrôlé.

Finalement, les personnes atteintes vont subir une détérioration progressive de leur état intellectuel (i.e. mémoire, jugement) pour laisser ensuite place à la démence. Il n'existe malheureusement aucun traitement efficace pour traiter la maladie et c'est pourquoi les individus atteints vont inévitablement progresser vers une mort certaine. Plusieurs groupes de recherche tentent maintenant de mieux comprendre la maladie et les perspectives d'avenir semblent s'avérer plutôt positives.

1.2 La neuropathologie de HD

Les ganglions de la base se composent de 5 noyaux sous-corticaux soit : le noyau caudé et le putamen, le globus pallidus, les noyaux sous-thalamiques et finalement la substantia nigra. L'ensemble de ces noyaux participent dans la régulation et le contrôle de l'ensemble des mouvements volontaires du corps (Figure 1.2.1). L'idée selon laquelle les ganglions de la base seraient impliqués dans certaines maladies neurodégénératives a pris naissance suite à l'observation de cerveaux *post mortem* de patients atteints de HD et aussi de d'autres individus ayant développé la maladie de Parkinson (Parkinson's disease - PD). Ces deux affections du système nerveux central (SNC), ont toutes deux démontré des changements pathologiques au niveau des ganglions de la base. Au cours de l'évolution de HD, il existe trois types de dysfonctions motrices caractéristiques qui prédominent; (1) mouvements involontaires (chorée), (2) changement dans la posture et le tonus musculaire, et finalement, (3) lenteur des mouvements mais sans paralysie. Ces particularités ont par la suite permis de décrire HD comme étant une maladie hypotonique et hyperkinétique.

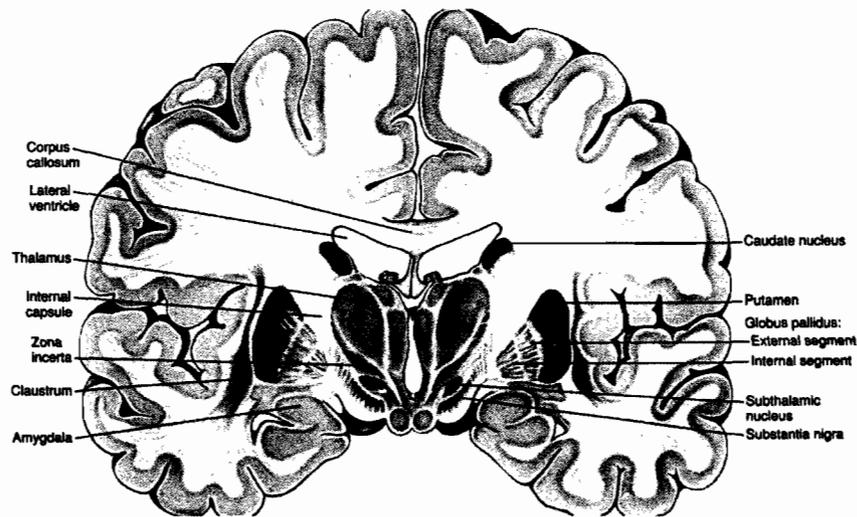


Figure 1.2.1 Coupe coronale démontrant les ganglions de la base (noyau caudé, putamen, globus pallidus, noyaux sous-thalamiques et la substance noire) et les autres structures à proximité. (Principles of Neural Science, Third edition. Fig. 42.1, p.648)

Du point de vue histologique, HD se caractérise par une dégénérescence marquée des neurones constituant le striatum qui est une structure formée par le noyau caudé et le putamen (Figure 1.2.2). De plus, cette structure est responsable de la coordination et de la fluidité des mouvements volontaires du corps. En conséquence, la perte fonctionnelle de cette structure, causée par un dérèglement cellulaire ou une mort neuronale prématurée, provoquera alors des troubles moteurs et de la coordination (dyskinésies) chez les individus atteints.

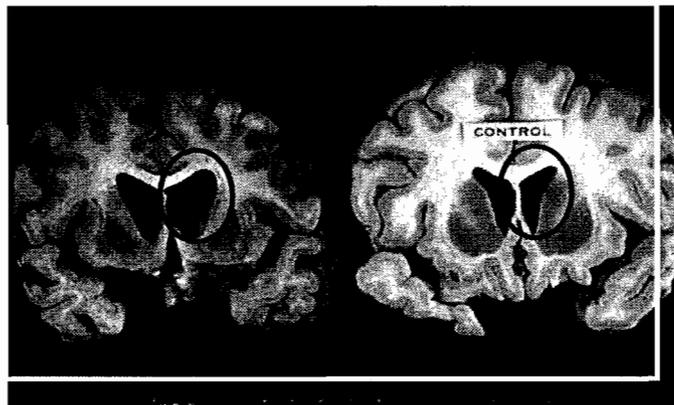


Figure 1.2.2 Coupe coronale du cerveau d'un individu normal (à droite) et d'un patient atteint de HD (à gauche). Le striatum (noyau caudé et le putamen) est encerclé en rouge sur la figure ci-dessus et permet d'observer la dégénérescence marquée du striatum chez un patient atteint de HD comparativement à un individu normal.

Dans les stades plus tardifs de la maladie, le cortex cérébral et la substance blanche sont eux aussi atteints mais de façon beaucoup moins sévère. Ces observations, peuvent ainsi expliquer en partie les déficits cognitifs et la perte du pouvoir décisionnel observé chez les patients atteints de HD.

1.3 Le gène Huntington

La recherche du gène responsable de HD a fait l'objet d'intenses efforts de la part de nombreux groupes de recherche en biologie moléculaire au cours des dernières années. Durant plus de 10 ans, des scientifiques concernés au sujet de HD se sont principalement concentrés sur l'étude d'un segment précis du chromosome 4. Le gène responsable de HD, le gène IT15 (Interest Transcript #15) a finalement été isolé en 1993, permettant ainsi d'entreprendre une étude plus approfondie sur les différents mécanismes biochimiques prenant place au cours de HD. Le gène se situe sur le bras court du chromosome 4 (4p16.3) et code pour la protéine *huntingtine* (htt), composée d'environ 3144 acides aminés et possédant un large poids moléculaire d'environ 348,000 Dalton. La mutation responsable de HD consiste en une expansion instable de la répétition CAG, codant pour l'acide aminé glutamine (Q). Cette répétition est localisée sur l'exon-1 du gène IT15 (67 exons) à l'extrémité N-terminale après le 17^e résidu d'acide aminé (1993 Huntington's Disease Research Collaborative Group). Chez les individus normaux, cette séquence est présente jusqu'à un maximum de 35 répétitions. Entre 35 et 39 répétitions CAG, la pénétrance est incomplète. Ce qui veut dire, en d'autres mots, que l'individu pourrait possiblement ne pas développer les symptômes de la pathologie. Cependant, au-delà de 40 répétitions CAG, l'individu développera inévitablement la maladie à l'âge adulte. En présence de plus de 70 répétitions, HD se manifeste avant la vingtaine et représente la forme juvénile de HD. Dans une étude collaborative réalisée entre le Venezuela et les États-Unis (The U.S.–Venezuela Collaborative Research Project, Nancy S. Wexler), il a été démontré que le nombre de répétitions CAG est inversement proportionnel à l'âge d'apparition des premiers signes cliniques de la maladie (Figure 1.3.1).

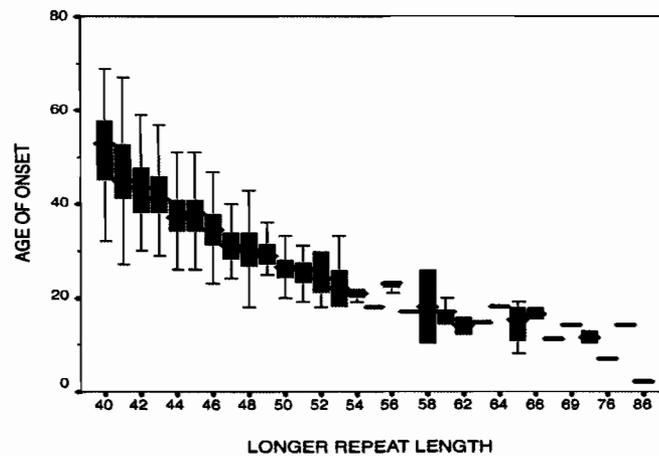


Figure 1.3.1 Graphique démontrant la corrélation entre le nombre de répétitions CAG et l'âge d'apparition des premiers signes cliniques. Par exemple, l'âge d'apparition des premiers signes cliniques diminue en fonction d'un nombre plus élevé de répétitions CAG. (The U.S.–Venezuela Collaborative Research Project, Nancy S. Wexler. 2004. PNAS)

Ces données ont permis de détecter une augmentation de la sévérité des symptômes de HD en fonction d'un plus grand nombre de répétitions CAG, comme dans le cas de la forme juvénile.

Dans une population donnée et au cours de générations successives de HD, le nombre de répétitions CAG tend à augmenter de façon significative (Rangone et al., 2004). Ce phénomène porte le nom d'anticipation génétique et est principalement dû à l'instabilité de la séquence polyglutamine (polyQ) mutante transmise d'une génération à l'autre. Jusqu'à maintenant, on peut compter 9 maladies neurodégénératives étant causées par l'expansion d'une répétition CAG présente sur certains gènes spécifiques (Figure 1.3.2). Ces gènes codent pour différentes protéines qui vont par la suite causer la dégénérescence d'un type particulier de neurones qui diffère pour chaque maladie. Par exemple, une mutation du gène codant pour le récepteur des androgènes (AR), cause l'atrophie musculaire bulbaire et spinale (SBMA), tandis qu'une expansion CAG sur le gène de la protéine atrophine-1, cause l'ataxie spino-cérébelleuse (SCA1), etc. Curieusement, ces mutations semblent être davantage reliées à des complications au niveau du contrôle moteur et aussi dans les différentes fonctions musculaires (tonus, contraction, maintien, etc.)

Disorder	Relative protein size	Protein name
Huntington's disease (HD)		Huntingtin
Spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA)		Androgen receptor
Dentatonubral-pallidoluyisian atrophy (DRPLA)		Atrophin1
Spinocerebellar ataxia 1 (SCA1)		Ataxin1
Spinocerebellar ataxia 2 (SCA2)		Ataxin2
Spinocerebellar ataxia 3 (SCA3) (Machado-Joseph disease)		Ataxin3
Spinocerebellar ataxia 6 (SCA6)		α -1A calcium channel
Spinocerebellar ataxia 7 (SCA7)		Ataxin7
Spinocerebellar ataxia 17 (SCA17)		TATA-box binding protein

Figure 1.3.2 Différentes maladies neurodégénératives connues causées par une expansion de la répétition CAG présente sur certains gènes.

1.4 La protéine htt

Depuis la découverte et le clonage du gène IT15, peu d'informations ont été obtenues relativement aux véritables fonctions de la protéine htt. Elle ne partage pas d'homologie structurale avec aucune autre protéine humaine connue jusqu'à maintenant. De plus, ses véritables fonctions restent encore aujourd'hui indéterminées. Htt est largement exprimée dans le système nerveux central (SNC) de même que dans de nombreux autres tissus et organes du corps humain comme par exemple le cœur, les poumons, le foie et les testicules (DiFiglia et al., 1995; Gutekunst et al., 1995).

À l'intérieur des cellules nerveuses, la localisation de htt est principalement cytoplasmique, à l'intérieur des dendrites, dans les varicosités et à la synapse, où elle s'associe avec de nombreuses protéines impliquées dans le transport vésiculaire ainsi que dans les processus d'exocytose et d'endocytose (Dorsman et al., 1999). Ces données ont été obtenues suite à l'utilisation des techniques d'immunofluorescence, immunohistochimie et par sub-fractions cellulaires. Tel que mentionné précédemment, la séquence d'acides aminés de htt suggère qu'elle est une protéine soluble et cytoplasmique. D'un autre côté, des fragments spécifiques de exphtt furent retrouvés à l'intérieur du noyau, contrairement à la forme complète de exphtt qui demeure principalement cytoplasmique. Cependant, de faibles concentrations de la htt, sous sa forme normale, furent aussi détectées à l'intérieur du

noyau de la cellule pour de brèves périodes de temps. Ce qui pourrait bien confirmer l'implication de la protéine dans la régulation de facteurs de transcription impliqués dans la régulation de gènes importants pour la survie cellulaire. (Kegel et al., 2002).

Htt s'avère essentielle lors du développement embryonnaire puisqu'une mort cellulaire importante se produit au niveau de l'ectoderme au jour embryonnaire 8.5 (E8.5) lors d'une délétion complète du gène IT15 dans un modèle murin (Zeitlin et al., 1995). L'absence de la protéine provoque une forte dégénérescence qui cause la mort des embryons homozygotes pour la délétion complète du gène. Ces observations ont menées à la théorie selon laquelle une perte de fonction de htt pourrait fortement contribuer dans la neuropathologie de HD (Cattaneo et al., 2001). Cependant, des études récentes suggèrent qu'un gain de fonction toxique de exphtt serait davantage impliqué (DiProspero and Tagle, 2000). Par exemple, des souris modèles de HD ayant une délétion hétérozygote du gène IT15, *i.e.* possédant un allèle mutant et un allèle nul du gène IT15, sont viables et se développent normalement. Ce qui démontre que la forme mutante de la protéine ne perd pas ses fonctions vitales durant le développement embryonnaire. Par contre, à un certain âge, ces souris vont développer des symptômes neurologiques associés à HD et vont mourir de façon prématurée. De plus, le même phénomène a pu être observé chez d'autres souris hétérozygotes (Davies et al, 1997), qui ont démontré que la forme normale de htt ne peut pallier aux effets néfastes produit par exphtt. Ce constat renforce l'hypothèse selon laquelle exphtt pourrait se voir attribuer de nouvelles propriétés toxiques qui pourraient causer une neurodégénérescence sélective des neurones du striatum.

1.5 Modèles murins HD

1.5.1 Modèles knock-out

Dans le but d'étudier les fonctions du gène IT15, différents modèles de souris altérées génétiquement furent générées. L'inactivation complète et ciblée de l'homologue murin du gène IT15 (*Hdh*^{-/-}), cause une importante neurodégénérescence et une mort au 8.5^{ème} jour embryonnaire (E8.5). Cette période coïncide avec les étapes critiques du développement du système nerveux central (Nasir et al., 1995; Duyao et al., 1995; Zeitlin et al., 1995), soit la neurogénèse. D'autres études ont par ailleurs démontré qu'un modèle murin hétérozygote

(*Hdh*^{-/+}), exprimant un seul allèle mutant, permet de ramener le phénotype létal et suggère que la toxicité de exphtt est indépendante des fonctions essentielles de htt (Hodgson et al., 1996).

1.5.2 Modèles transgéniques

Plusieurs modèles de souris transgéniques ont été générés par différents groupes de recherche mais aucun d'entre eux n'est parvenu à reproduire la mort neuronale rencontrée au cours de HD. Cependant, ils demeurent des modèles appropriés pour étudier l'évolution de la maladie et dans le but de développer de nouveaux types d'interventions thérapeutiques. Ces modèles murins sont maintenant variés et chacun comporte un nombre différent de répétitions CAG se situant entre 44 et 150 (Almqvist et al., 1996). Par exemple, l'utilisation de l'ADN complémentaire du gène IT15 contenant 44 répétitions CAG chez la souris, ne reproduit pas les dysfonctions motrices et cognitives rencontrées au cours du développement de la maladie contrairement aux modèles avec plus de 100 répétitions CAG. De plus, la majorité des autres modèles transgéniques avec un nombre élevé de répétitions CAG reproduisent ces dysfonctions motrices (Levine et al., 2004).

D'autres modèles furent générés en utilisant l'exon 1 du gène IT15 comme transgène et possédant entre 115 et 150 répétitions CAG. L'expression du transgène était régulée par la séquence du promoteur humain du gène IT15 et a démontré une distribution ubiquitaire des niveaux d'ARNm et aussi de la protéine htt elle-même. De plus, ces souris transgéniques présentent un phénotype neurologique progressif incluant des mouvements stéréotypiques involontaires, des crises épileptiques et une mort prématurée. À l'âge de 12 semaines, une réduction de près de 20% dans le poids total du cerveau a été remarquée lorsque comparé avec les groupes de souris contrôles. Cependant, ce modèle murin n'a démontré aucun signe de neurodégénérescence au niveau du striatum, ce qui est la caractéristique spécifique de HD chez l'humain.

Un autre groupe de recherche a généré un type de souris transgénique plus représentatif de HD en utilisant un « yeast activating chromosome » (YAC) possédant le locus complet de HD avec 128 répétitions CAG (YAC128) (Hodgson et al., 1996). Ce modèle a démontré une expression similaire du gène comparativement à l'expression endogène de la protéine

Htt chez des souris contrôles (non-transgéniques). Les souris YAC128 ont développées des dysfonctions motrices et une atrophie du cerveau qui sont tous deux corrélés avec un âge plus élevé de l'animal. Cette perte neuronale est particulièrement prononcée au niveau du cortex et du striatum. Les principaux symptômes de la souris YAC128 se manifestent tout d'abord par une hyperactivité dans le stade initial de la maladie qui sera suivie par l'apparition de troubles moteurs importants et progressifs, qui vont finalement mener à une hypoactivité de l'animal. Les dysfonctions motrices observées sont hautement corrélées avec une perte neuronale massive au niveau du striatum, expliquant aussi du même coup les modifications dans le comportement moteur de l'animal (Slow et al., 2003).

La plupart de ces modèles *in vivo* ont démontré une accumulation nucléaire progressive de expHtt mais cependant, l'apparition d'agrégats insolubles dans le noyau et le cytoplasme des neurones n'a pas toujours été associée à des neurodysfonctions majeures. L'apparition d'agrégats dans les neurones du striatum et du cortex principalement semble causer une mort plutôt progressive dans certains modèles murins de HD (Wheeler et al., 2000). Par contre, l'accumulation nucléaire de fragments N-terminaux, de même que les agrégats insolubles qu'on y retrouve, semblent insuffisants pour déclencher une mort cellulaire immédiate (Saudou et al., 1998).

1.5.3 Modèles knock-in

Les modèles de souris knock-in possèdent le gène mutant insérée dans le gène codant pour htt et peuvent être sous forme homozygotes ou hétérozygotes. Ces souris portent la mutation dans un contexte protéique plus approprié car ils ont la forme entière de la protéine htt dont la transcription est contrôlée par le promoteur *Hdh*, qui représente l'homologue murin du gène HD.

Les résultats initiaux obtenus avec ce modèle murin ont davantage été perçus comme négatifs car ils n'ont pas démontré les déficits moteurs observés avec les souris transgéniques R6/1 et R6/2 (Li et al., 2005). Cependant, l'étude des autres modèles de souris knock-in possédant une répétition CAG plus longue (>100 CAG) a révélée l'apparition de troubles comportementaux en bas âge. Par exemple, les souris knock-in avec 92 répétitions CAG (*HdhQ92*) ont démontrées une activité locomotrice biphasique se

caractérisant par de l'hyperactivité à partir de 2 mois suivie d'une hypoactivité à 4 mois. Des résultats similaires ont été obtenus avec la souris HdhQ140. Ces anomalies sont légères et ressemblent particulièrement à celles qu'il est possible d'observer chez les patients atteints de HD. Les anomalies dans le comportement moteur de la souris évoluent lentement et offrent donc la possibilité de disséquer la cascade d'évènements pathogéniques menant à la mort neuronale. Une meilleure compréhension de ces phénomènes pourrait permettre l'identification de nouvelles cibles potentielles pour une approche thérapeutique afin de réduire l'agrégation de exphtt. De plus, l'utilisation d'inhibiteurs de protéases pourrait aussi être bénéfique pour réduire la toxicité des fragments N-terminaux associée à la protéolyse de exphtt. Cependant, cette approche pourrait aussi causer une accumulation excessive de substrats des protéases, ce pourrait être produire d'autres dysfonctions cellulaires.

1.6 Clivage de exphtt

Un processus pathologique clé dans HD, est le clivage protéolytique de exphtt en fragments suivi de leur translocation au noyau. Différentes protéases sont responsables du clivage de cette protéine, comme par exemple les caspases, les calpaïnes et les endopeptidases aspartyl (DiFiglia et al., 2002; Wellington et al., 1998). La protéine htt possède plusieurs domaines clivables où ces protéases peuvent agir. Des études récentes ont démontré que l'induction de la dégénérescence des neurones du striatum nécessite le clivage de exphtt en fragments N-terminaux, qui seront par la suite transloqués au noyau selon des mécanismes encore aujourd'hui inconnus (Saudou et al., 1998). De plus, les fragments exphtt clivés possédant la mutation polyQ, représentent une plus forte toxicité que la protéine mutante entière, et ce, en affichant exactement le même nombre de répétitions CAG. La protéine exphtt représente un substrat pour plusieurs caspases et une inhibition de l'activité des caspases -3 et -6 diminue le taux d'apoptose et aussi la quantité d'agrégats formés dans plusieurs modèles cellulaires de HD (Bates, G., 2003; Lunkes et al., 2002). Ces résultats suggèrent que l'inhibition de l'activité de certains types de protéases pourrait être envisagée afin de peut être réussir à ralentir la progression de HD chez des patients asymptomatiques.

Dans le striatum, la protéolyse de htt génère un type de fragment qui diffère dans sa nature comparé à celui qui prédomine au niveau du cortex cérébral. En effet, il a été démontré qu'au niveau du cortex des patients HD, deux types de fragments N-terminaux de exphtt sont présents, tandis que le striatum démontre un produit de clivage différent, libérant plutôt des fragments de type N-terminaux et C-terminaux. Ce qui suggère que les deux types de fragments de exphtt pourraient être toxiques pour la cellule. Comparativement aux individus normaux, les patients HD présentent une forte augmentation dans la quantité de fragments N-terminaux et C-terminaux de exphtt présent dans le striatum (Lunke et al., 2002). Ceci suggère qu'il existe des mécanismes particuliers de protéolyse de exphtt dans les neurones du striatum qui diffère de ceux des autres régions du cerveau où la protéine est aussi exprimée. Cette différence pourrait être suffisante pour interférer avec le métabolisme des neurones du striatum qui semblent être plus susceptibles de subir une dégénérescence face à certains type de fragments de exphtt (Mende-Mueller et al., 2001). Cependant très peu d'informations ont été obtenues jusqu'à maintenant relativement à ce sujet.

Dans le but d'élargir les connaissances au sujet du comportement de exphtt en relation avec l'expansion de la séquence polyQ, différents essais *in vitro* ont été réalisés par l'équipe de Max Perutz de l'Université de Cambridge (Perutz, M. 1994). Les données obtenues ont permis de démontrer que les fragments N-terminaux de exphtt, peuvent former, entre leur séquence polyQ respective, des ponts hydrogènes (Figure 1.6) qui confère alors aux agrégats une plus grande stabilité, d'où leur résistance élevée face à certains détergents puissants comme le SDS (sodium dodecyl sulfate).

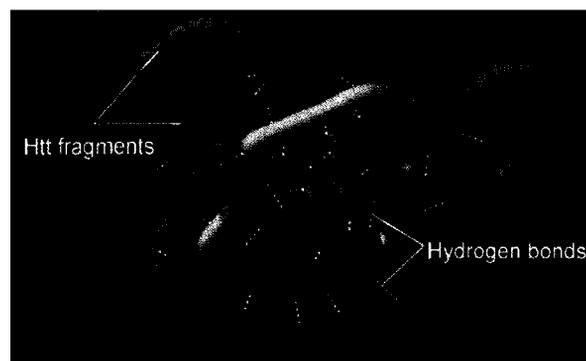


Figure 1.6 Modèle tridimensionnel d'un agrégat contenant des fragments N-terminaux de la protéine mutante Huntingtin. (from HOPES, Huntington's Outreach Project for Education at Stanford)

1.7 Huntingtine et la formation d'agrégats nucléaires

Jusqu'à ce jour, plusieurs modèles murins et lignées cellulaires modifiés génétiquement ont été utilisés pour découvrir la localisation et le processus de dégradation de exphtt. Dans les différents modèles *in vivo*, l'augmentation du nombre de répétitions CAG accroît la présence d'agrégats nucléaires formés de la portion N-terminale contenant la séquence polyQ dans les neurones du striatum (Wheeler et al., 2000). Ces agrégats nucléaires causent de profondes altérations dans les mécanismes de dégradation des protéines comme par exemple le système ubiquitine-protéasome. En conséquence à l'agrégation nucléaire, le protéasome devient alors saturé et son efficacité diminue face à la dégradation de protéines pro-apoptotiques, comme par exemple la p53 qui mène directement à l'apoptose (Jana et al., 2001). En dépit de la forte affinité de l'ubiquitine pour exphtt, la vitesse de dégradation de la protéine est inversement proportionnelle à la longueur de la séquence polyQ. Ces résultats démontrent l'influence que peut avoir exphtt et la formation d'agrégats nucléaires sur les processus de protéolyse qu'effectue normalement la cellule. Cependant, il reste incertain si la présence d'agrégats est une étape préliminaire à la neurodégénérescence ou bien il s'agit plutôt de dysfonctions cellulaires engendrées par la forme mutante de la protéine de ses produits de clivage.

La plupart des modèles *in vivo* ont démontré une accumulation nucléaire et cytoplasmique progressive des fragments N-terminaux de exphtt sans toutefois provoquer des neurodysfonctions majeures, bien qu'une réduction du volume nucléaire des neurones du striatum soit observée. Par contre, l'accumulation nucléaire de fragments N-terminaux, semble nettement insuffisante pour déclencher une mort cellulaire immédiate ou des dysfonctions dans les cellules neuronales. Cependant, à l'intérieur du noyau, exphtt pourrait bien se comporter comme un facteur de transcription tout comme la plupart des protéines possédant une séquence polyglutamine.

1.8 Séquestration de facteurs de transcription

Étant donné le fait que expHtt démontre une forte accumulation nucléaire, plusieurs processus prenant place à l'intérieur du noyau pourraient être affectés. Une étude à

démonstré qu'un dérèglement dans les mécanismes de transcription semble jouer un rôle déterminant dans la pathogenèse relié à l'expansion polyQ (Cha J.H., 2000). Tel que mentionné précédemment, l'expression de protéines ayant une expansion de la répétition CAG, peut provoquer la séquestration de facteurs de transcriptions importants. Ces facteurs de transcriptions, qui incluent CREB-binding protein (CBP), l'histone acétyl-transférase (HAT) et différents co-activateurs de la transcription qui contiennent une suite de répétitions CAG interagissant avec exphtt (Kazantsev et al., 1999; McCampbell et al., 2000, Nucifora et al., 2001). De plus, dans le striatum de patients HD, la transcription d'un certain nombre de gènes semble être considérablement affectée lorsqu'il y a présence d'agrégats. Donc, la séquestration de différents facteurs de transcription à l'intérieur des agrégats pourrait, en partie, contribuer à l'évolution de la pathologie et de la neurodégénérescence.

1.9 Implication du système dopaminergique

1.9.1 La signalisation dopaminergique

Les effets physiologiques des récepteurs dopaminergiques sont médiés par les récepteurs (D1-D5) qui font partis de la famille des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) (Missale et al., 1998; Neve et al., 2004). Les récepteurs dopaminergiques peuvent être divisés en deux grandes catégories, soit ceux de type D1 « D1-like » incluant le D1 et le D5, et ceux de type D2 « D2-like » incluant le D2, le D3 et le D4. Dans la majorité des systèmes (Neve et al., 2004, Sidhu et al., 2000), la stimulation des récepteurs D1-like à pour effet d'activer l'adénylate cyclase (AC) par le biais de la protéine G (G_s/G_{olf}) couplée au même récepteur. En ce qui concerne les récepteurs D2-like, ils inhibent l'activité de l'AC par le biais de la protéine G (G_i/G_o) (Lebel et al, 2007). Donc, la stimulation des récepteurs dopaminergiques et à donc pour effet d'activer (D1-like) ou d'inhiber (D2-like) la synthèse d'AMPC, ce qui influence l'activité de PKA (cAMP-dependent protein kinase A). PKA peut phosphoryler plusieurs substrat tel que CREB (cAMP response element-binding protein), canaux ioniques (NMDA, AMPA, GABA) et DARPP-32 (dopamine and cAMP-regulated phosphoprotein of 32 KDa).

Le récepteur dopaminergique D1 possède les niveaux d'expression les plus variés avec la plus forte concentration dans le système nerveux central. De plus, la distribution des récepteurs dopaminergiques D2 est très similaire à celle du D1R, soit au niveau du striatum, de la substance noire et au niveau du tubercule olfactif (23, 30, 31). Même que plusieurs études ont démontrées que les récepteurs dopaminergiques D1 et D2 co-localize sur les neurones (GABAergiques et cholinergiques) niveau du striatum (27-29). Dans la maladie d'huntington, la transmission du système dopaminergique est interrompue par la perte massive et sélective des neurones du striatum possédant de façon majoritaire des récepteurs dopaminergiques D1 et D2-like à leur surface. Il est possible que l'altération de la signalisation dopaminergique influence la progression de la maladie et pourrait même causer la dégénérescence prématurée des neurones du striatum qui reçoivent la plus forte affluence dopaminergique du système nerveux. Jusqu'à maintenant très peu d'information a été obtenue en lien avec l'effet possible de l'activation des voies de signalisation dopaminergiques sur la protéine mutante huntingtin. Par contre, une étude récente a démontrée dans des cultures primaires de neurones GABAergiques, que la stimulation du récepteurs dopaminergique D2 influence la formation d'agrégats en présence de surexpression de la protéine mutante huntingtin exphtt (Charvin et al., 2005). Ces données restent cependant à être confirmées dans d'autres systèmes. De plus, l'effet de la signalisation du récepteur D1 sur exphtt est pratiquement inconnu. Ce qui nous a donc conduit à l'élaboration d'une stratégie afin de caractériser l'effet possible que pourrait avoir la signalisation du récepteur D1 sur la localisation et la dynamique de exphtt, de même que la formation d'agrégats au niveau cytoplasmique et nucléaire.

1.9.2 Le système dopaminergique

Un nombre considérable d'observations a fourni des preuves démontrant un dysfonctionnement du système dopaminergique au cours de HD. Cette idée a tout d'abord été proposée suite à l'apparition de dyskinésies chez des patients HD asymptomatiques (10 sur 28) ayant reçu l'administration de *L-DOPA* (Klawans et al., 1970). Par la suite, il a été constaté qu'un traitement avec des antagonistes des récepteurs dopaminergiques s'avère efficace pour traiter les mouvements choréiformes associés à HD. De plus, l'administration de certains agonistes dopaminergiques amplifie considérablement l'intensité et la sévérité

de ces mouvements. Malheureusement, il n'existe actuellement aucune médication efficace pour traiter les symptômes de HD mis à part une molécule appelée Tétrabénazine (Nitoman[®], Prestwick Pharmaceuticals) qui diminue considérablement l'intensité des mouvements choréiformes. Le mécanisme d'action de la Tétrabénazine (Figure 2.1) consiste en l'inhibition du transporteur vésiculaire des monoamines (VMAT), qui a pour rôle premier de concentrer les catécholamines, dont la dopamine, à l'intérieur des vésicules.

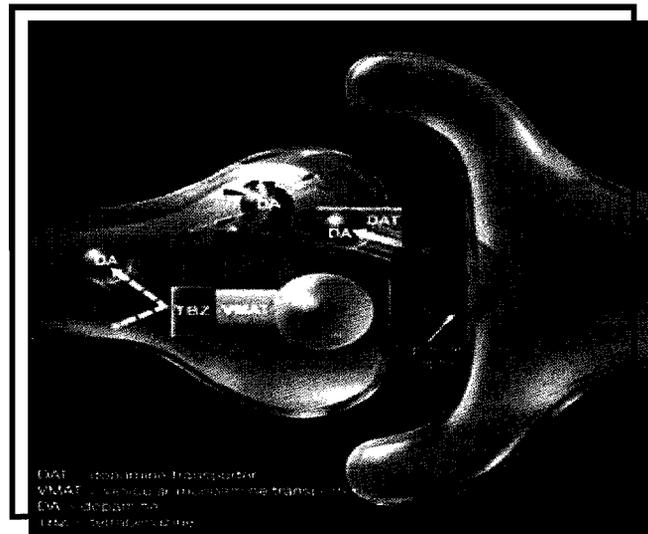


Figure 1.9.1 Mécanisme d'action de la Tétrabénazine

Ces vésicules sont normalement acheminées à l'élément pré-synaptique pour ensuite effectuer la libération du neurotransmetteur dopamine dans la fente synaptique. Une fois relâchée, la dopamine se lie à ses récepteurs pour produire un effet physiologique direct. Chez les patients HD, l'administration de la Tétrabénazine diminue drastiquement la concentration de dopamine présente au niveau du striatum. Ces résultats cliniques confirment donc l'hypothèse selon laquelle les troubles moteurs observés dans la pathologie pourraient être directement reliés à une hyperactivité du système dopaminergique ou à un excès dans la libération du neurotransmetteur dopamine au niveau du striatum.

Dans le cerveau d'un individu normal, les niveaux de dopamine (DA) au striatum sont plus élevés dans la partie dorsale et diminuent progressivement vers la partie ventrale. Fait intéressant, ce gradient (concentration de dopamine) peut être corrélé avec la neurodégénérescence progressive observée chez les patients HD (Cass, W.A. 1997) *i.e.* que

les neurones du striatum dégèrent premièrement dans la partie dorsale et ensuite progressivement vers la partie ventrale. Il est important de mentionner que les neurones constituant le striatum, reçoivent les plus fortes afférences dopaminergiques de tout le SNC en provenance de la substantia nigra pars compacta (SNpc). La SNpc est constituée principalement de neurones dopaminergiques (Figure 1.9.2). Ces données nous permettent, encore une fois, de suspecter une hyperactivité du système dopaminergique qui semble être à l'origine des dysfonctions motrices et des mouvements choréiformes.

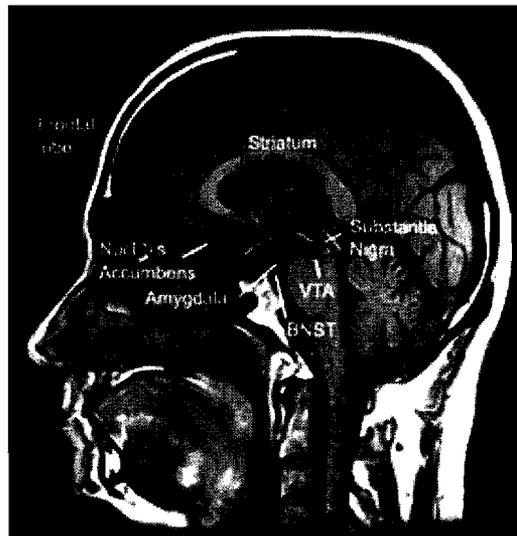


Figure 1.9.2 Principales innervations dopaminergiques en provenance de la substance noire

1.9.2 La huntingtin mutante et la dopamine

Lorsqu'exprimée dans les neurones du striatum, *expht* semble causer des dysfonctions cellulaires importantes en diminuant le nombre de récepteurs D1/D2 présents à leur surface. Ces neurones subissent différentes altérations qui peuvent alors provoquer une perte d'inhibition normalement maintenue par le GABA (acide gamma-aminobutyrique), un neurotransmetteur relâché par les neurones GABAergiques du striatum. Cette perte d'inhibition semble être un des facteurs en cause dans les troubles moteurs observés dans HD (Gerfen et al., 1991). À la figure 1.9.3, un marquage des neurones possédant des récepteurs dopaminergiques a été réalisé avec un anticorps dirigé contre la protéine DARPP-32 (Dopamine and cAMP-Regulated Phosphoprotein 32 KDa), une protéine

spécifiquement exprimée par les neurones du striatum, de même qu'avec un anticorps dirigé contre le récepteur D1. Il a donc été possible de localiser les neurones exprimant en majorité des récepteurs dopaminergiques D1 et D2 dans le SNC. On peut voir que les structures marquées par les différents anticorps et exprimant le plus grand nombre de récepteurs dopaminergiques sont aussi celles qui dégénèrent de façon importante chez les patients HD. Ces structures correspondent plus précisément aux neurones du tubercule olfactif et du striatum.

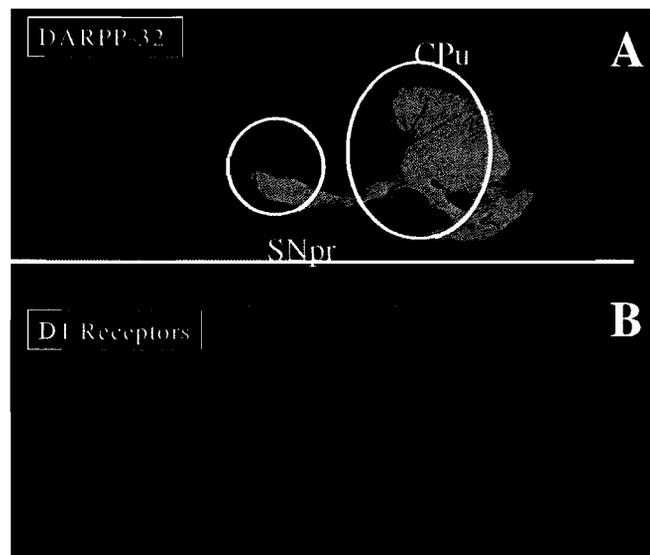


Figure 1.9.3 Immunofluorescence d'une coupe sagittale de cerveau de rat. (A) Marquage avec un anti-DARPP-32 et en (B) un anti-D1R. (SNpr : substantia nigra pars compacta, CPu : noyau caudé-putamen) *Duke University*.

Un excès de dopamine est souvent associé au stress oxydatif et à des dysfonctions mitochondriales, maintenant reconnus comme étant des facteurs impliqués dans la dégénérescence des neurones du striatum (Jakel et Maragos, 2000). Comme il a été mentionné précédemment, la dopamine est le neurotransmetteur qui prédomine au niveau du striatum et des ganglions de la base, structures qui sont notamment affectées dans HD (Figure 1.2.1). Il peut aussi se produire une hypersensibilité à la dopamine suite à une diminution de la libération de ce neurotransmetteur (traitement avec la tétrabénazine). La diminution du niveau de dopamine s'accompagne par une augmentation du nombre de récepteurs dopaminergiques ce qui augmente la sensibilité des récepteurs face à ce neurotransmetteur. Cette hypersensibilité provoque alors des dyskinésies lorsque les

niveaux de dopamine reviennent à la normale, tel que remarqué lors de l'arrêt brusque d'un traitement avec un neuroleptique (Saft et al., 2006). Dans le cas de HD, les problèmes d'hypersensibilité deviennent apparents seulement lors d'un traitement à long terme avec un neuroleptique, et disparaissent généralement après quelques jours. Par contre, les dyskinésies peuvent persister pour une période de temps indéterminée qui peut parfois durer plusieurs années. Il est donc important d'obtenir une meilleure compréhension des mécanismes prenant place au cours de l'évolution de maladies neurodégénératives.

1.9.3 La souris DAT^{-/-}/Hdh^{Q92/Q92}

Dans le but de vérifier le rôle de la dopamine dans l'émergence des conditions pathologiques de l'expansion CAG sur l'exon-1 du gène IT15, un modèle murin de HD fut récemment généré avec un niveau de dopamine 5 fois plus élevé que la normale au striatum (Giros et al., 1996). Ce modèle murin fut obtenu suite au croisement de la souris DAT-KO (DAT^{-/-}) avec un modèle de souris HD ayant 92 répétitions CAG (Hdh^{Q92/Q92}). La caractérisation de ce modèle hyperdopaminergique de HD a démontré qu'une hyperstimulation soutenue des récepteurs dopaminergiques au niveau du striatum peut reproduire les dysfonctions motrices observées au cours de HD et accélérer la formation d'agrégats de exphtt dans les structures recevant de fortes afférences dopaminergiques (Cyr et al., 2006). Ces résultats démontrent bien qu'une forte concentration de dopamine peut contribuer à la détérioration du striatum induite par la présence de exphtt. De plus, cela soulève l'hypothèse selon laquelle une suppression ou diminution de la transmission dopaminergique pourrait peut être s'avérer bénéfique durant l'évolution de HD.

1.9.4 Les récepteurs dopaminergiques

Les effets physiologiques de la dopamine sont médiés principalement par deux sous-types de récepteurs, soit la famille des D1-like (D1R et D5R) et celle des D2-like (D2R, D3R et D4R). Les récepteurs de type D1-like, lorsque stimulés avec un agoniste sélectif, activent l'adénylate cyclase (AC), une protéine transmembranaire. L'activation de cette protéine catalyse la conversion de l'ATP en AMPc et augmente donc ainsi le niveau d'AMPc intracellulaire (Figure 1.9.4). Pour les récepteurs de type D2-like, ils inhibent l'activité de l'AC ce qui diminue donc la production d'AMPc.

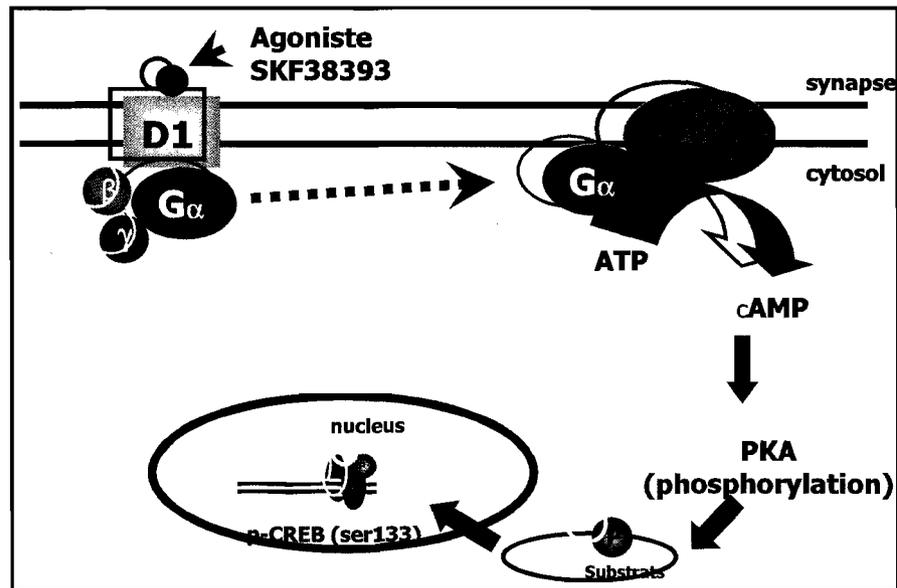


Figure 1.9.4 Schéma représentant la signalisation du récepteur dopaminergique D1.
(Robinson et al., 2008. Article in press, *Neuroscience*)

Une augmentation dans les niveaux d'AMPc influence fortement l'activité de PKA (cAMP-dépendant protein kinase A) qui devient alors phosphorylée et pourra par la suite phosphoryler plusieurs autres protéines régulant des fonctions physiologiques importantes telle la transcription de gènes important pour le maintien de l'homéostasie cellulaire. Une des cibles principales de PKA est CREB (cAMP-regulated element binding protein), qui peut être activé suite à une phosphorylation sur le résidu sérine 133 (Ser133). Lorsque phosphorylée, phospho-CREB régule la transcription de certains gènes importants pour la survie des cellules neuronales. Donc, en utilisant un agoniste sélectif de D1R, il a été possible de déterminer le véritable effet d'une stimulation de la voie de signalisation du D1R (cAMP/PKA/pCREB) sur le processus d'agrégation cytoplasmique et nucléaire expHtt dans un modèle neuronal.

CHAPITRE 2

HYPOTHÈSE DE RECHERCHE

2.1 Rationnelle et hypothèse du projet de recherche

Au cours de l'évolution de HD, il se produit une neurodégénérescence massive des neurones constituant le striatum. Les causes exactes de cette mort neuronale restent cependant toujours inconnues. Au cours des dernières années, il y a eu une accumulation d'évidence démontrant le rôle possible du système dopaminergique dans la maladie (Jakel and Maragos, 2000). En effet, ces neurones expriment de façon majoritaire des récepteurs dopaminergiques à leur surface et reçoivent une forte innervation en dopamine. Il est donc possible qu'une altération du système dopaminergique, par exemple une hypersensibilité des récepteurs dopaminergiques ou par une libération excessive du neurotransmetteur, puisse mener à des dysfonctions motrices et à plus long terme, à une mort neuronale prématurée. L'hypothèse de ce projet de recherche est que le système dopaminergique pourrait jouer un rôle dans la formation d'agrégats de exphtt et l'émergence de la condition pathologique de HD. Nous avons proposé d'investiguer l'effet de la signalisation du récepteur dopaminergique D1 sur l'agrégation de exphtt et son effet possible sur la survie cellulaire.

L'objectif principal de mes travaux de recherche consistait donc à déterminer l'influence d'une stimulation du récepteur dopaminergique D1 sur la cinétique d'agrégation de exphtt et son effet sur la survie neuronale. Pour ce faire, nous avons choisi la lignée cellulaire des cellules de neuroblastome humain (SK-N-MC). Ces cellules sont d'origine neuronale et ont la particularité d'exprimer de façon endogène le récepteur dopaminergique D1 et non le D5. De plus, ce récepteur possède des propriétés pharmacologiques très similaires à celle du récepteur D1 retrouvé au niveau du striatum chez l'humain.

Afin d'obtenir l'expression de la protéine htt mutante dans les cellules SK-N-MC, nous avons obtenus deux différents plasmides codant pour la forme normale (CAG25) et mutante de htt (CAG103) possédant respectivement 25 ou 103 répétitions CAG à

l'extrémité 5'. À l'autre extrémité, la séquence codant pour la « Enhanced Green Fluorescent Protein », soit EGFP, était annexée afin de pouvoir visualiser la protéine en microscopie à fluorescence.

Dans le but de déterminer l'influence d'une stimulation du D1R sur la cinétique d'agrégation de la htt mutante, nous avons proposé d'observer la localisation des agrégats dans le temps. Suite à la transfection de CAG25 ou CAG103, les cellules ont été traitées avec un agoniste sélectif du D1R, le SKF-38393 (10 μ M), et nous avons quantifié le nombre d'agrégats ainsi que leur localisation dans la cellule en microscopie à fluorescence. De cette façon, il a été possible de suivre l'évolution du processus d'agrégation de façon précise dans le temps et d'évaluer si la formation d'agrégats est influencée par une stimulation du D1R, de même que son impact sur la survie cellulaire. Le test de viabilité cellulaire MTT a été utilisé pour compléter les résultats obtenus avec le colorant nucléaire Hoechst-33342 relativement au nombre de noyaux apoptotiques et ainsi établir une relation entre la formation d'agrégats et la survie cellulaire.

Ce modèle peut donc contribuer à évaluer l'effet d'une stimulation du D1R dans le développement de HD en lien avec le processus d'agrégation de exphtt et son effet sur la survie neuronale dans un modèle *in vitro*.

CHAPITRE 3

Dopamine D1 receptor mediated aggregation of N-terminal fragments of mutant huntingtin and cell death in a neuroblastoma cell line

Résumé

La chorée d'Huntington (HD) est une maladie génétique neurodégénérative causée par une expansion anormale de la répétition CAG sur le gène IT15 codant pour la protéine huntingtine (htt). La forme mutante de htt (exphtt) est reconnue pour acquérir des propriétés toxiques dans certaines régions du cerveau. Par exemple, les neurones du striatum exprimant des récepteurs dopaminergiques dégénèrent de façon prédominante au cours de l'évolution de la pathologie. Les causes exactes de cette vulnérabilité spécifique restent encore inconnues. Cependant, un grand nombre d'études ont récemment mis en évidence l'implication du système dopaminergique dans la régulation des propriétés toxiques de exphtt. Dans le but d'investiguer la relation entre les récepteurs dopaminergiques et exphtt, nous avons transfecté les cellules SK-N-MC avec la « enhanced green fluorescent proteins (EGFP) annexée à la htt (25 CAG), ou sa forme mutante, exphtt (103 CAG). Les cellules SK-N-MC ont la particularité d'exprimer seulement le récepteur dopaminergique D1 (D1R) de façon endogène. Ce qui permet nous a donc permis d'isoler la voie de signalisation de ce récepteur. Lorsque transfecté, CAG103-EGFP a induit la formation d'agrégats nucléaires et cytoplasmiques et s'est avéré toxique au-delà de 24 heures post-transfection. Par ailleurs, l'utilisation d'une faible concentration d'un agoniste sélectif pour le D1R a induit la formation d'un plus grand nombre d'agrégats nucléaires alors qu'il y a eu une diminution dans le nombre d'agrégats cytoplasmiques. L'effet observé, suite à l'activation du D1R, n'a pas été associé avec une diminution significative de la survie cellulaire. Cependant, les résultats obtenus suggèrent que la signalisation associée au D1R affecte la localisation de exphtt ainsi que la formation d'agrégats. Ces données vont peut être permettre de mieux comprendre le rôle possible que les récepteurs dopaminergiques peuvent jouer dans la pathophysiologie de HD.

Contribution des co-auteurs à l'article : L'article a été rédigé par Pierre Robinson. Les corrections de l'article ont toutes été réalisées sous la supervision du Dr. Michel Cyr. L'expression bactérienne des vecteurs utilisés, les analyses microscopiques, les traitements pharmacologiques et les cultures cellulaires ont été réalisés par Pierre Robinson. Les fractions cellulaires et la majorité des analyses de type western blots de la figure #4 ont été effectuées par Manon Lebel, MSc. Les expériences ont été réalisées sous la direction du Dr. Michel Cyr.

3.1 Abstract

Huntington's disease (HD) is an inherited neurodegenerative disorder caused by abnormal CAG repeat expansion in the IT15 gene encoding huntingtin protein (htt). Mutated htt is predicted to acquire toxic properties in specific brain regions. For instance, striatal neurons expressing dopamine receptors predominantly degenerate in HD patients. Although the basis of this specific vulnerability remains unclear, a great deal of evidence has documented the ability of the dopamine system to modulate the toxicity of expanded htt. To investigate the relationship between dopamine receptors and expanded htt, we transfected enhanced green fluorescent proteins (EGFP) tagged to normal (25 CAG) or mutant (103 CAG) htt in SK-N-MC neuroblastoma cells that endogenously express D1 receptors. Forming nuclear and cytoplasmic aggregates, mutant htt-EGFP was toxic to cells beyond 24 hours post-transfection. Remarkably, low doses of a selective D1 receptors agonist or forskolin, an activator of adenylate cyclase, accelerated the formation of mutant htt nuclear aggregates, whereas the number of cytoplasmic aggregates was decreased. These effects were associated with a minor increase in cell death. Understanding their functional bases may further elucidate the role of dopamine receptors signaling in the complex pathophysiology of HD.

KEYWORDS

Huntington's disease, G-protein-coupled receptors, Cell survival, Dopamine receptors.

3.2 Introduction

Huntington's disease (HD) is an autosomal dominant neurodegenerative disorder usually manifested around midlife with chorea (involuntary jerky movements) and a variety of neuropsychiatric affections, such as agitation, irritability, psychosis and dementia (Hayden, 1981; Folstein, 1989; Harper, 1991). This hyperkinetic disorder is caused by the expansion of an unstable CAG repeat in exon 1 of the IT15 gene coding for huntingtin protein (htt) (HDColl.Res.Group, 1993). More than 35 CAG repeats predispose individuals to HD: 35-39 repeats are associated with incomplete penetrance, and 40 or more repeats, with complete penetrance. Despite its ubiquitous expression throughout the human body, mutant htt mostly affects striatal gamma-aminobutyric acid neurons expressing dopamine receptors (Strong et al., 1993; DiFiglia et al., 1997; Ferrante et al., 1997; Gutekunst et al., 1999). The result is pronounced atrophy of the caudate-putamen area, although certain layers of the cerebral cortex are less affected (Ferrante et al., 1985; Vonsattel et al., 1985; Ferrante et al., 1987).

It has been demonstrated post-mortem that N-terminal fragments of mutant htt accumulate in the brain striatum of HD patients (DiFiglia et al., 1997). This accumulation apparently leads to the formation of nuclear and cytoplasmic aggregates in HD patients, an HD mouse model, primary cultures of knock-in mouse striatal cells and transfected neuronal cells (DiFiglia et al., 1997; Saudou et al., 1998; Wheeler et al., 2000; Goffredo et al., 2002; Menalled and Chesselet, 2002; Levine et al., 2004). Based on certain findings, it has been hypothesized that mutant htt is cleaved by proteases (caspases-3-6-9, calpains and aspartyl proteases) within the cytoplasm and translocated to the nucleus, forming inclusion bodies that presumably sequester transcription factors and other essential proteins (Lunkes et al., 2002; Sugars and Rubinsztein, 2003; Gafni et al., 2004). Inhibition of nuclear and cytoplasmic mutant htt aggregation reduces cell death, indicating a direct correlation between aggregate formation and neurodegeneration (Carmichael et al., 2002). However, some data demonstrate that nuclear aggregate formation and apoptosis are not closely linked, considering that mutant htt can act via other cellular pathways (Slow et al., 2006).

Accumulating evidence suggests that the dopamine neurotransmission system modulates mutant htt toxicity. We have shown, in mice with deletion of the dopamine transporter, that

increased dopamine transmission enhances HD phenotype severity (Cyr et al., 2006). In addition to our findings, previous studies have documented that lowering dopamine transmission reduces the behavioural deficits and neuronal death to some extent in several rodent models of HD, such as rats treated with 3-nitropropionic acid, YAC128 mice and lentiviral-mediated expression of mutant htt in the rat striatum (Maragos et al., 1998; Reynolds et al., 1998; Charvin et al., 2007; Tang et al., 2007). In fact, it has been documented that striatal primary cultures expressing a portion of the human htt gene with expanded CAG repeats are more susceptible to excess dopamine (Petersen et al., 2001), in which the dopamine receptors signaling system may play a pivotal role (Garcia et al., 2004; Charvin et al., 2005; Tang et al., 2007). To understand the relationship between the dopamine system and mutant htt aggregation, we investigated the effects of D1 dopamine receptors stimulation in SK-N-MC cells expressing mutant htt. Our data revealed that direct activation of D1 receptors enhanced the formation of mutant htt nuclear aggregates to the detriment of cytoplasmic aggregates, raising the interesting possibility that D1 receptors signaling could interact with the nuclear translocation machinery of soluble mutant htt.

3.3 Experimental procedures

3.3.1 Cell culture and treatment

SK-N-MC human neuroblastoma cells were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC) and cultured in 24-well plates (seeding density 8.5×10^4 cells/well). The cells were grown in Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM), supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS), 0.5% penicillin/streptomycin (10,000 U/mL, 10,000 μ g/mL) and 2mM L-glutamine. The cultures were maintained in a humidified incubator (5% CO₂, 95% air at 37 °C) and half of the medium was changed three times a week. All culture reagents were purchased from Sigma. For pharmacological treatments, drugs were dissolved in PBS containing 0.01% ascorbic acid to prevent degradation or oxidation of the compounds. Solubilized drugs SKF-38393, SCH-23390 and forskolin (Sigma-RBI), were directly added to the culture medium (without serum) for the appropriate time. Control cells were treated with equal volume of PBS in the culture medium. Cells were treated overnight at 75% confluence.

3.3.2 Transfection of cDNA constructs

In this study, two different constructs were used, one encoding the exon-1 of human htt with 25 glutamine repeats in the 5' end (normal-htt) and another one with 103 (mutant-htt) glutamine repeats. Both fragments were tagged to the enhanced green fluorescent protein (EGFP) in the 3' end. These two cDNAs were obtained from the Huntington's Disease Foundation Resource Bank, UCLA and subcloned in pcDNA3.1/myc-his. Transient transfection was performed using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) as recommended by the manufacturer's protocol. Transfection efficiency was approximately 60-70% of total cells. After 4 hours, cells were rinsed and fresh DMEM medium (without serum) was added.

3.3.3 MTT Cell Viability Test

SK-N-MC human neuroblastoma cells were grown in 96-well dish to 90% confluence and treated as described above. After treatment, fresh DMEM medium (without serum) containing 0.5 mg/mL of (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2-5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT cell proliferation assay kit, Cedarlane) was added and incubated (5% CO₂, 95% air at

37 °C) for 3 hours. The formazan crystals were dissolved using a solubilization solution (10% SDS in 0.01M HCl) for an overnight period at 37 °C, protected from light. Absorbance was read at 567 nm using a microplate reader (Bio-Rad).

3.3.4 Immunocytochemical analysis

Cells were fixed in 4% paraformaldehyde in PBS for 20 min at room temperature (RT) and rinsed twice 5 min with PBS. The cells were preincubated in a blocking solution (10% normal goat serum (NGS), 1.2% Triton X-100 in PBS) for 20 min at RT. Cells were rinsed and incubated for an overnight period at 4°C in a solution (2% NGS, 1.2% Triton-X-100) containing diluted polyclonal antibody EM-48 (1:200) (gift from Dr. Xiao-Jiang Li, Emory University) which recognizes specifically aggregated mutant htt. After two washes in PBS, anti-rabbit Cy3-conjugated secondary antibody (Jackson Immuno-Research) was added for 2 hours at RT. Cells were counterstained with the DNA dye Hoechst-33342 (Molecular Probes) (1:10,000) for 5 min at RT to evaluate nuclear integrity. Nuclei were considered apoptotic when showing either condensed or fragmented chromatin. For most of the experiments, cells were visualized under an IX70 Olympus Inverted Fluorescence Microscope (Olympus) unless otherwise stated. Pictures were taken with the SPOT RT advanced digital camera system (Diagnostic Instruments, Inc, Sterling Heights, MI) and the Image-Pro Plus Software (Media Cybernetics, Silver Spring, MD).

3.3.5 Western blot analysis

Cells were harvested in 0.25% Trypsin/2mM EDTA (Invitrogen) at 37 °C for 2 min and resuspended in fresh DMEM containing serum for trypsin inactivation. Cells were centrifuged for 5 min at 1000 x g and resuspended for lysis in ice-cold RIPA buffer containing 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1%, NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, proteases inhibitor cocktail (Sigma; 1:100), and phosphatase inhibitors (sodium orthovanadate 200µM (Labmat) and okadaic acid 10µM (Biomol)). The lysates were kept on ice and vortexed 3 times every 10 min. Samples were then centrifuged at 4°C (13,000g) for 30 min and supernatants were stored at -80°C. Protein concentrations were determined using the Bradford Bio-Rad protein assay. Protein samples (30µg) were

boiled 5 min in loading buffer (2% SDS, 62.5mM Tris-HCl, 5% 2- β -mercaptoethanol, 1% glycerol and 0.01% bromophenol blue) separated on 10% SDS-PAGE and electrotransferred onto nitrocellulose membranes. Membranes were then blocked with 5% BSA in TBS-Tween (0.05%) for 2 hours at RT and incubated overnight at 4°C with the following primary antibodies: anti-caspase-3 (Abcam; 1:100), anti-activated-caspase-3 (Abcam; 1:100), anti-CREB (Abcam; 1:1000), anti-phospho-CREB (Chemicon; 1:500), anti-DARPP-32 (BD Transduction Lab; 1:250), anti-D1 receptors (Chemicon; 1:1000) and anti-N-terminal-Htt (N18; Santa Cruz; 1:1000). In order to ensure that samples' loading was constant, every membrane was stripped using a stripping buffer (100mM 2- β -mercaptoethanol, 2% SDS, 62.5mM Tris-HCl, pH 6.8) and immunoblotted with an anti-Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH) (Abcam; 1:2000). Immune complexes were formed by using HRP-conjugated secondary antibodies (Jackson Immuno-Research) from appropriate species along with a chemiluminescent reagent (SuperSignal West-Pico, Pierce) for peroxidase activity allowing band detection (Epi-chemi CCD camera, VWR). Densitometrical analyses were conducted using the Vision Works Image Acquisition and Analysis Software (UVP).

3.3.6 Cell fractionation

Transfected and non transfected SK-N-MC cells grown in six well plates were washed twice with ice-cold PBS and collected after trypsinization. Cells were centrifuged for 5 min at 2000 rpm and pellets were resuspended in twice the pellet volume of ice cold hypotonic buffer (1,5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 10 mM Tris pH 7.9) supplemented with 10 μ l of protease inhibitor cocktail (PIC) 100X, 4 μ l PMSF 100mM and 4,15 μ M DTT (0,72M). 0,05% NP40 was added in every samples and cells were centrifuged for 15 min at 5000rpm. Supernatant contains cytoplasmic proteins. Pellets were resuspended in 1 volume of another hypotonic buffer (glycerol 20%, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 20 mM Tris pH 7.9) supplemented with 10 μ l PIC 100X, 4 μ l PMSF 100 mM and 4,15 μ M DTT (0,72M) and a 2/3 volume of hypertonic buffer (glycerol 20%, 1,5 mM MgCl₂, 1,2M KCl, 20 mM Tris pH 7.9) also supplemented with 10 μ l PIC 100X, 4 μ l PMSF 100mM and 4,15 μ M DTT (0,72M). Cells were incubated at 4°C for 45 min on a rocking plate and centrifuged at maximum speed (> 13,000 rpm) for 45 min. Supernatant contains nuclear proteins.

3.3.7 Statistical Analysis

Every data are presented as mean average of triplicates \pm SEM and were analyzed by one-way ANOVA using the Neuman-Keuls post hoc test or by two-way ANOVA followed by Bonferroni's post test. The statistical level of significance was set at $P < 0.05$ and data analyses were performed using Graph Pad Prism version 4.00 for Windows (Graph Pad Software, San Diego, CA).

3.4 Results

3.4.1 Mutant htt triggers the formation of aggregates and affects cell viability in a time-dependent manner.

In order to determine how mutant htt behaves in SK-N-MC cells, we transiently transfected them with either the normal (CAG25) or mutant (CAG103) htt cDNA fragment fused to the Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) (Fig. 1). Using epifluorescence microscopy, we observed that transfected cells with whichever constructs exhibited strong cytoplasmic expression of htt-EGFP (Fig. 1A). However, 12 hours post-transfection, mutant htt-EGFP expressing cells showed nuclear and perinuclear accumulations that were characteristic of htt aggregates observed in HD mouse models and in the brain of HD patients (Fig 1A) (Davies et al., 1997; DiFiglia et al., 1997). These aggregates were also detected using the anti-aggregated htt antibody EM-48 (data not shown; (Gutekunst et al., 1999). The physical nature of the normal htt-EGFP was unchanged at any of the specific time point observed (Fig 1A). This confirmed that polyglutamine stretch, the only distinctive element between both constructs, was responsible for the formation of aggregates. To further investigate the aggregation process of mutant htt-EGFP in SK-N-MC cells, we next assessed the number of nuclear versus cytoplasmic aggregates formed during a period of 18 hours (Fig. 1B). Remarkably, the highest number of cytoplasmic aggregates amongst all time points was observed at 12 hours, whereas the number of nuclear aggregates was maximal at 18 hours. One reason underlying this discrepancy might be that prior to its nuclear aggregation, mutant htt possibly needs to shuttle from the cytoplasm to the nucleus. This mechanism is, unfortunately, unknown up to now and would required further experiments in order to be confirmed.

Cell survival was assessed by using both MTT test and apoptotic cells counts in transfected SK-N-MC cells. Cell viability as performed by the MTT test was not altered in SK-N-MC transfected with the normal htt construct when compared to control (cells not transfected; Fig.1C). In contrast, the mutant htt construct significantly impaired cell survival with time (Fig.1C). The neuronal death was confirmed by the presence of apoptotic nuclei observed in mutant htt transfected cells, as revealed by Hoechst-33342 labeling and apoptotic cell counts (Fig. 1D). The numbers of apoptotic nuclei paralleled

nically with the MTT test as both techniques revealed 30% of cell death at 24 hours post-transfection with mutant htt. These data suggested that the observed difference in cytoplasmic versus nuclear mutant htt-EGFP aggregates counts (Fig. 1B) was not biased by cell death.

3.4.2 D1 receptor stimulation increases the formation of nuclear aggregates in mutant htt transfected cells

Recently, *in vivo* studies demonstrated that increased dopamine transmission enhanced the severity of phenotype in HD mice (Cyr et al., 2006). It was suggested that dopamine receptors could play a role in these effects of elevated dopamine transmission (Charvin et al., 2007; Lebel et al., 2007; Tang et al., 2007). For instance, *in vitro* studies documented that D2 receptors agonists increased the formation of mutant-htt aggregates and cell death in chronic situation (Charvin et al., 2007). On the other hand, the role of D1 receptors activation on mutant-htt aggregates formation and cell death has never been directly addressed. Therefore, we used SK-N-MC human neuroblastoma cells that have been documented to express functional D1, but not D5, dopamine receptors (Sidhu et al., 1999). These cells were transfected with the normal and mutant-htt constructs and treated with the D1 receptors agonist SKF-38393.

Activation of D1 receptors increased the intracellular levels of 3'-5'-cyclic adenosine monophosphate (cAMP), which activated cAMP-dependent protein kinase (PKA) that will, in turn, enhanced the activity of the cAMP response element-binding (CREB) protein (Missale et al., 1998). Consequently, in order to establish the minimal dose required to activate the D1 receptors signaling machinery, we assessed the phosphorylation levels of CREB at the PKA site Ser133 after SKF-38393 treatments (Fig. 2A). CREB phosphorylation levels were increased in parallel with escalating doses of SKF-38393 (1 to 100 μ M) in which 10 μ M was the minimal dose required to get a statistically significant level of phosphorylation (Fig. 2B). The D1 receptors antagonist SCH-23390 (1 μ M) blocked completely this effect, indicating that phosphorylation of CREB was selectively due to the stimulation of the D1 receptors (Fig. 2A and B). Using the MTT test, we observed that a dose of 100 μ M SKF-38393 was associated to about 35% loss in cell viability (Fig. 2C). In contrast, 10 μ M SKF-38393 did not affect cell viability. These dose-

effects of SKF-38393 on SK-N-MC cells survival were described previously (Chen et al., 2003). Considering that 10 μ M SKF-38393 was able to induce activation of the D1 receptors signaling without affecting cell survival, this dose was selected to study the role of D1 receptors on mutant htt aggregation process.

SKF-38393 treatment (10 μ M) induced a much higher number of nuclear aggregates of mutant htt-EGFP at 12 hours in comparison to saline treated cells (Fig. 3A). The antagonist SCH-23390 prevented the formation of aggregates induced by SKF-38393 (Fig. 3A). Interestingly, the nuclear aggregates in transfected cells were located in both apoptotic and non-apoptotic nuclei as revealed by counterstaining the mutant-htt transfected cells with the nuclei marker Hoechst-33342 (Fig. 3B). Nuclear aggregates of mutant htt-EGFP were observed in higher numbers at 6 and 12 hours in transfected cells treated with SKF-38393 in comparison to the treatment in combination with the antagonist SCH-23390 or without treatment (Fig. 3C). In contrast, the numbers of cytoplasmic aggregates were significantly lower in transfected cells treated with SKF-38393 at 12 and 18 hours in comparison to the treatment in combination with the antagonist SCH-23390; or without treatment (Fig. 3D). The antagonist SCH-23390 alone had no effect on the mutant htt-EGFP aggregation formation itself, which confirmed that there is no constitutive activity of D1 receptors in these cells (Sidhu and Fishman, 1990). It is noteworthy that this SKF-38393 treatment did not induce formation of nuclear or cytoplasmic aggregates in normal htt-EGFP transfected cells after 6, 12, 18 or 24 hours. This confirmed that aggregates formation following SKF-38393 treatment were selective to the mutant htt-EGFP. These results suggested that activation of D1 receptors enhanced nuclear retention or the translocation to the nucleus of mutant htt proteins, in its soluble form, where they accumulated and formed aggregates.

To verify the assumption that D1 receptors activation did interfered with the cellular localization of mutant htt-EGFP, we measured the relative amounts of htt at different time points, in nuclear and cytoplasmic fractions isolated from cells treated with SKF-38393 and transfected with either normal or mutant htt. We performed Western blot studies using an antibody against the N-terminal segment of htt at 0, 4, 8 and 12 hours, before the emergence of mutant-htt aggregates. These experiments were straightforward and revealed increased endogenous, normal as well as mutant htt levels in the nuclear fraction after 12 hours of SKF-38393 treatments; an effect prevented by a pre-treatment with SCH-23390

(Fig. 4A). In order to evaluate the quality of nuclear and cytoplasmic separation, membranes were also blotted with an antibody against the nuclear transcription factor CREB (Fig. 4A). These data suggested that increased levels of htt in nuclear fractions were independent of glutamine repeat length. In addition, accumulations of endogenous, normal and mutant htt in the nuclear fraction after SKF-38393 treatment were time-dependent (Fig. 4B-4D).

3.4.3 D1 receptor stimulation affects cell survival in mutant-htt transfected cells.

Using the MTT cell viability test, we first confirmed that transfection of mutant htt-EGFP in SK-N-MC cells decreased significantly cell viability compared to not transfected or normal htt-EGFP transfected cells after 24 hours. A treatment with 10 μ M SKF-38393 enhanced this effect of mutant htt-EGFP expressing cells. For instance, the loss in cell viability observed at 24 hours in mutant htt-EGFP expressing cells was significantly higher, by 23%, in SKF-38393 treated cells compared to saline (Fig. 5A). This result was verified and extended by counting the numbers of apoptotic nuclei using the Hoechst-33342 labeling. These experiments demonstrated as well that a treatment with 10 μ M SKF-38393 enhanced the loss of SK-N-MC that expressed mutant htt-EGFP when compared to saline treated SK-N-MC cells expressing mutant htt-EGFP. We observed that treatments with SKF-38393 increased by 23, 26 and 40% the numbers of apoptotic nuclei after a treatment of, respectively, 18, 24 and 36 hours compared to saline treatments (Fig. 5B). These effects of SKF-38393 were prevented by pre-treatments with SCH-23390 (Fig. 5A and 5B).

Mutant htt has been documented to reduce protein levels of the dopamine and cAMP-regulated phosphoprotein (DARPP-32), D1 receptors and CREB (Cha et al., 1998; Cha et al., 1999; Bibb et al., 2000; Luthi-Carter et al., 2000; van Dellen et al., 2000; Ariano et al., 2002; Spektor et al., 2002; Spires et al., 2004). In order to investigate the influence of mutant htt expression and/or D1 receptors activation on these protein levels in our cellular model, we performed Western blot analyses in total cell lysates after 12 hours post-transfection. Densitometrical analysis revealed that transfection with normal or mutant htt, treated with either SKF-38393 (10 μ M) alone or SKF-38393 (10 μ M) plus SCH-23390 (1 μ M), did not alter any of these protein levels (Fig. 6A-D).

3.4.4 Direct activation of adenylate cyclase replicates the effects of D1 receptor stimulation in mutant-htt transfected cells.

To further confirm that D1 receptors signaling system is implicated in the effects of D1 receptors agonist, we used the direct activator of adenylate cyclase forskolin in mutant htt expressing cells. Forskolin is well known to increase the intracellular levels of cAMP and activate PKA. At 12 hours post-transfection, we observed that the numbers of nuclear and cytoplasmic aggregates were significantly increased and decreased, respectively, when treated with either SKF38393 (10 μ M) or forskolin (10 μ M) (Fig. 7A and B). On the other hand, both treatments did not altered cell viability as assessed by apoptotic cells counts (Fig. 7C).

3.5 Discussion

It is unclear, up to now, whether mutant htt nuclear accumulation is implicated in HD and how critical its subcellular location is for the disease. Under our experimental conditions, normal (CAG25) and mutant (CAG103) htt-EGFP (enhanced green fluorescent proteins) are primarily cytoplasmic proteins also detectable in the nucleus. However, with time, mutant htt forms nuclear and perinuclear aggregates in SK-N-MC cells that are associated with cell death. These findings are in accordance with previously-documented studies on other cellular models, including primary neuronal cultures (Saudou et al., 1998; Hackam et al., 1999; Charvin et al., 2005). It is noteworthy though that there is no clear correlation between the appearance of aggregates and cell death. The levels of mutant htt aggregates are maximal before neuronal death and, more importantly, much lower than in apoptotic cells. It has been suggested that mutant htt is cleaved by proteases and that toxic N-terminal products containing polyglutamine tracts can be translocated to the nucleus where they form aggregates, sequester transcription factors and bind to several proteins (Bates, 2003; Sugars and Rubinsztein, 2003). In vitro experiments and animal models have demonstrated that localizing mutant htt in the nucleus increases its toxicity (Peters et al., 1999; Schilling et al., 2004; Benn et al., 2005). On the other hand, although aggregates are the common hallmark of numerous polyglutamine disorders, HD patients present little overlap between cells exhibiting nuclear aggregates and those that undergo neurodegeneration, supporting a

lack of correlation between aggregates and neuronal loss (Ross, 1997; Gutekunst et al., 1999). Some studies even propose that aggregates might be a protective mechanism, as inclusion body formation seems to reduce the risk of neuronal death (Arrasate et al., 2004; Slow et al., 2005). Possibly, htt aggregation is completely unrelated to the principal mechanism by which cell death occurs or neuronal cells accrue aggregates in response to more toxic, soluble forms of htt. For instance, it has been demonstrated that mutant htt aberrantly interacts with proteins in the cytoplasm, leading to caspase activation and, ultimately, to apoptosis (Ross, 2002; Gunawardena et al., 2003; Graham et al., 2006). While the exact mechanism of mutant htt toxicity is not fully understood, it is remarkable that additional 75 CAG repeats – the only difference between normal and mutant N-terminal fragments of the htt gene in constructs used in our experiments – are associated with cell death.

Besides accelerating the formation of nuclear aggregates, the D1 receptors agonist and forskolin induced a slight increase in cell death compared to mutant htt alone. On its own, D1 receptors activation by relatively high doses of the selective D1 receptors agonist SKF38393 (100 μ M) can elicit mitochondrial defects in and the death of SK-N-MC cells (Moussa et al., 2006). Interestingly, mutant htt alone could also interact with mitochondrial functions (Panov et al., 2002; Trushina and McMurray, 2007). Even though the D1 receptors agonist dose alone in our experiments (10 μ M) did not cause the neuronal death of SK-N-MC (Fig. 2) or transfected cells with normal htt (data not shown), it synergistically increased the toxicity of mutant htt on mitochondrial functions in these cells. Overall, such observations suggest that D1 receptors activation can have multiple effects and that there could be a separation between D1-mediated cell death and aggregate formation.

The role of dopamine receptors in the formation of mutant htt aggregates has been investigated previously in vitro (Petersen et al., 2001; Charvin et al., 2005; Tang et al., 2007). However, none of these studies assessed the outcome of direct D1 receptors activation. For instance, 1 mM of dopamine evoked the formation of aggregates and cell death in striatal primary cultures containing a portion of the human htt gene with expanded CAG repeats (Petersen 2001). In this context, D1 and D2 receptors antagonists prevented the effects of dopamine. In contrast, D2 but not D1 receptors antagonists were able to block

the formation of aggregates induced by lower dopamine doses (100 μ M) in primary cultures of striatal neurons transfected with GFP-tagged exon 1 of mutant htt (Charvin et al., 2005). In this experiment, the D2 receptors agonist enhanced the number of mutant htt aggregates in dendrites of neurons and increased cell death. Our findings concur with the latter study as we demonstrated that the D1 receptors agonist did not influence the total number of mutant htt aggregates but, rather, augmented the amount of htt in the nucleus to the detriment of cytoplasmic htt. In vivo investigations suggest that the dopamine system is involved in the striatal neuropathology associated with several conditions, including mitochondrial dysfunction (Maragos et al., 1998; Reynolds et al., 1998). Evidence of dopamine involvement in this neuropathology originates from the observation that toxicity is attenuated by pharmacologically or surgically reducing striatal dopamine availability prior to the insult. For instance, depletion of striatal dopamine, by the neurotoxin 6-hydroxydopamine, is neuroprotective against 3-nitropropionic acid-induced mitochondrial dysfunction (Maragos et al., 1998; Reynolds et al., 1998). 3-Nitropropionic acid has long been considered an experimental model of HD in rodents (Beal, 1994). More recently, tetrabenazine, which works mainly as a vesicular monoamine transporter inhibitor that lowers synaptic dopamine levels, was documented to alleviate behavioural deficits and neuronal death in the YAC128 mouse model of HD (Tang et al., 2007). In addition, using lentiviral-mediated expHtt expression in the rat striatum, it was shown that early and chronic treatment with the D2 antagonist haloperidol decanoate protected neurons from expHtt-induced dysfunction (Charvin et al., 2007). The fine line between the mechanisms that produce physiological versus destructive changes in brain striatal neurons is largely unclear. Whether htt mutation interferes with striatal dopamine receptors signaling pathways and plays a primary role in mechanisms underlying the deterioration of selective neuronal populations in HD is unknown. This intriguing hypothesis deserves further experimental evaluation.

The most remarkable result of our study was that mutant htt formed nuclear aggregates more rapidly in SK-N-MC cells when D1 receptors signaling elements were activated, either by a selective D1 agonist or forskolin. Interestingly, this effect was observed along with a decrease in cytoplasmic aggregates of mutant htt. These findings suggest that D1 receptors signaling interacts with the nuclear translocation machinery of soluble mutant htt and stimulates its entry into the nucleus or, alternatively, increases retention in the nucleus.

Htt has a nuclear export signal near its carboxy-terminus (Xia et al., 2003), and its N-terminus is thought to interact with the nuclear pore translocated promoter region, which transports htt out of the nucleus (Cornett et al., 2005). Our data demonstrate that htt accumulation in the nucleus after D1 receptors activation is independent of polyglutamine repeat length and is mediated through the N-terminus, as only the first exon of htt was used in our constructs. It has been documented that extreme sequence conservation of the first 18 amino acids of htt, prior to the polyglutamine tract, plays a role in htt nuclear accumulation and mutant htt toxicity in a striatal-derived mouse cell line (Atwal et al., 2007). These observations are particularly interesting. However, whether activation of the D1 receptors signaling system interferes with nuclear export signals or with an extremely conserved sequence requires further investigation.

Taken together, our data show that mutant htt probably interferes with several signaling pathways in both the cytoplasm and the nucleus, eventually leading to neuronal death. We believe dopamine could potentiate or amplify activation of the D1 receptors signaling machinery by mutant htt, as opposed to D1-mediated effects on cell death. This, in turn, could elicit robust inactivation of nuclear htt export. Of course, our data need to be confirmed in more sophisticated model systems, which would take into account the environmental complexity of striatal neurons, for example, cortical glutamatergic or nigral dopaminergic afferents.

Acknowledgments

We thank Dr. X.J. Li (School of Medicine, Emory University, Atlanta, GA) for the gift of EM-48 antibody.

3.6 Références

- Ariano MA, Aronin N, DiFiglia M, Tagle DA, Sibley DR, Leavitt BR, Hayden MR, Levine MS (2002) Striatal neurochemical changes in transgenic models of Huntington's disease. *J Neurosci Res* 68:716-729.
- Arrasate M, Mitra S, Schweitzer ES, Segal MR, Finkbeiner S (2004) Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death. *Nature* 431:805-810.
- Atwal RS, Xia J, Pinchev D, Taylor J, Eband RM, Truant R (2007) Huntingtin has a membrane association signal that can modulate huntingtin aggregation, nuclear entry and toxicity. *Hum Mol Genet* 16:2600-2615.
- Bates G (2003) Huntingtin aggregation and toxicity in Huntington's disease. *Lancet* 361:1642-1644.
- Beal MF (1994) Neurochemistry and toxin models in Huntington's disease. *Curr Opin Neurol* 7:542-547.
- Benn CL, Landles C, Li H, Strand AD, Woodman B, Sathasivam K, Li SH, Ghazi-Noori S, Hockly E, Faruque SM, Cha JH, Sharpe PT, Olson JM, Li XJ, Bates GP (2005) Contribution of nuclear and extranuclear polyQ to neurological phenotypes in mouse models of Huntington's disease. *Hum Mol Genet* 14:3065-3078.
- Bibb JA, Yan Z, Svenningsson P, Snyder GL, Pieribone VA, Horiuchi A, Nairn AC, Messer A, Greengard P (2000) Severe deficiencies in dopamine signaling in presymptomatic Huntington's disease mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:6809-6814.
- Carmichael J, Sugars KL, Bao YP, Rubinsztein DC (2002) Glycogen synthase kinase-3beta inhibitors prevent cellular polyglutamine toxicity caused by the Huntington's disease mutation. *J Biol Chem* 277:33791-33798.
- Cha JH, Frey AS, Alsdorf SA, Kerner JA, Kosinski CM, Mangiarini L, Penney JB, Jr., Davies SW, Bates GP, Young AB (1999) Altered neurotransmitter receptor expression in transgenic mouse models of Huntington's disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 354:981-989.
- Cha JH, Kosinski CM, Kerner JA, Alsdorf SA, Mangiarini L, Davies SW, Penney JB, Bates GP, Young AB (1998) Altered brain neurotransmitter receptors in transgenic mice expressing a portion of an abnormal human huntington disease gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:6480-6485.
- Charvin D, Roze E, Perrin V, Deyts C, Betuing S, Pages C, Regulier E, Luthi-Carter R, Brouillet E, Deglon N, Caboche J (2007) Haloperidol protects striatal neurons from dysfunction induced by mutated huntingtin in vivo. *Neurobiol Dis*.
- Charvin D, Vanhoutte P, Pages C, Borrelli E, Caboche J (2005) Unraveling a role for dopamine in Huntington's disease: the dual role of reactive oxygen species and D2 receptor stimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:12218-12223.
- Chen J, Wersinger C, Sidhu A (2003) Chronic stimulation of D1 dopamine receptors in human SK-N-MC neuroblastoma cells induces nitric-oxide synthase activation and cytotoxicity. *J Biol Chem* 278:28089-28100.
- Cornett J, Cao F, Wang CE, Ross CA, Bates GP, Li SH, Li XJ (2005) Polyglutamine expansion of huntingtin impairs its nuclear export. *Nat Genet* 37:198-204.
- Cyr M, Sotnikova TD, Gainetdinov RR, Caron MG (2006) Dopamine enhances motor and neuropathological consequences of polyglutamine expanded huntingtin. *Faseb J* 20:2541-2543.
- Davies SW, Turmaine M, Cozens BA, DiFiglia M, Sharp AH, Ross CA, Scherzinger E, Wanker EE, Mangiarini L, Bates GP (1997) Formation of neuronal intranuclear

- inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. *Cell* 90:537-548.
- DiFiglia M, Sapp E, Chase KO, Davies SW, Bates GP, Vonsattel JP, Aronin N (1997) Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science* 277:1990-1993.
- Ferrante RJ, Beal MF, Kowall NW, Richardson EP, Jr., Martin JB (1987) Sparing of acetylcholinesterase-containing striatal neurons in Huntington's disease. *Brain Res* 411:162-166.
- Ferrante RJ, Gutekunst CA, Persichetti F, McNeil SM, Kowall NW, Gusella JF, MacDonald ME, Beal MF, Hersch SM (1997) Heterogeneous topographic and cellular distribution of huntingtin expression in the normal human neostriatum. *J Neurosci* 17:3052-3063.
- Ferrante RJ, Kowall NW, Beal MF, Richardson EP, Jr., Bird ED, Martin JB (1985) Selective sparing of a class of striatal neurons in Huntington's disease. *Science* 230:561-563.
- Folstein SE (1989) Huntington's Disease. A Disorder of Families. The Johns Hopkins Press, Baltimore, MD.
- Gafni J, Hermel E, Young JE, Wellington CL, Hayden MR, Ellerby LM (2004) Inhibition of calpain cleavage of huntingtin reduces toxicity: accumulation of calpain/caspase fragments in the nucleus. *J Biol Chem* 279:20211-20220.
- Garcia M, Charvin D, Caboche J (2004) Expanded huntingtin activates the c-Jun terminal kinase/c-Jun pathway prior to aggregate formation in striatal neurons in culture. *Neuroscience* 127:859-870.
- Goffredo D, Rigamonti D, Tartari M, De Micheli A, Verderio C, Matteoli M, Zuccato C, Cattaneo E (2002) Calcium-dependent cleavage of endogenous wild-type huntingtin in primary cortical neurons. *J Biol Chem* 277:39594-39598.
- Graham RK, Deng Y, Slow EJ, Haigh B, Bissada N, Lu G, Pearson J, Shehadeh J, Bertram L, Murphy Z, Warby SC, Doty CN, Roy S, Wellington CL, Leavitt BR, Raymond LA, Nicholson DW, Hayden MR (2006) Cleavage at the caspase-6 site is required for neuronal dysfunction and degeneration due to mutant huntingtin. *Cell* 125:1179-1191.
- Gunawardena S, Her LS, Bruschi RG, Laymon RA, Niesman IR, Gordesky-Gold B, Sintasath L, Bonini NM, Goldstein LS (2003) Disruption of axonal transport by loss of huntingtin or expression of pathogenic polyQ proteins in *Drosophila*. *Neuron* 40:25-40.
- Gutekunst CA, Li SH, Yi H, Mulroy JS, Kuemmerle S, Jones R, Rye D, Ferrante RJ, Hersch SM, Li XJ (1999) Nuclear and neuropil aggregates in Huntington's disease: relationship to neuropathology. *J Neurosci* 19:2522-2534.
- Hackam AS, Singaraja R, Zhang T, Gan L, Hayden MR (1999) In vitro evidence for both the nucleus and cytoplasm as subcellular sites of pathogenesis in Huntington's disease. *Hum Mol Genet* 8:25-33.
- Harper PS (1991) Huntington's Disease. W. B. Saunders, London.
- Hayden MR (1981) Huntington's Chorea. Springer-Verlag, Berlin.
- HDColl.Res.Group (1993) A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell* 72:971-983.
- Lebel M, Robinson P, Cyr M (2007) Canadian Association of Neurosciences Review: the role of dopamine receptor function in neurodegenerative diseases. *Can J Neurol Sci* 34:18-29.
- Levine MS, Cepeda C, Hickey MA, Fleming SM, Chesselet MF (2004) Genetic mouse models of Huntington's and Parkinson's diseases: illuminating but imperfect. *Trends Neurosci* 27:691-697.

- Lunkes A, Lindenberg KS, Ben-Haiem L, Weber C, Devys D, Landwehrmeyer GB, Mandel JL, Trottier Y (2002) Proteases acting on mutant huntingtin generate cleaved products that differentially build up cytoplasmic and nuclear inclusions. *Mol Cell* 10:259-269.
- Luthi-Carter R, Strand A, Peters NL, Solano SM, Hollingsworth ZR, Menon AS, Frey AS, Spektor BS, Penney EB, Schilling G, Ross CA, Borchelt DR, Tapscott SJ, Young AB, Cha JH, Olson JM (2000) Decreased expression of striatal signaling genes in a mouse model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet* 9:1259-1271.
- Maragos WF, Jakel RJ, Pang Z, Geddes JW (1998) 6-Hydroxydopamine injections into the nigrostriatal pathway attenuate striatal malonate and 3-nitropropionic acid lesions. *Exp Neurol* 154:637-644.
- Menalled LB, Chesselet MF (2002) Mouse models of Huntington's disease. *Trends Pharmacol Sci* 23:32-39.
- Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG (1998) Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 78:189-225.
- Moussa CE, Tomita Y, Sidhu A (2006) Dopamine D1 receptor-mediated toxicity in human SK-N-MC neuroblastoma cells. *Neurochem Int* 48:226-234.
- Panov AV, Gutekunst CA, Leavitt BR, Hayden MR, Burke JR, Strittmatter WJ, Greenamyre JT (2002) Early mitochondrial calcium defects in Huntington's disease are a direct effect of polyglutamines. *Nat Neurosci* 5:731-736.
- Peters MF, Nucifora FC, Jr., Kushi J, Seaman HC, Cooper JK, Herring WJ, Dawson VL, Dawson TM, Ross CA (1999) Nuclear targeting of mutant Huntingtin increases toxicity. *Mol Cell Neurosci* 14:121-128.
- Petersen A, Larsen KE, Behr GG, Romero N, Przedborski S, Brundin P, Sulzer D (2001) Expanded CAG repeats in exon 1 of the Huntington's disease gene stimulate dopamine-mediated striatal neuron autophagy and degeneration. *Hum Mol Genet* 10:1243-1254.
- Reynolds DS, Carter RJ, Morton AJ (1998) Dopamine modulates the susceptibility of striatal neurons to 3-nitropropionic acid in the rat model of Huntington's disease. *J Neurosci* 18:10116-10127.
- Ross CA (1997) Intranuclear neuronal inclusions: a common pathogenic mechanism for glutamine-repeat neurodegenerative diseases? *Neuron* 19:1147-1150.
- Ross CA (2002) Polyglutamine pathogenesis: emergence of unifying mechanisms for Huntington's disease and related disorders. *Neuron* 35:819-822.
- Saudou F, Finkbeiner S, Devys D, Greenberg ME (1998) Huntingtin acts in the nucleus to induce apoptosis but death does not correlate with the formation of intranuclear inclusions. *Cell* 95:55-66.
- Schilling G, Savonenko AV, Klevytska A, Morton JL, Tucker SM, Poirier M, Gale A, Chan N, Gonzales V, Slunt HH, Coonfield ML, Jenkins NA, Copeland NG, Ross CA, Borchelt DR (2004) Nuclear-targeting of mutant huntingtin fragments produces Huntington's disease-like phenotypes in transgenic mice. *Hum Mol Genet* 13:1599-1610.
- Sidhu A, Fishman PH (1990) Identification and characterization of functional D1 dopamine receptors in a human neuroblastoma cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 166:574-579.
- Sidhu A, Olde B, Humblot N, Kimura K, Gardner N (1999) Regulation of human D1 dopamine receptor function and gene expression in SK-N-MC neuroblastoma cells. *Neuroscience* 91:537-547.
- Slow EJ, Graham RK, Hayden MR (2006) To be or not to be toxic: aggregations in Huntington and Alzheimer disease. *Trends Genet* 22:408-411.
- Slow EJ, Graham RK, Osmand AP, Devon RS, Lu G, Deng Y, Pearson J, Vaid K, Bissada N, Wetzel R, Leavitt BR, Hayden MR (2005) Absence of behavioral abnormalities and

- neurodegeneration in vivo despite widespread neuronal huntingtin inclusions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:11402-11407.
- Spektor BS, Miller DW, Hollingsworth ZR, Kaneko YA, Solano SM, Johnson JM, Penney JB, Jr., Young AB, Luthi-Carter R (2002) Differential D1 and D2 receptor-mediated effects on immediate early gene induction in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Brain Res Mol Brain Res* 102:118-128.
- Spires TL, Grote HE, Varshney NK, Cordery PM, van Dellen A, Blakemore C, Hannan AJ (2004) Environmental enrichment rescues protein deficits in a mouse model of Huntington's disease, indicating a possible disease mechanism. *J Neurosci* 24:2270-2276.
- Strong TV, Tagle DA, Valdes JM, Elmer LW, Boehm K, Swaroop M, Kaatz KW, Collins FS, Albin RL (1993) Widespread expression of the human and rat Huntington's disease gene in brain and nonneural tissues. *Nat Genet* 5:259-265.
- Sugars KL, Rubinsztein DC (2003) Transcriptional abnormalities in Huntington disease. *Trends Genet* 19:233-238.
- Tang TS, Chen X, Liu J, Bezprozvanny I (2007) Dopaminergic signaling and striatal neurodegeneration in Huntington's disease. *J Neurosci* 27:7899-7910.
- Trushina E, McMurray CT (2007) Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. *Neuroscience* 145:1233-1248.
- van Dellen A, Welch J, Dixon RM, Cordery P, York D, Styles P, Blakemore C, Hannan AJ (2000) N-Acetylaspartate and DARPP-32 levels decrease in the corpus striatum of Huntington's disease mice. *Neuroreport* 11:3751-3757.
- Vonsattel JP, Myers RH, Stevens TJ, Ferrante RJ, Bird ED, Richardson EP, Jr. (1985) Neuropathological classification of Huntington's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 44:559-577.
- Wheeler VC, White JK, Gutekunst CA, Vrbanac V, Weaver M, Li XJ, Li SH, Yi H, Vonsattel JP, Gusella JF, Hersch S, Auerbach W, Joyner AL, MacDonald ME (2000) Long glutamine tracts cause nuclear localization of a novel form of huntingtin in medium spiny striatal neurons in HdhQ92 and HdhQ111 knock-in mice. *Hum Mol Genet* 9:503-513.
- Xia J, Lee DH, Taylor J, Vandelft M, Truant R (2003) Huntingtin contains a highly conserved nuclear export signal. *Hum Mol Genet* 12:1393-1403.

3.6 Figure legends

Figure 1. Formation of cytoplasmic and nuclear aggregates in SK-N-MC cells expressing mutant htt. A: Example of the cellular localization of htt-EGFP at 12 and 24 hours after transfection with the normal (CAG25) or the mutant (CAG103) htt constructs in SK-N-MC cells. Arrows are showing aggregates of mutant htt-EGFP. Scale bar represents 10 μ m. B: Numbers of cytoplasmic or nuclear aggregates observed in cells at 6, 12 and 18 hours after transfection with the mutant-htt constructs. Data are expressed in mean percent of transfected cells \pm S.E.M., n = 4 triplicate experiments/time point. Statistical analysis was performed using a one-way ANOVA followed by Newman-Keuls post hoc test. ** p < 0.01 vs respective group data at 6 hours and ## p < 0.01 vs respective group data at 12 hours. C: MTT cell proliferation assay was performed in SK-N-MC cells at 12 and 24 hours after transfection with the normal and mutant htt constructs. Data are expressed as mean percent of control \pm S.E.M., n = 3 quadruplicate experiments/time points. Statistical analysis was performed using a one-way ANOVA followed by Neuman-Keuls post hoc test. * p < 0.05 and *** p < 0.001 vs control group at respective time point; ## p < 0.01 vs control group at 24 hours post-transfection. D: Number of apoptotic nuclei in SK-N-MC cells transfected with normal or mutant htt constructs, was evaluated at 12, 24, 36 and 48 hours using the Hoechst-33342. Data are expressed in mean percent of transfected cells \pm S.E.M., n = 3 triplicate experiments/time point. Statistical analysis was performed using a two-way ANOVA followed by Bonferroni's post-tests. * p < 0.05 and ** p < 0.01 vs normal-htt constructs at respective time point.

Figure 2. D1 receptors expressed endogenously in SK-N-MC cells are functional. A: Western blotting experiments were performed on total cell extract (30 μ g of proteins/lane) from SK-N-MC cells (16 hours) treated with 1, 10 and 100 μ M of the D1 receptor agonist SKF38393 or with 100 μ M SKF38393 plus 1 μ M SCH23390 (D1 receptor antagonists). Membranes were simultaneously blotted with antibodies directed against either phosphorylated-CREB at serine 133 or GAPDH (loading control). B: Densitometry analysis is shown as the average percent of control \pm S.E.M., n = 3 triplicate experiments/treatment. C: MTT cell proliferation assay of SK-N-MC cells treated with 1, 10 or 100 μ M SKF38393 during 16 hours. Data are expressed as mean percent of control \pm S.E.M.; n = 3 quadruplicate experiments/time point. Statistical analysis was performed

using a one-way ANOVA followed by Neuman-Keuls post hoc test. ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ vs saline; ### $p < 0.001$ vs $100\mu\text{M}$ SKF38393.

Figure 3. Activation of D1 receptors increases the formation of nuclear, but not cytoplasmic, aggregates in SK-N-MC cells expressing mutant htt. A: Representative examples of the localization of the EGFP-mutant htt expressed in SK-N-MC cells after a treatment of 12 hours with SKF38393 ($10\mu\text{M}$) with or without SCH23390 ($1\mu\text{M}$). Thin arrows are showing nuclear aggregates of mutant htt. B: Nuclear aggregates of EGFP-mutant htt were identified by using the nuclear marker Hoechst 33342. Thin arrows are showing nuclear aggregates of mutant htt and the thick arrow is showing a nucleus with condensed chromatin, which is presumably a sign of apoptosis. Numbers of SK-N-MC cells transfected with the mutant-htt constructs showing cytoplasmic C: or nuclear D: aggregates after treatments with SKF38393 ($10\mu\text{M}$) with or without SCH23390 ($1\mu\text{M}$). Data are expressed in mean percent of transfected cells showing nuclear or cytoplasmic aggregates \pm S.E.M., $n = 3$ triplicate experiments/time point. Statistical analysis was performed using a one-way ANOVA followed by Newman-Keuls post hoc test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ vs respective saline treated.

Figure 4. Activation of D1 receptors time-dependently increases the amount of nuclear htt in SK-N-MC cells. (A) Representative examples of Western blotting experiments performed in nuclear and cytoplasmic fractions ($30\mu\text{g}$ of proteins/lane) extracted from control and transfected SK-N-MC cells treated with $10\mu\text{M}$ of SKF38393 or with $10\mu\text{M}$ SKF38393 plus $1\mu\text{M}$ SCH23390. Membranes were simultaneously blotted with antibodies directed against the N-terminal of htt or, to control for fractions' purity, the nuclear protein CREB. Left panel is showing endogenous htt proteins at $\sim 350\text{KDa}$ in control cells. Right panel is showing normal (CAG25; $\sim 33\text{KDa}$) and mutant (CAG103; $\sim 48\text{KDa}$) htt proteins in transfected cells. Nuclear and cytoplasmic protein amounts were quantified relative to nuclear and cytoplasmic load controls (GAPDH). Densitometry analysis reveals (B) the relative amounts of endogenous htt proteins in the nuclear and cytoplasmic fractions of control cells as well as the relative amounts of (C) normal (CAG25) and (D) mutant (CAG103) htt proteins in the nuclear and cytoplasmic fractions of transfected cells. Cells were treated with $10\mu\text{M}$ of SKF38393 for 0, 4, 8 and 12 hours or with $10\mu\text{M}$ SKF38393 plus $1\mu\text{M}$ SCH23390 for 12 hours. Data are shown as the average percent of control from

htt proteins/GAPDH ratios (control values were the amount of proteins measured in the respective nuclear fraction at time 0) \pm S.E.M., $n = 2$ duplicate experiments/treatment. Statistical analysis was performed using a two-way ANOVA followed by Bonferroni's post-tests. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ vs corresponding nuclear fraction.

Figure 5 Activation of D1 receptors impaired cell viability in SK-N-MC cells transfected with mutant htt. (A) MTT cell proliferation assay in SK-N-MC cells transfected with either the normal or mutant htt constructs, and treated with SKF38393 (10 μ M) alone or in combination with SCH23390 (1 μ M). (B) Percentage of apoptotic nuclei was determined by counting cells with condensed chromatin or fragmented nucleus as revealed by Hoechst-33342 DNA staining. Data are expressed as means \pm S.E.M., $n = 3$ triplicate experiments/time point. Statistical analysis was performed by a two-way ANOVA followed by Bonferroni's post-tests. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs saline.

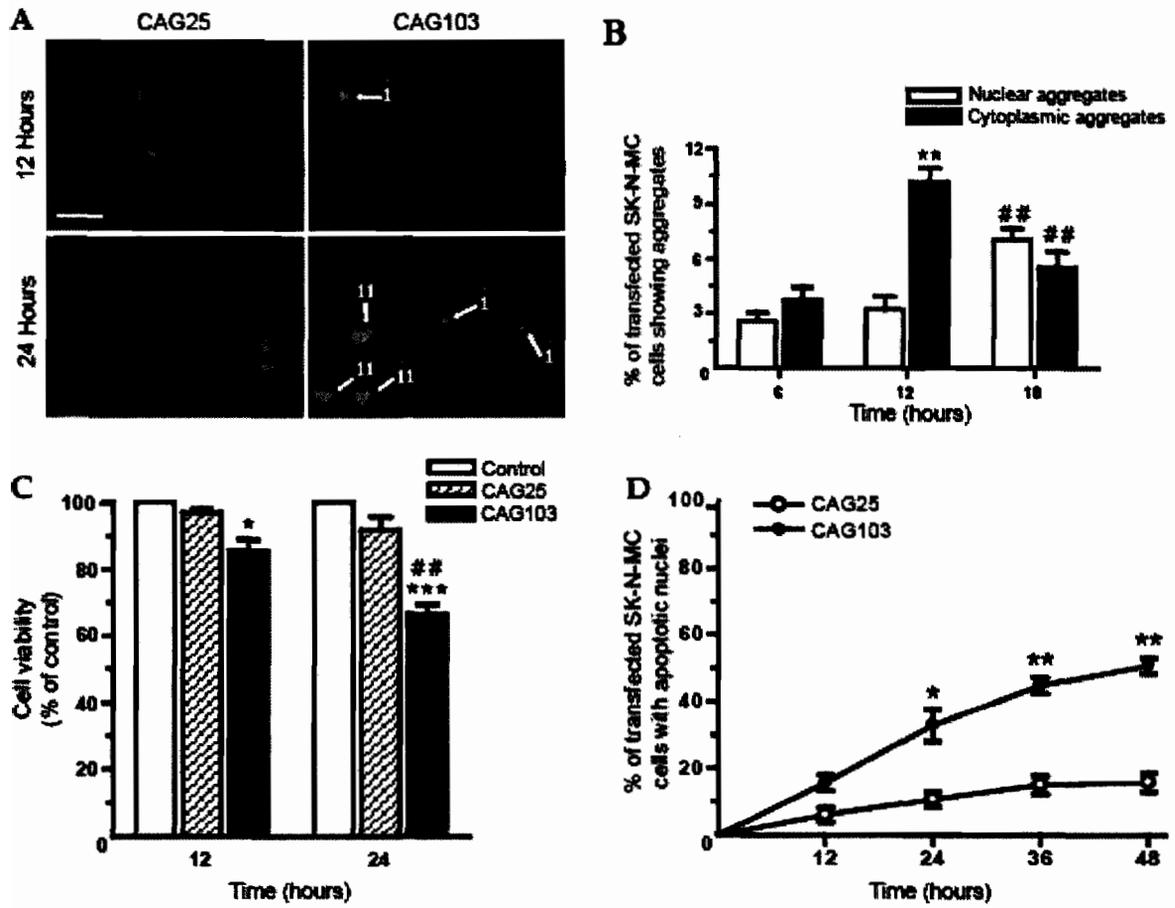
Figure 6 Mutant htt did not change levels of DARPP-32, D1 receptors and CREB in SK-N-MC cells. (A) Representative examples of western blot experiments performed using 30 μ g of protein from total cell extracts and antibodies directed against DARPP-32, D1 receptors and CREB. Each membrane was simultaneously blotted with GAPDH (as a loading control). (B, C and D) Densitometrical analysis revealing the protein levels of DARPP-32, D1 receptors and CREB in transfected cells with normal or mutant constructs, treated either with (10 μ M) SKF38393 alone, or in a co-treatment with a D1 receptor antagonist and SCH23390 (1 μ M). Statistical analyses were performed by a two-way ANOVA followed by Bonferroni's post-tests. All data are expressed as the average percent of respective control (untransfected cells) \pm S.E.M., $n = 3$ triplicate experiments/treatment. Statistical analysis was performed using a one-way ANOVA followed by Newman-Keuls post hoc test; there were no statistically significant changes.

Figure 7. Direct activation of adenylyl cyclase by forskolin increases the formation of nuclear aggregates in SK-N-MC cells expressing mutant htt. Numbers of SK-N-MC cells transfected with the mutant-htt constructs showing nuclear (A) or cytoplasmic (B) aggregates after 12 hours treatments with SKF38393 (10 μ M) or forskolin (10 μ M). (C) Data are expressed in mean percent of transfected cells showing nuclear or cytoplasmic aggregates \pm S.E.M., $n = 3$ triplicate experiments/time point. Statistical analysis was

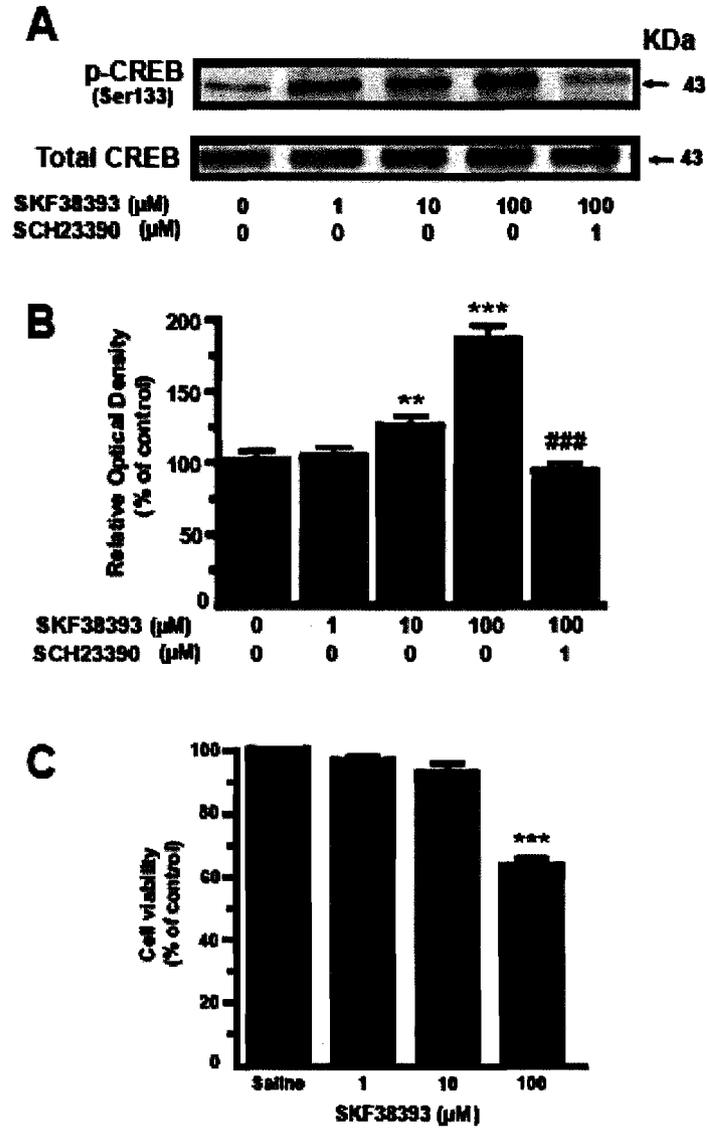
performed using a one-way ANOVA followed by Newman-Keuls post hoc test. * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$ vs respective saline treated.

3.7 Figures

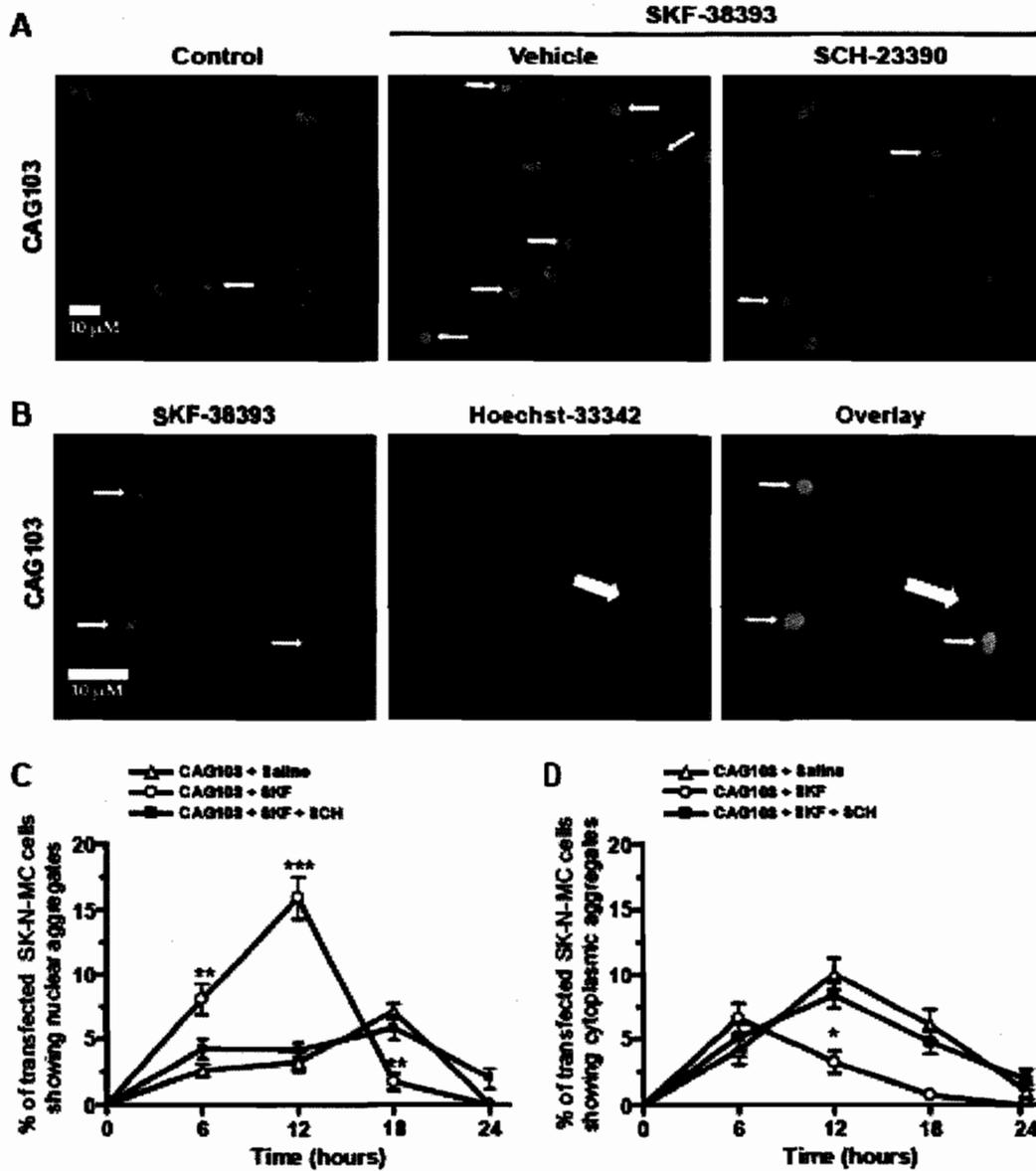
3.7.1 Figure 1 (A, B, C and D)



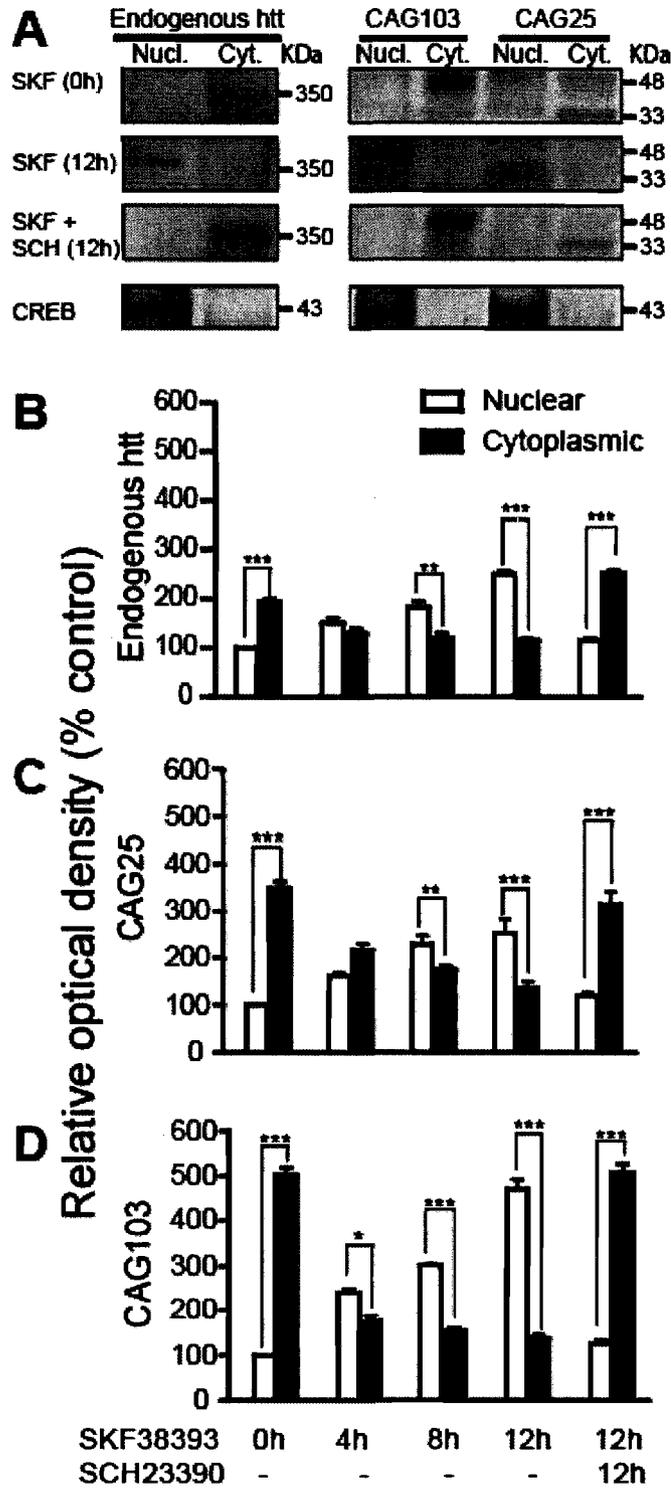
3.7.2 Figure 2 (A, B and C)



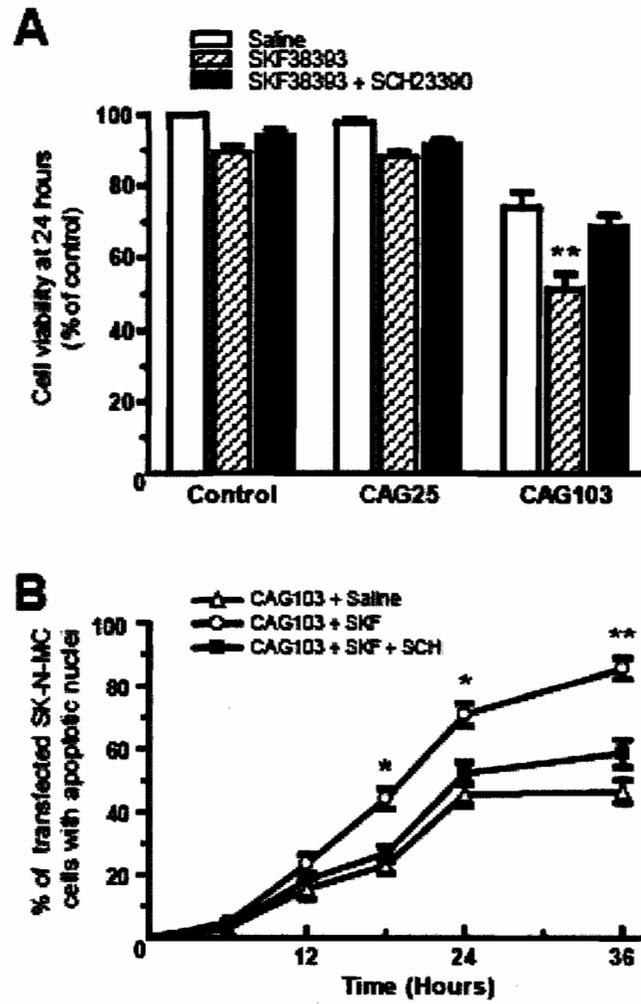
3.7.3 Figure 3 (A, B, C and D)



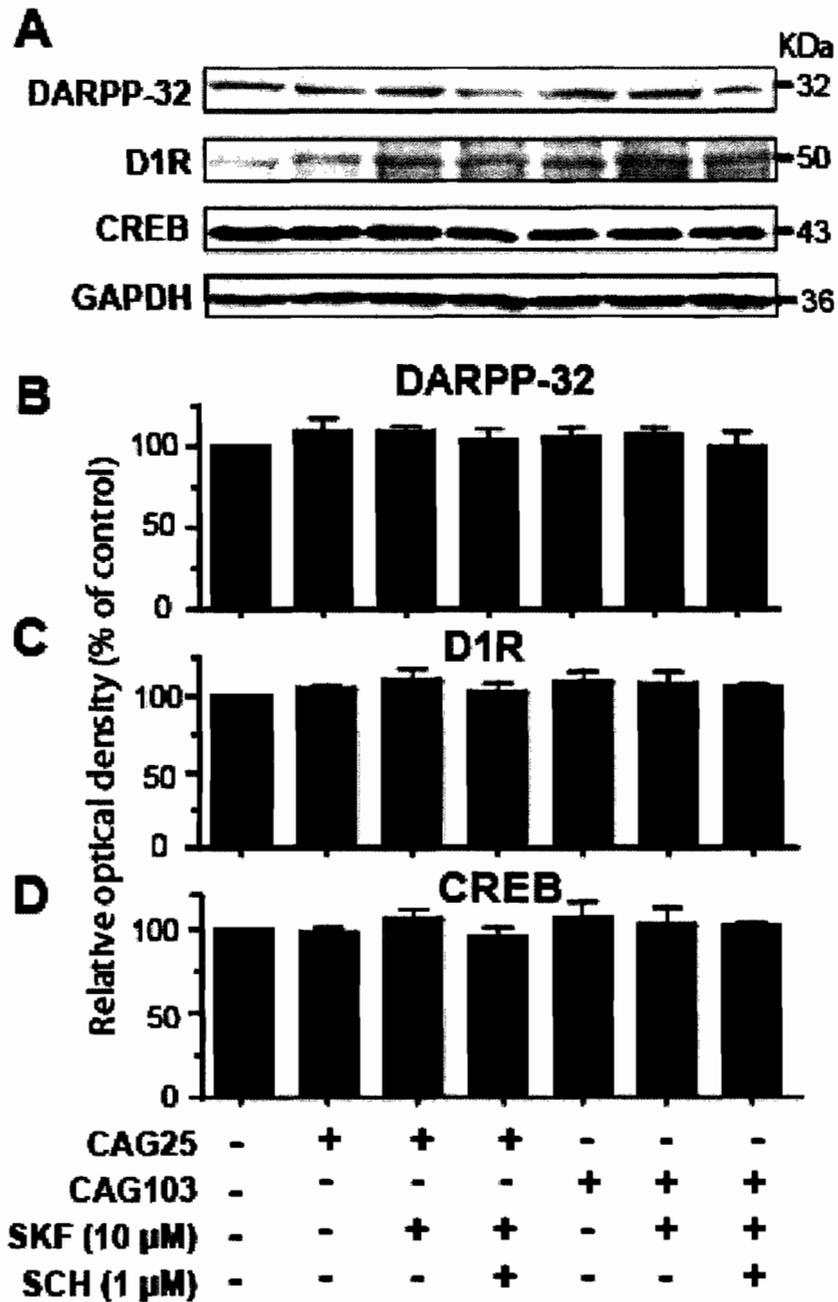
3.7.4 Figure 4 (A, B, C and D)



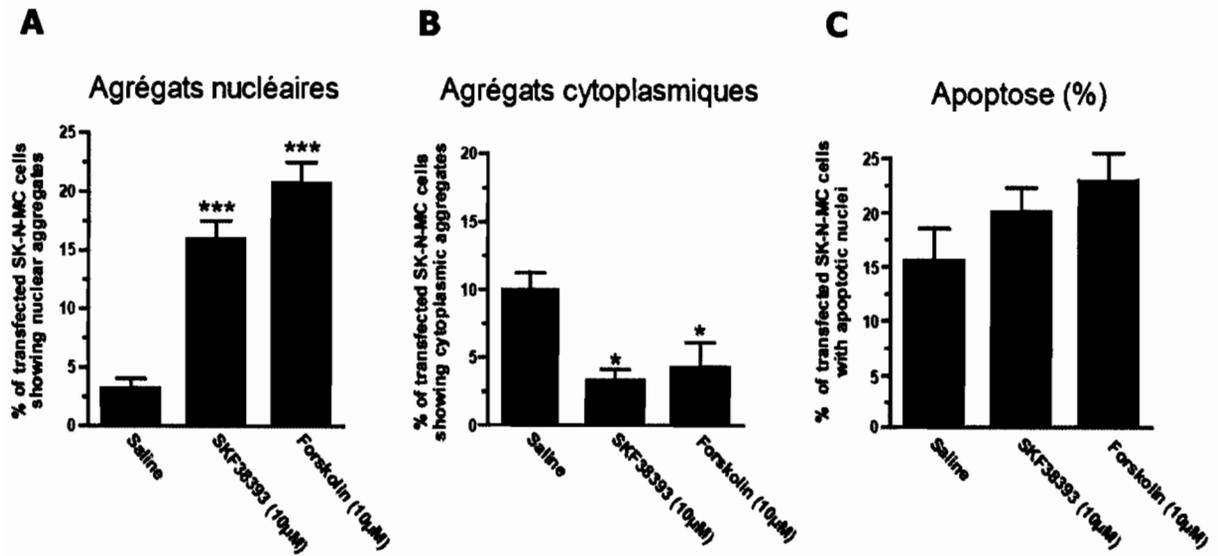
3.7.5 Figure 5 (A and B)



3.7.6 Figure 6 (A,B, C, and D)



3.7.7 Figure 7 (A, B and C)



CHAPITRE 4

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

4.1 Discussion

Depuis la découverte du gène mutant (IT15) qui est responsable de HD, des efforts considérables ont été déployés afin d'élucider les mécanismes pathologiques prenant place au cours de l'évolution de HD. Au cours de notre étude, nous avons développé un modèle cellulaire de HD afin d'être en mesure de déterminer l'effet d'une activation de la voie de signalisation du D1R sur le processus d'agrégation de la protéine htt mutante (exphtt). Pour ce faire, nous avons transfecté la forme normale de htt et la forme mutante exphtt dans les cellules SK-N-MC. Nous avons déterminé l'effet de la présence de exphtt sur la survie cellulaire, et aussi suite à une stimulation du D1R. Dans ce modèle *in vitro*, nous avons démontré que l'expression de exphtt a induit la formation d'agrégats nucléaires et cytoplasmiques, et a affecté la survie cellulaire en fonction du temps. Cet effet a été principalement dû à la présence de l'expansion CAG de la séquence mutante utilisée. Parallèlement, il a été observé qu'un plus grand nombre d'agrégats ont été localisés dans le noyau suite à un traitement avec un agoniste du D1R, le SKF-38393. La présence d'agrégats nucléaires n'a pas été corrélée avec une augmentation dans le nombre de noyaux apoptotiques indiquant que exphtt pourrait induire la mort cellulaire selon d'autres mécanismes pathologiques. Les résultats obtenus suite à notre étude, démontrent donc le rôle possible de la voie de signalisation du D1R dans l'évolution du processus d'agrégation au cours de HD. De plus, ces données suggèrent qu'une diminution de l'activation de ce récepteur au niveau du striatum pourrait avoir une influence sur la localisation des agrégats nucléaires et cytoplasmiques.

Dans un premier temps, nous avons voulu évaluer la validité du modèle neuronal choisi en fonction des caractéristiques particulières de exphtt *in vitro*. Un modèle neuronal approprié pour étudier HD se doit de respecter certaines conditions afin d'être jugé représentatif de l'effet que produit exphtt dans les neurones chez l'humain. Premièrement, les cellules exprimant exphtt doivent subir une dégénérescence progressive en fonction d'un nombre de

répétitions CAG supérieur ou égal à 40. Deuxièmement, la forme mutante de la protéine doit démontrer la formation d'agrégats cytoplasmiques et nucléaires en fonction du temps, contrairement à la forme normale qui elle, ne forme aucun agrégat.

Les constructions d'ADNc utilisées (Hereditary Disease Foundation Resource Bank, UCLA) correspondaient à l'exon-1 du gène IT15 avec 25 (CAG25) et 103 (CAG103) répétitions CAG à son extrémité 5', constituant ainsi respectivement la forme normale et mutante de la protéine. À son extrémité 3', une séquence codant la pour la Green Fluorescent Protein (GFP) était présente pour les deux plasmides utilisés. L'utilisation de la GFP permet de visualiser la localisation de la protéine et des agrégats en microscopie à fluorescence. Ces séquences ont été précisément choisies pour deux raisons, soient: i) des études sur les modèles murins de HD ont démontré que l'exon-1 de expHtt est suffisant pour causer le phénotype de HD et que, ii) l'exon-1 de expHtt est reconnu pour avoir des propriétés pathogéniques incluant la formation d'agrégats et des interactions avec certains facteurs de transcription possédant, eux aussi, une séquence polyQ pouvant ainsi altérer la transcription de nombreux gènes.

La séquence utilisée comprenait les 300 premiers acides aminés (1-300) de la protéine humaine htt et il était alors normal de s'attendre à observer la formation d'agrégats avec la forme mutante contenant l'expansion polyQ. Lorsque traduite, la séquence CAG103 utilisée correspond au fragment N-terminal de exphtt contenant la séquence polyQ. Ces fragments sont maintenant reconnus comme étant les principaux constituants des agrégats formés à l'intérieur du noyau et du cytoplasme dans d'autres modèles cellulaires (Cooper et al., 1998). Il a donc été possible d'évaluer l'effet de l'activation de la voie de signalisation du D1R dans un contexte où les caractéristiques pathologiques de HD sont reproduites *in vitro*.

Les cellules transfectées avec CAG103, contrairement à CAG25, ont démontré une agrégation et une mort cellulaire en fonction du temps. Les deux plasmides utilisés étaient en tout point identiques excepté pour l'expansion CAG. Ce qui permet donc de supposer que la formation d'agrégats et la mort cellulaire observée semblent uniquement associés à l'expansion CAG présente sur la séquence de CAG103. Au cours de cette étude, deux types d'agrégats ont été observés dans les cellules SK-N-MC transfectées avec CAG103, soit

ceux de type nucléaire ou de type cytoplasmique. Les deux types d'agrégats ont démontré une certaine variation en fonction du temps. Entre 6 et 18 heures post-transfection, il y a eu un changement dans la distribution entre le nombre d'agrégats cytoplasmiques et nucléaires. L'effet le plus significatif observé fut une augmentation dans le nombre d'agrégats nucléaires tandis que ceux de type cytoplasmiques ont augmenté de façon plus progressive en fonction du temps. Ces données démontrent effectivement que l'expression de CAG103, dans les cellules SK-N-MC, induit la formation d'agrégats.

De plus, la présence de CAG103 a induit une mort progressive dans le temps comparativement à CAG25 qui n'a pas induit de mort neuronale significative aux différents temps observés. À 24 heures post-transfection, les cellules transfectées avec CAG25 ont démontré seulement 10% d'apoptose et environ 20% à 48 heures. Cet effet fut statistiquement non-significatif lorsque comparé à l'effet produit sur les cellules non-transfectées (contrôle), ce qui démontre que la transfection n'a pas affecté négativement la survie cellulaire. Cependant, avec CAG103, la mort apoptotique a respectivement été de 33% à 24 heures et de 52% à 48 heures. Le test de viabilité cellulaire MTT a par la suite permis de confirmer les résultats obtenus en microscopie démontrant la relation entre la formation d'agrégats et une diminution de la survie des cellules SK-N-MC.

Le modèle choisi a répondu aux caractéristiques de HD *in vitro* (Figure 1A, 1B et 1C) et a donc permis une investigation plus intensive du phénomène d'agrégation. De plus, il a été possible de procéder à l'analyse de différents paramètres biochimiques pouvant être impliqués dans HD. Certaines de ces analyses (western blot) ont été rendues possibles grâce au haut taux de transfection obtenu (70%) avec l'utilisation des cellules SK-N-MC.

Lors de la deuxième étape du projet, nous avons voulu déterminer la fonctionnalité du récepteur D1, en évaluant le niveau de phosphorylation de CREB au site sérine 133 (Ser¹³³). Il s'agit du site de phosphorylation de PKA suite à une augmentation de l'AMPc intracellulaire causée par l'activation du D1R (figure 1.9.5). Suite à un traitement avec un agoniste sélectif du D1R (SKF-38393), les cellules SK-N-MC ont démontré une augmentation dans le niveau de phosphorylation de CREB (pCREBSer133). Cet effet a été renversé en présence de l'antagoniste sélectif du D1R, le SCH-23390, lorsque comparé aux cellules contrôles. Ces données démontrent donc la fonctionnalité du récepteur et

permettent de conclure que l'augmentation dans le niveau de pCREB est directement reliée à l'activation du D1R. Les résultats obtenus (Figure 2A et 2B) démontrent une augmentation significative de pCREB suivant un traitement de 10 μ M et 100 μ M avec l'agoniste SKF-38393. À forte dose, les agonistes dopaminergiques comme le SKF-38393 peuvent induire une mort cellulaire associée à une stimulation excessive des récepteurs. Ce qui a pour effet de causer l'activation de certaines voies de signalisation induisant une mort cellulaire comme celle de « Jun N-terminal kinase » (JNK) et la production d'oxyde nitrique (NO) (Moussa et al., 2005). Prenant ces données en considération, j'ai donc par la suite voulu déterminer la dose la plus appropriée pour obtenir une phosphorylation significative de pCREB mais sans toutefois causer une mort cellulaire associée à l'activation excessive du D1R et de certaines voies pro-apoptotiques.

Selon les résultats obtenus avec le test de viabilité cellulaire MTT, il a été observé qu'avec une dose de 100 μ M de SKF-38393, une perte de près de 30% dans la viabilité cellulaire se produit contrairement à moins de 10% pour une dose de 10 μ M. Nous avons donc choisi une dose de 10 μ M afin d'obtenir une augmentation significative de pCREB mais sans toutefois causer une mort cellulaire n'étant associée à l'expression de l'expansion polyQ. L'utilisation d'une concentration sub-létale de l'agoniste SKF-38393, a donc permis de déterminer le véritable effet d'une stimulation de la voie de signalisation du D1R (cAMP/pPKA/pCREB/) sur le processus d'agrégation de exphtt dans un modèle cellulaire neuronal.

Les cellules transfectées avec CAG103 ou CAG25, ont par la suite été traitées avec l'agoniste SKF-38393. En présence de l'agoniste, les agrégats formés par exphtt ont été préférentiellement localisés dans le noyau des cellules (17%) à 12 heures post-transfection, comparativement aux agrégats cytoplasmiques (3%) qui eux, ont subi une importante diminution. Il est important de mentionner que ce temps correspond au moment où le nombre maximal d'agrégats nucléaire observé. Par ailleurs notre étude a révélée que la forte présence de ces agrégats nucléaires ne compromet pas la survie neuronale 12 heures post-transfection. Ces résultats sont en lien avec une autre étude réalisée dans un modèle murin de HD ayant démontré la présence d'agrégats nucléaires avant l'apparition des dysfonctions motrices et de la mort neuronale (Levine et al., 2004). Au-delà de 24 heures, nous avons observés dans les cellules SK-N-MC un très faible pourcentage des cellules

ayant des agrégats nucléaires et cytoplasmiques, même si le nombre de cellules apoptotiques a continué d'augmenter. L'absence des deux types d'agrégats, au-delà de 24 heures post-transfection, démontre que la forme soluble des fragments N-terminaux de exphtt semble aussi être toxique pour la cellule mais en agissant probablement selon d'autres mécanismes. Ce qui suggère que la formation d'agrégats semble être une étape préalable à la neurodégénérescence, étant donné la diminution du nombre d'agrégats en fonction de l'augmentation du taux d'apoptose. Cependant, la présence de ces agrégats témoigne tout de même des dysfonctions cellulaires importantes engendrées par la présence de exphtt.

Dans le but de confirmer si c'est l'activation elle-même du D1R est responsable de la variation dans la localisation des agrégats de exphtt, les cellules transfectées avec CAG103 ont aussi été traitées avec l'antagoniste du D1R, le SCH-23390. Ce traitement a été effectué préalablement à l'ajout de l'agoniste SKF-38393 dans le milieu de culture. L'effet obtenu avec le SKF-38393, *i.e.* l'augmentation de l'agrégation nucléaire, a été renversé en présence de l'antagoniste SCH-23390. Ces données ont confirmé que l'augmentation du nombre d'agrégats nucléaires, dans les cellules SK-N-MC est directement reliée à l'activation de la voie de signalisation du D1R et possiblement à une augmentation de l'AMPC intracellulaire.

Dans le but de reproduire l'effet d'une activation du D1R par une augmentation de l'AMPC, la forskolin fut utilisée. La forskolin (7 beta-acetoxy-8, 13-epoxy-1 alpha, 6 beta, 9 alpha-trihydroxy-labd-14-ene-11-one) est une molécule provenant de la plante *Coleus forskohlii* et est utilisée en recherche médicale pour augmenter les niveaux d'AMPC. Cette molécule agit en activant directement l'adénylate cyclase, qui est une protéine transmembranaire activée lors de la stimulation du D1R. Cette molécule permet donc de produire un effet similaire à la stimulation du D1R, *i.e.* une augmentation de l'AMPC, sans toutefois causer l'activation du récepteur. Cet avantage nous a donc offert la possibilité d'évaluer si l'augmentation dans le nombre de cellules possédant des agrégats nucléaires était reliée à une augmentation de l'AMPC intracellulaire. L'effet obtenu avec la forskolin sur l'agrégation nucléaire et l'apoptose a été similaire à celui obtenu lors du traitement avec le SKF-38393. Ces résultats suggèrent donc qu'une plus grande translocation des agrégats ou de la portion N-terminale de exphtt à l'intérieur du noyau, s'effectue par le biais de

mécanismes qui nécessitent l'activation de l'adénylate cyclase dans les cellules SK-N-MC. De plus, l'effet de la forskolin ou le SKF-38393 sur l'adénylate cyclase, a causé une augmentation de l'agrégation nucléaire mais n'a pas influencé la survie cellulaire à 12 heures post-transfection.

Il est intéressant de constater que le changement dans la localisation des agrégats soulève alors une question importante. Est-ce que la stimulation du DIR induit la translocation des agrégats du cytoplasme vers le noyau, ou est-ce plutôt la forme soluble de exphtt qui est transportée jusqu'au noyau pour ensuite s'y accumuler et former les agrégats nucléaires caractéristiques de la maladie. Les étapes nécessaires au transport de exphtt sont encore jusqu'à maintenant inconnues de même que les interactions possibles des fragments N-terminaux à l'intérieur du noyau. Il est certain que la forme entière de exphtt est suffisamment grande pour nécessiter une sorte de transport actif afin de pouvoir pénétrer à l'intérieur de l'enveloppe nucléaire. D'autre part, la partie N-terminale de la forme clivée de exphtt, similaire à celle utilisée dans notre étude, pourrait diffuser à travers le noyau de façon passive par des mécanismes inconnus ou bien en association avec des protéines de transport reliées au pore nucléaire.

Jusqu'à maintenant, plusieurs sites de clivage ont été identifiés au niveau de la portion N-terminale de exphtt. Le blocage de ces sites de clivage a démontré une diminution de la neurodégénérescence observée en présence de fragments N-terminaux. Les mêmes résultats ont été obtenus avec l'utilisation d'inhibiteurs de caspases et de protéases. Ces données suggèrent que la toxicité induite par exphtt ne semble pas être reliée à la forme entière de la protéine mais plutôt à la portion N-terminale clivée et possédant l'élongation polyQ. De plus, l'inhibition de l'agrégation cytoplasmique et nucléaire de exphtt réduit aussi la mort neuronale *in vitro*, démontrant une corrélation entre l'agrégation et la neurodégénérescence (Jana et al., 2000; Carmichael et al., 2000).

Cependant, d'autres études ont démontré que la formation d'agrégats nucléaires et l'apoptose ne sont pas directement reliés (Saudou et al., 1998) confirmant ainsi nos observations et le fait que la présence d'agrégats n'est toujours associée avec une mort neuronale. La formation d'agrégats nucléaires pourrait donc, en quelque sorte, permettre à la cellule d'isoler cette portion N-terminale toxique de la protéine du reste de la cellule afin

d'éviter de causer des dommages à l'environnement cellulaire. Ces résultats suggèrent aussi que la formation d'agrégats nucléaires ne semble pas directement induire la neurodégénérescence mais pourrait plutôt constituer une sorte de mécanisme de défense contre les fragments N-terminaux de exphtt. Cependant, à plus long terme, la présence de ces agrégats semble causer des dysfonctions cellulaires qui vont éventuellement mener à la mort de la cellule. Cette étude (Saudou et al., 1998) a par ailleurs démontrée que la toxicité induite par l'expression de exphtt pourrait se faire de façon indépendante à la présence d'agrégats. Toutefois, le rôle véritable des agrégats reste encore aujourd'hui un sujet controversé et devra faire l'objet d'une investigation plus intensive afin de mieux comprendre ce phénomène et son rôle dans HD.

D'autre part, il a été démontré que les fragments N-terminaux de exphtt et htt, n'ont pas révélé la présence de la séquence de localisation nucléaire (NLS) ou de la séquence d'exportation nucléaire (NES). Ces deux séquences permettent à certaines protéines d'être importées (NLS) ou exportées (NES) du noyau pour effectuer leur fonction. L'addition d'une séquence NES sur la portion N-terminale de exphtt dans des cultures primaires de neurones, diminue considérablement la présence d'agrégats nucléaires et de même que la neurodégénérescence (Saudou et al., 1998). Ces données suggèrent une diffusion passive des fragments N-terminaux de exphtt, ne contenant pas la séquence NES, qui peuvent alors par la suite s'accumuler à l'intérieur du noyau et former les agrégats nucléaires. La localisation préférentielle des fragments N-terminaux de exphtt dans le noyau des neurones du striatum suggère que l'effet sur les différents facteurs de transcription est plus susceptible d'affecter les fonctions neuronales tôt dans l'évolution de HD (Cooper et al., 1998).

Il est maintenant bien connu que l'expansion de la séquence polyQ de exphtt cause un mauvais repliement de la protéine et que ce phénomène semble être l'une des causes de la formation des agrégats. Ce changement conformationnel produit des interactions avec une variété d'autres protéines qui vont par la suite s'associer avec exphtt par le biais de leur séquence polyQ (Perutz, M.1994). Étant donné que exphtt se localise au noyau et au cytoplasme, et qu'elle interagit avec plusieurs protéines, il est fort probable qu'elle puisse affecter un nombre significatif de mécanismes importants pour la survie cellulaire.

Dans le but de vérifier si exphtt influençait le niveau d'expression de certaines protéines, nous avons procédé à des analyses western blot qui ont été effectuées pour les protéines CREB, DARPP-32, D1R et phospho-CREB. DARPP-32 est une protéine cytoplasmique essentiellement associée à la signalisation des récepteurs dopaminergiques et est fortement exprimée dans les neurones du striatum. La protéine CREB et DARPP-32 sont toutes deux directement phosphorylées par PKA lors de l'activation du D1R, ce qui laisse croire qu'une diminution dans leur niveau d'expression pourrait nuire à d'importantes fonctions cellulaires. Récemment, des études ont démontrées que le niveau d'expression de la protéine CREB, un facteur de transcription, diminue en présence de l'expression de exphtt (Cong et al., 2005). De plus, CREB est une protéine nucléaire contenant une séquence polyQ étant capable de s'associer avec exphtt et les agrégats nucléaires (McC Campbell et al., 2000). Concernant le D1R, une internalisation et une relocalisation très prononcée du récepteur ont été remarquées chez le rat suite à l'administration d'un agoniste dopaminergique (Dumartin et al., 1998). Concernant les patients atteints de HD, ils démontrent plutôt une diminution progressive de l'expression du D1R dans le stade intermédiaire et final de HD (Glass et al., 2000). Nous avons donc jugé important de mesurer les niveaux d'expression du D1R, de CREB et DARPP-32.

Nous avons alors quantifié les niveaux d'expression de ces trois protéines dans les cellules SK-N-MC transfectées avec CAG25 ou CAG103 et, en présence d'un agoniste du D1R. Notre étude n'a pas démontré de changement significatif dans le niveau d'expression de ces trois protéines lorsque comparé au groupe contrôle. Ces résultats suggèrent que la présence de exphtt n'a pas affecté ni l'expression de protéines impliquées dans la signalisation du D1R ni d'importantes fonctions cellulaires. De plus, la présence des agrégats nucléaires ou cytoplasmiques n'a eu aucun effet sur le niveau d'expression de ces trois protéines.

Finalement, notre étude a démontré un rôle certain de la signalisation associée au D1R sur la localisation des agrégats formés en présence de CAG103. La présence de ces agrégats, dans le noyau et le cytoplasme, n'a pas affectée la survie cellulaire. Le nombre d'agrégats n'a pas été influencé par la stimulation du D1R. L'effet observé avec l'utilisation de l'agoniste du D1R a été plutôt une localisation préférentielle des agrégats à l'intérieur du noyau. Ce qui démontre que les éléments de la signalisation du D1R, permettent la

translocation de la portion N-terminale de exphtt à l'intérieur du noyau de cellules d'origine neuronale.

Donc, il est possible que la présence d'agrégats puisse causer des dysfonctions neuronales et de la neurodégénérescence du striatum au cours de HD. Pourquoi certaines populations neuronales sont plus susceptibles à la présence de exphtt ? Ces questions demeurent toujours sans réponse et pour tenter d'y répondre, il sera nécessaire d'obtenir une meilleure compréhension du comportement ainsi que des effets de exphtt dans les différents modèles *in vivo* et *in vitro*, et ce à différentes étapes de l'évolution de HD.

4.2 Perspectives d'avenir

Depuis la caractérisation du gène mutant (IT15) responsable de HD, les recherches ont maintenant considérablement avancées. À partir d'un seul gène identifié avec une mutation, il est maintenant possible d'associer l'expression de expHtt à plusieurs dérèglements dans les processus cellulaires. Même si beaucoup d'incertitudes règnent toujours au sujet de HD, plusieurs laboratoires et compagnies pharmaceutiques tentent actuellement de développer des agents thérapeutiques pouvant bloquer les dysfonctions cellulaires, l'agrégation et la mort neuronale observées dans la pathologie. Les autres cibles potentielles sont l'apoptose, le système ubiquitine-protéasome, la protéolyse de expHtt, l'importation nucléaire et l'interaction possible des agrégats avec d'autres protéines possédant une séquence polyQ. Cependant HD est une maladie davantage associée à la dysfonction d'un type spécifique de neurones et de façon secondaire, à la mort neuronale. En d'autres termes, une attention particulière devrait être portée sur la spécificité cellulaire des différents agents thérapeutiques synthétisés. Ces molécules se doivent de produire leur effet sur les cellules neuronales exprimant de façon majoritaire des récepteurs dopaminergique D1 et D2 à leur surface.

Au cours de notre étude, nous avons observé l'effet de la signalisation du D1R sur le processus d'agrégation. Nous avons déterminé qu'une augmentation dans le niveau d'AMPC induit une plus grande formation d'agrégats nucléaires. Plusieurs effets sont reliés à une augmentation de l'AMPC dans les neurones, comme par exemple la phosphorylation de protéines, l'ouverture ou fermeture de canaux ioniques et même l'induction de potentiels

d'action. Il serait donc essentiel de découvrir si certaines protéines de la voie de signalisation du D1R pourraient être responsables du changement de la distribution des agrégats de expht. Une suggestion intéressante serait l'inhibition de l'activité de la protéine kinase A (PKA), régulée par le niveau de cAMP, en effectuant un traitement avec des analogues de Rp-cAMP. Cette molécule a la particularité de bloquer la voie de signalisation cAMP/CREB en inhibant l'activité de PKA. Il serait alors possible de déterminer l'implication de PKA dans le processus d'agrégation de expht.

Suite aux données que nous avons obtenues, il serait intéressant de procéder à l'évaluation du modèle murin hyperdopaminergique de HD soit la souris $DAT^{-/-}; Hdh^{Q92/Q92}$. Ce modèle murin a démontré une agrégation précoce dans les neurones recevant un fort influx dopaminergique et des dysfonctions motrices associées à HD (Cyr et al., 2006). Afin de mieux comprendre l'effet observé au cours de notre étude, ces souris pourraient être traitées avec un antagoniste du récepteur D2 (D2R), comme le raclopride, au niveau du striatum (injection) afin de bloquer la stimulation du D2R par la dopamine. Donc, seul le D1R pourrait être activé lors du traitement avec le raclopride et il serait alors possible d'observer *in vivo*, l'effet d'une stimulation soutenue du D1R sur l'agrégation de expht.

Parallèlement, les souris $Hdh^{Q92/Q92}$, YAC128 et R6/2 pourraient être traitées avec la tétrabénazine afin de vérifier si une diminution de la relâche de la dopamine ralentit la formation des agrégats. De plus, il serait possible d'évaluer aussi le développement des dysfonctions motrices en fonction d'un traitement avec la tétrabénazine administrée dans le stade présymptomatique.

La perte spécifique des neurones du striatum représente la caractéristique particulière de HD et reste toujours impossible à expliquer. Il est donc nécessaire de mieux comprendre les particularités de ce type de neurones qui les rend plus vulnérables face à la présence de expht avant d'être en mesure d'effectuer des essais cliniques avec de nouvelles molécules. Il serait aussi nécessaire de déterminer quels sont les événements pathologiques survenant tôt dans la maladie et pouvant être bloqués de façon spécifique afin de retarder la progression de la neurodégénérescence. Par la suite, il sera peut être possible de retarder l'apparition des premiers signes cliniques et peut être même la progression de la maladie.

Cependant, beaucoup de travail reste encore à faire pour améliorer la compréhension de cette terrible maladie qui reste encore jusqu'à aujourd'hui incurable.

BIBLIOGRAPHIE

- Almqvist, E., Spence, N., Nichol, K., Andrew, S.E., Vesa, J., Peltonen, L., Anvret, M., Goto, J., Kanazawa, I., Goldberg, Y.P., et al. (1995) Ancestral differences in the distribution of the delta 2642 glutamic acid polymorphism is associated with varying CAG repeat lengths on normal chromosomes: insights into the genetic evolution of Huntington disease. *Hum Mol Genet.* Feb,4 (2):207-14.
- Aubert, I., Ghorayeb, I., Normand, E., Bloch, B. (2000) Phenotypical characterization of the neurons expressing the D1 and D2 dopamine receptors in the monkey striatum. *J Comp Neurol.* 418:22-32.
- Bates, G. (2003). Huntingtin aggregation and toxicity in Huntington's disease. *Lancet.* 361, 1642-1644.
- Carmichael, J., Sugars, K.L., Bao, Y.P., Rubinzstein, D.C., (2002). Glycogen synthase kinase-3 beta inhibitors prevent cellular polyglutamine toxicity caused by the Huntington's disease mutation. *J Biol Chem.* 277, 33791-33798.
- Cass, WA. (1997) Decreases in Evoked Overflow of Dopamine in Rat Striatum after Neurotoxic Doses of Methamphetamine. *J Pharmacol Exp Ther.* 280(1):105-113.
- Cattaneo, E., Rigamonti, D., Goffredo, D., Zuccato, C., Squitieri, F., Sipione, S. (2001) Loss of normal huntingtin function: new developments in Huntington's disease research. *Trends Neurosci.* (24): 182-188.
- Cha, J.H. (2000). Transcriptional dysregulation in Huntington's disease. *Trends Neurosci.* 23:387-392.
- Charvin, D., VanHoutte, P., Pagès, C., Borrelli, E., Caboche, J., (2005) Unraveling a role for dopamine in Huntington's disease : The dual role of reactive oxygen species and D2 receptor stimulation. *PNAS* 102, No.34, 12218-12223.
- Cong, S.Y., Pepers, B.A., Evert, B.O., Rubinsztein, D.C., Roos, R.A., van Ommen, G.J., Dorsman, J.C. (2005) Mutant huntingtin represses CBP, but not p300, by binding and protein degradation. *Mol Cell Neurosci.* Dec;30(4):560-71.
- Cooper, J.K., Schilling, G., Peters, M.F., Herring, W.J., Sharp, A.H., Kaminsky, Z., Masone, J., Khan, F.A., Delanoy, M., Borchelt, D.R., Dawson, V.L., Dawson, T.M., Ross, C.A. (1998) Truncated N-terminal fragments of huntingtin with expanded glutamine repeats form nuclear and cytoplasmic aggregates in cell culture. *Hum Mol Genet.* 1998 May;7(5):783-90.
- Cyr, M., Beaulieu, JM. Laasko, A., Sotnikova, TD., Yao, WD., Bohn, LM., Gainetdinov, RR., Caron, MG. (2003) Sustained elevation of extracellular dopamine causes motor dysfunction and selective degeneration of striatal GABAergic neurons. *PNAS.* 100, 11035-11040.

- Cyr, M., Sotnikova, Gainetdinov, RR., Caron, MG. (2006) Dopamine enhances motor and neuropathological consequences of polyglutamine expanded huntingtin. *FASEB*. (20) E000-E000.
- Davies, SW., Turmaine, M., Cozens, BA., DiFiglia, M., Sharp, AH., Ross, CA. (1997) Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. *Cell*. (90):537-548.
- DiFiglia, M., Dapp, M., Chase, K., Schwarz, C., Meloni, A., Young, C. et al. (1995) Huntingtin is a cytoplasmic protein associated with vesicles in human and rat brain neurons. *Neuron*. 14: 1075-81.
- DiProspero, N.A. and Tagle, D.A. (2000) Normal and mutant huntingtin: Partners in crime? *Nature Medicine*. 6, 1208 - 1209 (2000)
- Duyao MP, Auerbach AB, Ryan A, Persichetti F, Barnes GT, McNeil SM, Ge P, Vonsattel JP, Gusella JF, Joyner AL, et al. (1995) Inactivation of the mouse Huntington's disease gene homolog Hdh. *Science*. Jul 21;269(5222):407-10.
- DiFiglia, M. (2002) Huntingtin fragments that aggregate go their separate ways. *Mol Cell*. Aug,10(2):259-269.
- Dorsman, J.C., Smoor, M.A., Maat-Schieman, M.L., Bout, M., Siesling, S., van Duinen, S.G., Verschuuren, J.J., den Dunnen, J.T., Roos, R.A., van Ommen, G.J. (1999) Analysis of the subcellular localization of huntingtin with a set of rabbit polyclonal antibodies in cultured mammalian cells of neuronal origin: comparison with the distribution of huntingtin in Huntington's disease autopsy brain. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. Jun 29;354(1386): 1061-7.
- Gerfen, C.R., Engber, T.M., Mahan, L.C., Susel, Z., Chase, T.N., Monsma, F.J., Sibley, D.R. (1991) D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science*. 250, 1429-1432.
- Gerfen, C.R., Keefe, K.A., Gauda, E.B. (1995) D1 and D2-dopamine receptor function in the striatum: coactivation of D1 and D2-dopamine receptors on separate populations of neurons results in potentiated immediate early gene response in D1-containing neurons. *J Neurosci*. 15:8167-76.
- Giros, B., Jabe, M. Jones, S., Wightman, M et Caron MG. (1996) Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. *Nature*. Vol.379,(6566): 606-612.
- Glass, M., Dragunow, M., Faull, R.L. (2000) The pattern of neurodegeneration in Huntington's disease: a comparative study of cannabinoid, dopamine, adenosine and GABA(A) receptor alterations in the human basal ganglia in Huntington's disease. *Neuroscience*. 97(3):505-19.
- Goldberg, Y.P., Nicholson, D.W., Rasper, D.M., Kalchman, M.A., Koide, H.B., Graham, R.K., Bromm, M., Kazemi-Esfarjani, P., Thornberry, N.A., Vaillancourt, J.P., Hayden, M.R. (1996)

Cleavage of huntingtin by apopain, a proapoptotic cysteine protease, is modulated by the polyglutamine tract. *Nat Genet.* 1996 Aug;13(4):442-9.

Gutekunst, C.A., Levey, A.I., Heilman, C.J., Whaley, W.L., Yi, H., Nash, N.R., Rees, H.D., Madden, J.J., Hersh, S.M. (1995) Identification and localization of Huntingtin in brain and lymphoblastoid cell lines with anti-fusion protein antibodies. *PNAS. USA.* 92:87-10-8714.

Heemskerk, J. (2005) Screening existing drugs for neurodegeneration: the National Institute of Neurologic Disorders and Stroke (NINDS) model. *Retina.* 25, S56-S57

Hodgson, J.G., Smith, D.J., McCutcheon, K., Koide, H.B., Nishiyama, K., Dinulos, M.B., Stevens, M.E., Bissada, N., Nasir, J., Kanazawa, I., Distèche, C.M., Rubin, E.M., Hayden, M.R. (1996) Human huntingtin derived from YAC transgene compensate for loss of murine huntingtin by rescue of the embryonic lethal phenotype. *Hum Mol Genet.* (5):1875-1885.

Humbert, S., Bryson, EA., Cordelières, FP., Connors, NA., Datta, SR., Finkbeiner, F., Greenberg, M., et Saudou, F. (2002) The IGF/Akt pathway is neuroprotective in Huntington's disease and involves Huntingtin phosphorylation by Akt. *Dev Cell.* (2):831-837.

Humbert, S. et Saudou, F. (2001) Neuronal death in Huntington's disease multiple pathways for one issue? In neuronal Death by accident or by Design. *Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag*) pp.137-152.

Jaber, M., Robinson, S.W., Missale, C., Caron, M.G. (1996) Dopamine receptors and brain function. *Neuropharmacology.* 35:1503-19.

Jackson, D.M., Westlind-Danielsson, A. (1994) Dopamine receptors: molecular biology, biochemistry and behavioural aspects. 64:291-370.

Jakel, R.J., Maragos, W.F., (2000). Neuronal cell death in Huntington's disease: a potential role for dopamine. *Trends Neurosci.* 23, 239-245.

Jana, N.R., Tanaka, M., Wang, G., Nukina, N., (2000). Polyglutamine length-dependent interaction of Hsp40 and Hsp 70 family chaperones truncated N-terminal huntingtin: their role in suppression of aggregation and cellular toxicity. *Hum Mol Genet.* 9, 2009-2018.

Jana, N.R., Zemskov, E.A., Wang, G.H., et al. (2001) Altered proteosomal function due to the expression of polyglutamine-expanded truncated N-terminal huntingtin induces apoptosis by caspase activation through mitochondrial cytochrome c release. *Hum Mol Gen.* (10):1049-59

Kazantsev, A., Preisinger, E., Dranovsky, A., Goldgaber, D., Housman, D. (1999). Insoluble detergent-resistant aggregates form between pathological and non-pathological lengths of polyglutamine in mammalian cells. *PNAS.* 96: 11404-11409.

Kegel, KB., Meloni, AR., Yi, Y., Kim, YJ, Doyle, E., Cuiffo, BG. et al (2002). Huntingtin is present in the nucleus, interacts with the transcriptional corepressor C-terminal binding protein, and represses transcription. *J Biol Chem* (277):7466-76.

Klawans, H.C. et al. (1970) Predictive test for Huntington's chorea. *Lancet.* (2) 1185-1186.

Lebel, M., Robinson, P., Cyr, M. (2007) Canadian Association of Neurosciences Review: the role of dopamine receptor function in neurodegenerative diseases. *Can J Neurol Sci.* 34:18-29.

Levine, M.S., Cepeda, C., Hickey, M.A., Fleming, S.M., Chesselet, M.F. (2004) Genetic mouse model of Huntington's and Parkinson's disease: illuminating but imperfect. *Trends Neurosci.* 27, 691-697.

Li, J.Y., Popovic, N., Brundin, P. (2005) The use of the R6 transgenic mouse models of Huntington's disease in attempts to develop novel therapeutic strategies. *NeuroRx.* Jul;2(3):447-64.

Luo, Y., Umegaki, H., Wang, X., et al. (1998) Dopamine induces apoptosis through an oxydation involved SAPK/JNK activation pathway. *J Biol Chem* 273: 3556-64.

Lunkes, A., Lindenberg, K.S., Ben-Haiem, L., Weber, C., Davys, D., Landwehrmeyer, G.B., Mandel, J.L., Trottier, Y., (2002). Proteases acting on mutant huntingtin generate cleaved products that differentially build up cytoplasmic and nuclear inclusions. *Mol Cell* 10, 259-269.

McC Campbell A, Taylor JP, Taye AA, Robitschek J, Li M, Walcott J, Merry D, Chai Y, Paulson H, Sobue G, Fischbeck KH. (2000) CREB-binding protein sequestration by expanded polyglutamine. *Hum. Mol. Genet.* Sep 1;9(14):2197-202.

McC Campbell, A., Taye, A.A., Whitty, L., Penney, E., Steffan., J.S., Fishbeck, K.H. (2001) Histone deacetylase inhibitors reduce polyglutamine toxicity. *PNAS.* 98: 15179-15184.

Meltzer, M., Helgason, CD., Dragatsis, I., Zhang, T., Gan, L., Pineault, N., et al. (2000) Huntingtin is required for normal hématopoïèse. *Hum Mol Gen.* 9:387-394.

Mende-Mueller, L., Toneff, T. Hwang, SR., Chesselet, MF et Hook, VYH. (2001) Tissue-Specific Proteolysis of Huntingtin (htt) in Human Brains : Evidence of Enhanced Levels of N- and C-Terminal htt Fragments in Huntington's Disease Striatum. *J of Neurosci.* 21(6):1830-1837.

Missale, C., Nash, S.R., Robinson, S.W., Jaber, M., Caron, M.G. (1998) Dopamine receptors : from structure to fuction. *Physiol Rev.* 78, 189-225.

Moussa, E.H., Tomita, Y., Sidhu, A. (2006) Dopmaine D1 receptor-mediated toxicity in human SK-N-MC neuroblastoma cells. *Neurochem Int.* Feb;48(3):226-34

Nasir, J., Floresco, S.B., O'Kusky, J.R., Diewert, V.M., Richman, J.M., Zeisler, J., Borowski, A., Marth, J.D., Phillips, A.G., Hayden, M.R. (1995) Targeted disruption of the Huntington's disease gene results in embryonic lethality and behavioral and morphological changes in heterozygotes. *Cell.* June 2; 81(5), 811-23.

Neve, K.A., Seamans, J.K., Trantham-Davidson, H. (2004) Dopamine receptor signalling. *J Recept Signal Transduct Res.* 24:165-205.

Nucifora Jr., F.C., Sasaki, M., Peters, M.F., Huang, H., Cooper, J.K., Yamada, M., Takahashi, H., Tsuji, S., Troncoso, J., Dawson, V.L., Dawson, T.M., Ross, C.A. (2001) Interference by huntingtin and atrophin-1 with cbp-mediated transcription leading to cellular toxicity. *Science*. 291: 2423-2428.

Perutz, M. (1994) Polar zippers: Their role in human disease. *Protein Sci.* (3):1629-1637.

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

Saft, C., Lauter, T., Kraus, P.H., Przuntek, H., Andrich, J.E. (2006) Dose-dependent improvement of myoclonic hyperkinesia due to Valproic acid in eight Huntington's Disease patients: a case series. *BMC Neurol.* Feb 28;6:11

Saudou, F., Finkbeiner, S., Devys, D., Greenberg, M.E. (1998) Huntingtin acts in the nucleus to induce apoptosis but death does not correlate with the formation of intranuclear inclusions. *Cell.* (95):55-56.

Sidhu, A., Niznik, H.B. (2000) Coupling of dopamine receptors subtypes to multiple and diverse G proteins. *Int J Dev Neurosci.* 18:669-677.

Slow, E.J., Van Raamsdonk, J., Rogers, D., Coleman, S.H., Graham, R.K., Deng, Y., Oh, R., Bissada, N., Hossain, S.M., Yang, Y.Z., Li, X.J., Simpson, E.M., Gutekunst, C.A., Leavitt, B.R., Hayden, M.R. (2003) Selective striatal neuronal loss in a YAC128 mouse model of Huntington's disease. *Hum Mol Gen.* Vol.12 (13):1555-1567.

The Huntington's Disease Collaborative Research Group, (1993) *Cell.* 72(6), 971-83.

The U.S.–Venezuela Collaborative Research Project, Nancy S. Wexler. (2004) Venezuelan kindreds reveal that genetic and environmental factors modulate Huntington's disease age of onset. *PNAS.* vol. 101, no. 10, 3498-3503.

Vallonne, D., Picetti, R., Borrelli, E. (2000) Structure and functions of dopamine receptors. *Neurosci Biobehav Rev.* 24:125-32.

Wellington, C.L., Ellerby, L.M., Hackam, A.S., Margolis, R.L., Triffiro, M.A., Singaraja, R., McCutcheon, K., Salvesen, G.S., Propp, S.S., Bromm, M., et al. (1998) Caspase cleavage of gene products associated with triplet expansion disorder generates truncated fragments containing the polyglutamine tract. *J Biol Chem.* 273: 9158-9167.

Wheeler, CV., White, JK., Gutekunst, C-A., Vrbanac, V., Weaver, M., Li, XJ., Li, SH., Yi, H., Vonsattel, J-P., Guselle, GF., Hersch, S., Auerbach, W., Joyner, AL., and Macdonald, ME. (2000). Long glutamine tracts cause nuclear localization of a novel form of huntingtin medium spiny striatal neurons in Hdh^{Q92} et Hdh^{Q111} knock-in mice. *Hum Mol Gen.* Vol. 9, (4): 500-513.

Zeitlin, S., Liu, J.P., Chapman, D.L., Papaioannou, V.E., Efstratiadis, A. (1995) Increased apoptosis and early embryonic lethality in mice nullizygous for the Huntington's disease gene homolog. *Nat Genet* Oct,11(2):155-63.

Zhao-Xue Yu, Shi-Hua Li, Huu-Phuc Nguyen and Xiao-Jiang Li. (2002). Huntingtin inclusions do not deplete polyglutamine-containing transcription factors in HD mice. *Hum Mol Gen.* Vol.11,(8):905-914.