

Mécanismes de mort neuronale dans la maladie de Huntington. Première partie : Généralités et aspects histologiques

Mechanisms of neuronal death in Huntington's disease. First part : General considerations and histopathological features

K. Bantubungi^{1,2} et D. Blum^{1,2}

¹INSERM U837, Centre de Recherche Jean-Pierre Aubert, ²Université de Lille 2, IMPRT, Lille, France

RESUME

La maladie de Huntington est causée par une expansion CAG anormale dans le gène codant pour la protéine Huntingtine et qui provoque un dégénérescence cortico-striatale majeure à l'origine de nombreux symptômes moteurs et cognitifs. Depuis la mise en évidence de cette mutation en 1993, de très nombreuses données ont permis d'éclaircir les conséquences physiopathologiques de son expression. Cette revue reprend donc l'état des connaissances relatives aux dysfonctionnements cellulaires induits par la Huntingtine mutée et montre, par différents exemples, comment ces travaux fondamentaux peuvent aboutir à des pistes thérapeutiques exploitables chez les patients.

Rev Med Brux 2007 ; 28 : 413-21

ABSTRACT

Huntington's disease is caused by an abnormal CAG expansion within the gene encoding Huntingtin which induces a major cortico-striatal degeneration as well as motor and cognitive impairments. Since the discovery of the present mutation, a number of experimental data have been collected to uncover the physiopathological consequences of mutated Huntingtin expression. Here, we review the molecular and cellular mechanisms underlying and show how this better knowledge can be translate to clinical trials in patients.

Rev Med Brux 2007 ; 28 : 413-21

Key words : Huntington's disease, neuronal death, Huntingtin

AVANT-PROPOS

La maladie de Huntington (MH) a été décrite de manière précise la première fois au XIX^{ème} siècle par Georges Huntington¹. Toutefois, la mutation n'a été découverte qu'en 1993. Depuis cette date, des progrès énormes ont été accomplis du point de vue de la compréhension des mécanismes cellulaires impliqués dans la pathologie. La découverte de ces phénomènes permet actuellement d'envisager différentes pistes thérapeutiques chez les patients démontrant la relation étroite entretenue entre les chercheurs et les cliniciens dans ce domaine.

GENERALITES, SYMPTOMES ET HISTOPATHOLOGIE

La MH est une atteinte neurodégénérative génétique autosomale dominante à pénétrance complète caractérisée par des troubles moteurs (chorée et dyskinésie), des déficits cognitifs et des manifestations psychiatriques (agressivité et dépression)². Au niveau histopathologique, elle est associée à une atrophie cortico-striatale progressive. L'atteinte porte particulièrement sur les neurones épineux de taille moyenne efférents qui constituent 95 % des neurones striataux. La MH affecte majoritairement des jeunes adultes de 30-40 ans. Son

issue reste fatale et ce, après 17 ans d'évolution en moyenne^{2,3}. Dans ses formes juvéniles, l'évolution apparaît plus rapide, entre 7 et 10 ans. Sa prévalence est comprise entre 6 à 10 pour 1.000.000 dans la plupart des pays européens et ceux peuplés par émigration à partir de l'Europe.

Dans la forme commune de la MH, les désordres moteurs progressent sur une durée de 10 à 15 ans débutant par une hyperkinésie et évoluant vers un syndrome akinéto-rigide, correspondant au stade final de la maladie. Les tout premiers signes moteurs consistent en des mouvements anormaux des yeux (anomalies spécifiques des saccades) et des mains. Apparaissent ensuite, des dyskinésies oro-faciales progressives (impliquant la tête, le cou, le tronc et les bras et perturbant le langage, la mastication et l'ingestion) et enfin une chorée. Dans les cas juvéniles, la symptomatologie est considérablement différente avec présence de bradykinésie, tremblement, rigidité et dystonies et souvent absence de chorée. Les atteintes cognitives observées dans la MH sont caractérisées par des troubles de l'humeur (irritabilité) et des déficits cognitifs de type frontal. Les déficits cognitifs apparaissent avec les mouvements anormaux. Les capacités générales intellectuelles s'altèrent progressivement au cours de la première année d'apparition des symptômes moteurs. Des troubles sévères de la mémoire à court terme, de la planification, de la stratégie et de l'adaptation sont également notés et conduisent à un ralentissement du traitement de l'information associé à des comportements persévératifs⁴. La démence associée à la MH intervient relativement tôt chez les patients (avant ou de manière concomitante avec la phase hyperkinétique et choréique) pour s'aggraver parallèlement à la symptomatologie motrice.

Les atteintes psychiatriques observées dans la MH sont associées à des démences sous-corticales telles que apathie, irritabilité, accès de violence.

La manifestation anatomo-pathologique primaire de la MH consiste en une dégénérescence progressive et préférentielle du *striatum*⁵. De manière intéressante, le *striatum* n'est pas affecté de façon uniforme. En effet, la dégénérescence affecte essentiellement les neurones GABA-ergiques projetant à l'extérieur de la structure (neurones épineux de taille moyenne) alors que les interneurons contenant la somatostatine mais également le neuropeptide Y, la monoxyde d'azote synthétase et la NADPH-diaphorase ainsi que les grands interneurons cholinergiques, sont relativement préservés⁶⁻⁸. Par ailleurs, il est à noter qu'au sein des neurones épineux moyens, une sous-population, celle exprimant l'enképhaline, est affectée plus précocement dans la maladie⁹. Cette dégénérescence préférentielle est probablement à l'origine de la précocité des chorées. Toutefois, d'autres régions cérébrales apparaissent touchées de manière majeure telles que le cortex cérébral (couche III, V et VI) et le pallidum ou dans une moindre mesure et plus tardivement le noyau sous-thalamique, l'hippocampe (couche CA1), la

substance noire réticulée² et le cervelet¹⁰. Une atrophie et une dysfonction hypothalamique ont également été récemment décrites¹¹⁻¹². Il convient finalement de noter l'importance potentielle de l'inflammation striatale dans la MH puisque son niveau est corrélé au grade de la maladie¹³, même si son implication physiopathologique réelle reste peu connue.

GENETIQUE

La MH est donc une maladie autosomale dominante causée par une mutation présente dans le gène IT15 (" *Interesting Transcript 15* ", 67 exons), situé sur le bras court du chromosome 4 (4p63), codant pour une protéine d'environ 350 kDa, la Huntingtine. La mutation consiste en une expansion d'une répétition de triplets CAG (codon correspondant à la glutamine), traduite en une région polyglutamine anormale dans la partie N-terminale de la Huntingtine¹⁴. Ce type de mutation par expansion CAG est commun à d'autres désordres neurologiques, appelés maladies par expansion polyglutamine telles que l'atrophie dentato-rubro-pallidoluysienne, l'atrophie spinobulbo-musculaire, et diverses ataxies spinocérébelleuses¹⁵. Les gènes portant l'expansion CAG dans ces maladies n'ont aucune homologie excepté l'expansion par elle-même. Du fait de la diversité physiopathologique de ces maladies, ces observations suggèrent un rôle toxique de l'expansion CAG mais également une dysfonction propre relative à la protéine subissant la mutation.

Les individus non atteints par la MH sont porteurs d'un nombre d'expansion inférieur à 35, la maladie s'exprimant au-delà. Il est à noter que la pénétrance est incomplète entre 36 et 39 répétitions. Des allèles portant 40 à 50 répétitions représentent la forme adulte commune de la maladie alors que les répétitions plus longues sont généralement associées à des formes sévères juvéniles voire infantiles¹⁶.

Il existe une instabilité somatique et germinale des répétitions CAG causant une instabilité intergénérationnelle, c'est-à-dire une variation du nombre de répétitions de génération en génération. Ce phénomène est fréquemment observé lors de la transmission via le père et résulterait d'une anticipation de la maladie caractérisée par un déclenchement plus précoce, une augmentation de la sévérité des symptômes et une progression plus rapide à chaque génération¹⁷. Il existe une corrélation entre le nombre de répétitions CAG et la sévérité de l'atrophie striatale et donc de l'atteinte neurologique mais également la vitesse d'aggravation de la maladie¹⁸. Toutefois, bien que le nombre de répétitions CAG soit le déterminant primaire de la sévérité de la pathologie et compte pour environ 60 % de la variance de l'âge de déclenchement des premiers symptômes^{14,19}, le reste de la variance est attribué à des facteurs environnementaux ou génétiques. Ceci est suggéré par une récente étude épidémiologique réalisée sur plusieurs milliers de patients²⁰ mais également par les études démontrant un décours temporel ainsi que des symptômes

différents chez des jumeaux monozygotes atteints de la MH^{21,22}. Des modifications génétiques telles qu'un polymorphisme des sous-unités NR2A et B des récepteurs NMDA²³, du récepteur kaïnate GluR6²⁴, du facteur neurotrophique BDNF²⁵ (mais controversé dans les références 26 et 27), mais également du co-activateur transcriptionnel CA150²⁸, de l'ubiquitine hydrolase L1 (UCHL1)²⁹, du facteur de transcription p53 et de la DNase hCAD³⁰ influeraient aussi sur l'âge d'apparition de la maladie²².

LES FONCTIONS DE LA HUNTINGTINE

La Huntingtine est une protéine ubiquitaire, présente au sein du système nerveux central mais également dans les organes périphériques². La distribution cérébrale de la Huntingtine est relativement ubiquiste et est principalement neuronale avec des taux plus importants dans les neurones corticaux pyramidaux, les cellules de Purkinje et les interneurons striataux³⁰⁻³². Ainsi, bien que le *striatum* soit la structure préférentiellement affectée dans la MH, ce dernier n'est pas particulièrement enrichi en Huntingtine ni en son message^{34,35}. Ceci est également vrai pour la protéine mutée. En plus de cette expression ubiquitaire tissulaire, la Huntingtine se localise à différents endroits de la cellule : cytoplasme, mitochondrie, appareil de Golgi, réticulum endoplasmique, vésicules synaptiques, et s'associe à différents composants du cytosquelette. La protéine est également présente, dans une moindre mesure, au niveau du noyau. Toutes ces données indiquent l'importance probable de la protéine dans la fonction de divers tissus ainsi que dans les différentes fonctions cellulaires.

Alors que le gène codant pour la Huntingtine a été découvert il y a plus de dix ans, les fonctions physiologiques de cette protéine restent encore à définir précisément. Néanmoins, diverses analyses biochimiques, moléculaires, morphologiques et génétiques ont permis de démontrer que la Huntingtine interagissait avec une variété importante de partenaires protéiques impliqués dans un grand nombre de fonctions cellulaires telles que la transcription (CBP, REST/NRSF, sp1/TAF₁₁₃₀, CA150), le trafic axonal (HAP1), la signalisation de survie/mort cellulaire (Akt, p53), l'endocytose (HIP1) et la signalisation post-synaptique (PSD-95) (Figure 1)³⁶⁻³⁸. Par ailleurs, la Huntingtine normale démontre des propriétés anti-apoptotiques importantes en prévenant la formation du complexe apoptosome et l'activation subséquente de la caspase-9 mais également en se liant directement à la caspase-3 et en réprimant sa fonction pro-apoptotique³⁹⁻⁴¹. De ce fait, la Huntingtine joue un rôle primordial dans le développement mais également dans la survie neuronale chez l'adulte. En effet, l'inactivation complète de son gène est létale⁴²⁻⁴⁴ et son inactivation conditionnelle chez l'adulte induit une dégénérescence neuronale⁴⁵. Ce rôle important de la Huntingtine dans la survie des neurones a été confirmé récemment par différentes études démontrant son rôle dans la synthèse et le transport vésiculaire du BDNF^{38,46-48}, un

Protéines	Fonction
Transcription	
p53	Facteur de transcription
TBP	Facteur de transcription
NF- κ B	Facteur de transcription
HYP-C	Facteur de transcription
CA150	Activateur transcriptionnel
CBP	Activateur transcriptionnel
CBP	Activateur transcriptionnel
SP1	Activateur transcriptionnel
TAF ₁₁₃₀	Activateur transcriptionnel
NCOR	Répresseur transcriptionnel
REST-NRSE	Suppresseur transcriptionnel
HYP-A,B	Facteur d'épissage des ARNm
Traffic intracellulaire et endocytose	
HAP1	Traffic, endocytose
HIP1	Endocytose, apoptose
HIP14	Traffic, endocytose
PAC5IN1	Endocytose
α -adaptin	Endocytose
SH3GL3	Recyclage vésiculaire, endocytose
PSD-95	Echaffaudage des protéines synaptiques
Signalisation	
Calmodulin	Protéine de liaison au calcium
IP3R	Canal calcique réticulaire
GRb2	Signalisation des facteurs de croissance
RasGAP	Protéine activatrice des Ras GTPases
FIP2/HYP-L	Interacteur de la GTPase Rab8
CP-4	Element de transduction dépendant de cdc42
Akt/PKB	Kinase
Métabolisme	
GAPDH	Enzyme glycolytique
Cystathionine β synthase	Enzyme de synthèse de la cystéine
HIP2	Enzyme de conjugaison de l'ubiquitine
Autres	
FIP2	Morphogénèse cellulaire
HAP40	Inconnue

Figure 1 : Interacteurs protéiques de la Huntingtine (liste non exhaustive). Adapté des références 28 et 43.

facteur neurotrophique libéré par les neurones corticaux dans le *striatum* et qui s'avère être un facteur de survie crucial pour les neurones épineux de taille moyenne.

HUNTINGTINE MUTÉE ET DYSFONCTIONS INTRACELLULAIRES

La neurotoxicité liée à l'expression de la Huntingtine mutée pourrait donc résulter d'une part de la perte des fonctions normales et "neurotrophiques" de la protéine sauvage mais également d'un gain de fonction toxique de la protéine mutée. Même si son degré d'importance dans la pathologie est discuté^{49,50}, la perte de fonction de la protéine sauvage s'exprimerait en particulier par des perturbations de la synthèse du BDNF et du transport axonal^{38,47}. La présence de l'expansion polyglutamine anormale modifierait l'affinité de la Huntingtine pour différents partenaires engendrant un gain de fonction très toxique et une tendance de la protéine à former des agrégats⁵¹⁻⁵⁴. Ceci se traduirait alors par des altérations tant au niveau de la machinerie transcriptionnelle, du transport axonal, de la fonction du protéasome, de l'homéostasie calcique ou de la fonction mitochondriale (voir ci-après et Figure 2). De fait, la pathogenèse cellulaire de la MH est multifactorielle.

Une des marques neuropathologiques majeures de la MH est la présence d'inclusions intranucléaires⁵⁵

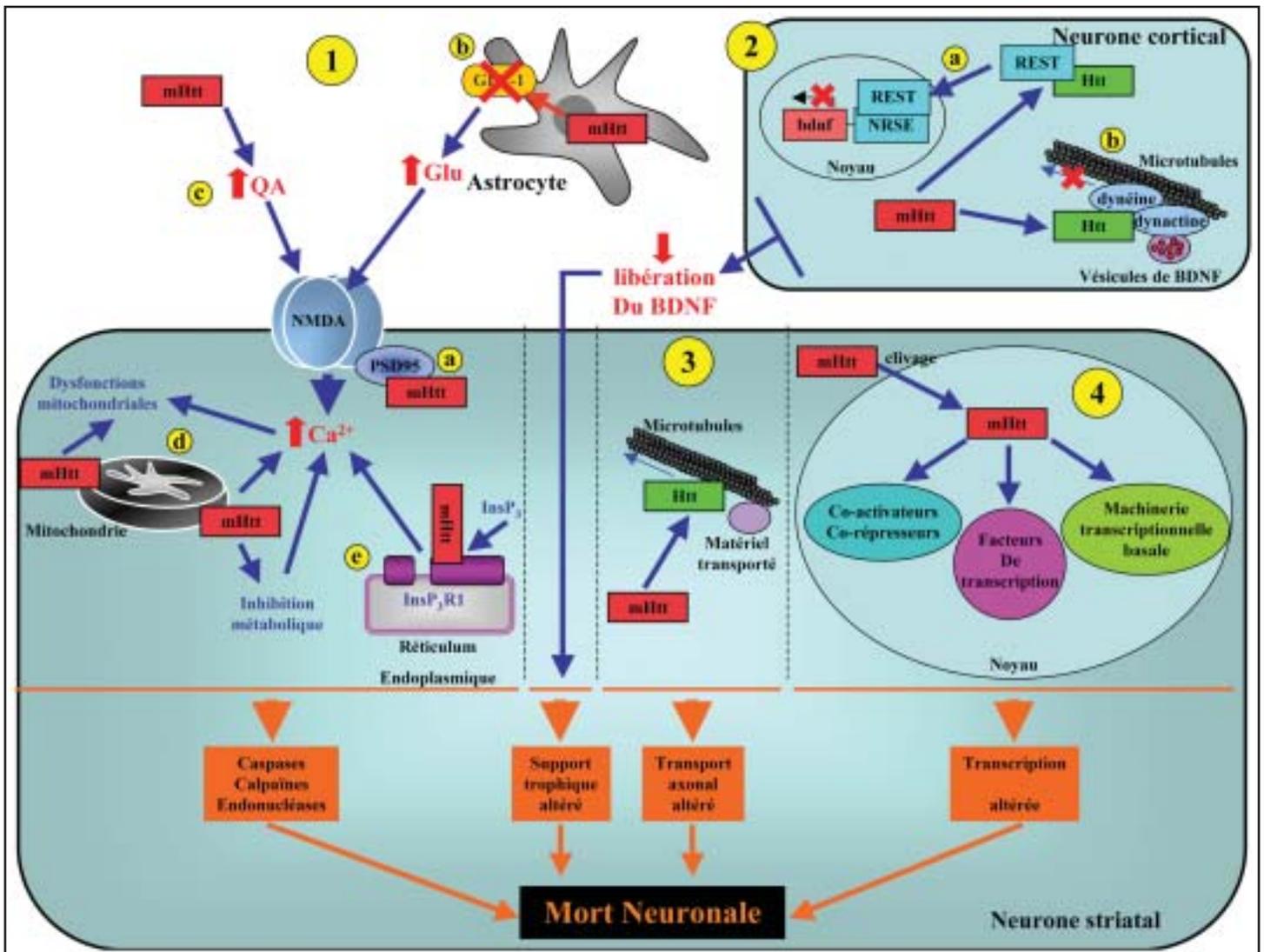
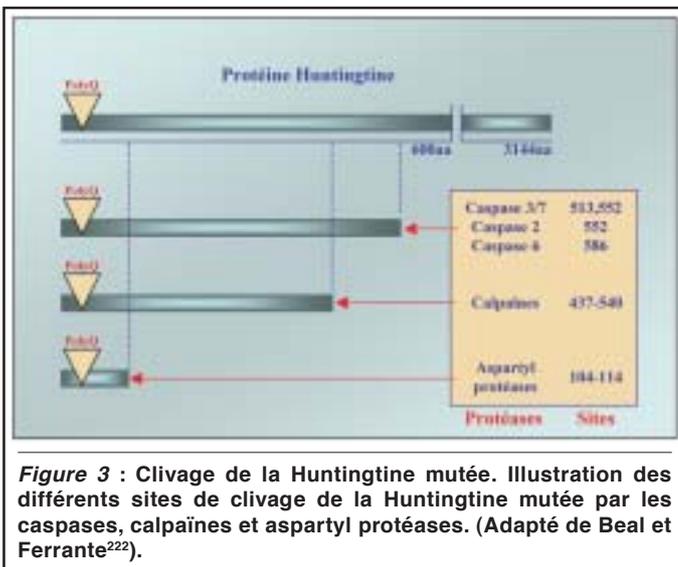


Figure 2 : Dysfonctions cellulaires induites par la Huntingtine mutée (mHtt). La Huntingtine mutée altère la signalisation des récepteurs NMDA, induit des altérations de la fonction mitochondriale et produit des perturbations calciques contribuant à l'émergence d'un phénomène excitotoxique. En présence d'Huntingtine mutée, l'activité des récepteurs NMDA serait accrue du fait : a) d'une augmentation de l'interaction de la protéine mutée avec PSD95 qui génère une dysfonction de la sous-unité NR2B du récepteur ; b) d'une diminution de l'activité du transporteur astrocytaire glutamatergique GLT-1 conduisant à une augmentation de la concentration extracellulaire en glutamate ; c) d'une production accrue extracellulaire d'acide quinolinique, un agoniste des récepteurs NMDA. Tout ceci conduirait à une augmentation délétère de calcium dans les neurones striataux. Ces phénomènes toxiques sont potentialisés par l'altération du complexe II mitochondrial et par la capacité de la mitochondrie à tamponner le calcium intracytoplasmique. La Huntingtine mutée augmente également la sensibilité du récepteur InsP3R1 à son agoniste InsP3 au niveau du réticulum endoplasmique favorisant l'augmentation calcique dans le cytosol. Tous ces événements conduisent à l'activation d'enzymes délétères tels que les calpaïnes, les caspases et les endonucléases. (2) La Huntingtine mutée altère le support trophique exercé par le BDNF envers les neurones striataux. En effet, dans les neurones corticaux, la Huntingtine mutée altère l'interaction de la Huntingtine normale avec le répresseur REST ce qui favorise l'entrée nucléaire de ce dernier et, par là, une diminution de la synthèse du BDNF. Dans les mêmes neurones, la Huntingtine mutée réduit le transport vésiculaire de ce facteur. Tout ceci conduit à une diminution du support trophique exercé par le BDNF envers les neurones striataux. (3) La Huntingtine mutée altère le transport axonal dans les neurones striataux. (4) Les fragments N-terminaux de la Huntingtine mutée, générés par clivage, entrent dans le noyau et altèrent, sous forme agrégée et/ou soluble, l'activité de nombreux facteurs de transcription générant des déficits transcriptionnels précoces.

et d'agrégats au niveau des neurites dystrophiques⁵⁶. Ces agrégats apparaissent avant les symptômes neurologiques suggérant que l'accumulation anormale de la Huntingtine mutée soit un événement physiopathologique majeur de la maladie⁵⁷. Les agrégats d'Huntingtine mutée pourraient se former de deux manières. D'une part, la conformation tertiaire de la protéine serait perturbée par la présence des expansions polyglutamines conduisant à l'établissement d'interactions anormales entre protéines possédant des motifs polyQ telles que les Huntingtines normales et

mutées. Il en résulterait la formation de feuillets bêta insolubles⁵⁸⁻⁵⁹. D'autre part, l'agrégation serait favorisée par des transglutaminases dont l'activité serait augmentée par la présence de la protéine mutée elle-même⁶⁰.

La Huntingtine possède, dans sa partie N-terminale, un certain nombre de sites de clivage par les caspases (-3, -7, -6, -2), calpaïnes et autres protéases (*aspartyl proteases*) (Figure 3)⁶¹⁻⁶². Ces sites sont également présents au niveau de la Huntingtine



mutée. La Huntingtine normale est faiblement protéolysée à la différence de la protéine mutée, du fait de l'activation de ces différentes protéases en présence de la mutation. Le clivage de la Huntingtine mutée par différentes caspases et les calpaïnes en particulier produit alors de nombreux fragments N-terminaux contenant l'expansion polyglutamine à l'origine de la formation des agrégats somatodendritiques et, après migration vers le noyau, des inclusions intranucléaires observées sur des coupes tissulaires provenant de patients ou de modèles transgéniques de la maladie^{55,63}. Toutefois, des données récentes indiquent que seuls les fragments N-terminaux générés après clivage de la protéine mutée par la caspase-6 présentent une toxicité neuronale⁶⁴. Ceci suggère une fonction différente des fragments générés à partir de clivages induits par différentes protéases. Ce point crucial reste à évaluer plus avant.

Excepté dans les cas juvéniles, où elles sont présentes dans de très fortes proportions (> 30 %), ces inclusions sont présentes dans 1 à 5 % des neurones striataux et 3 à 6 % des neurones corticaux⁵⁵. Bien que ces agrégats soient une marque histologique importante et caractérisent la présence de la mutation, leur rôle dans les mécanismes d'initiation de la mort cellulaire est fort débattu. En effet, des études récentes démontrent que la mort cellulaire se déclare moins vite en leur présence et qu'ils représenteraient un facteur cellulaire protecteur^{53,65}. Les agrégats seraient un moyen de titrer les formes toxiques solubles ou oligomérisées de la Huntingtine mutée⁶⁶ en permettant leur " stockage " temporaire^{53,67,68}. Cette hypothèse est en accord avec différentes observations. D'une part, la densité en agrégats est plus importante dans les interneurons striataux, relativement préservés ou les neurones corticaux, moins vulnérables, que dans les neurones épineux moyens qui en expriment, chez le patient, un relativement faible nombre^{63,67}. D'autre part, une étude récente chez la souris établit une corrélation inverse entre la présence d'agrégats, les manifestations comportementales et la dégénérescence neuronale⁶⁹. Néanmoins, la présence des agrégats nucléaires et somato-dendritiques pourrait jouer un rôle dans les

altérations de la transcription ou du transport intracellulaire observé dans la pathologie n'excluant donc pas un rôle protoxique.

Altérations transcriptionnelles

Des études histochimiques, par hybridation *in situ* ou imagerie tomographique, réalisées chez des patients, démontrent clairement une perte de l'expression de différents gènes ou protéines striatales (récepteurs, neuropeptides)^{9,70-72}. Certaines de ces altérations ont été observées chez des patients à des grades précoces voire chez des patients pré-symptomatiques, suggérant, sans le démontrer formellement, qu'elles résulteraient de dysfonctions transcriptionnelles précoces plutôt que de la mort des neurones striataux. Cette hypothèse a été confirmée par l'étude, principalement, de la lignée R6/2, un modèle transgénique de la MH, dans laquelle il a été démontré des altérations précoces de l'expression d'un sous-groupe de gènes (D_1 , A_{2A} , CB1) précédant les manifestations motrices et histopathologiques alors que d'autres transcrits ou protéines (NR1, β -actine, mGluR5) ne sont pas affectés, même tardivement⁷³⁻⁷⁹. La Huntingtine mutée génère donc une dérégulation transcriptionnelle précoce indépendante d'une dégénérescence neuronale.

La capacité de la Huntingtine à perturber l'expression génique, via sa liaison à diverses protéines impliquées dans la régulation de la transcription, est dépendante, pour une grande part, de sa localisation nucléaire. Comme évoqué précédemment, les fragments N-terminaux de la Huntingtine mutée s'accumulent anormalement dans le noyau, favorisant son interaction avec des protéines transcriptionnellement actives. Globalement, l'expression nucléaire de la Huntingtine mutée affecte le fonctionnement de différents acteurs de la transcription : des activateurs (Sp1, NF- κ B, p53) et des répresseurs (REST/NRSF, *repressor element-1 transcription factor/neuron restrictive silencer factor*), des co-régulateurs de la transcription soit répresseurs (NCoR) soit activateurs (CBP), des facteurs de remodelage de la chromatine (CBP, mSin3a, TAF_{II}130) ou de la machinerie basale (PQBP-1, TAF_{II}130, RNA polymérase II)^{47,80}. Une des interactions aux conséquences les plus importantes concerne CBP, un co-activateur de la transcription CREB-dépendante. La Huntingtine mutée, en se liant anormalement avec CBP (*CREB-Binding Protein*) ou en promouvant sa dégradation^{81,82}, inhibe son activité histone acétyltransférase⁸³, provoquant une hypoacétylation des histones, un défaut subséquent de remodelage de la chromatine et donc une altération de la transcription dépendante de CREB (*cAMP-Response Element Binding Protein*). L'importance physiopathologique de cette dysfonction est démontrée par les perturbations motrices et la dégénérescence striatale observée dans un modèle d'inactivation conditionnelle de CREB chez la souris⁸⁴, indiquant que la vulnérabilité des neurones striataux soit en partie liée à une déficience de ce système transcriptionnel. Ces observations importantes ont finalement conduit à

considérer un rétablissement d'une acétylation normale des histones comme une piste thérapeutique potentielle.

Divers modèles, qui ne sont pas mutuellement exclusifs, ont été élaborés afin de clarifier les mécanismes sous-tendant les altérations de la fonction transcriptionnelle par la Huntingtine mutée. Une première hypothèse consiste en la séquestration de facteurs de transcription et autres régulateurs tels que CBP, TAF_{II}130, NCoR, mSin3 ou p53 au sein des agrégats nucléaires⁸⁰. Ce modèle se heurte toutefois au fait que la présence d'agrégats est variable selon les structures et qu'ils sont en faible proportion dans le *striatum* alors qu'à ce niveau la dérégulation transcriptionnelle est majeure. Ceci amène donc à un second modèle selon lequel la dérégulation transcriptionnelle induite par la Huntingtine mutée impliquerait des interactions solubles anormales entre la protéine mutée non agrégée et les différents régulateurs de la transcription^{80,85}.

Bien que le noyau soit le site primaire d'action de la Huntingtine mutée sur la transcription, des travaux récents suggèrent que la protéine mutée puisse également inhiber la transcription via des interactions au niveau cytosolique. Ainsi, la Huntingtine normale interagit avec le répresseur cytoplasmique REST/NRSF. REST/NRSF, en se liant aux séquences NRSE (*Neuron-Restrictive Silencer Element*), module la transcription de gènes neuronaux, incluant celui du BDNF. L'interaction cytoplasmique Htt-REST-NRSF prévient l'entrée de ce " *silencer* " dans le noyau et donc la suppression de l'expression génique du BDNF. La Huntingtine mutée, en interagissant plus faiblement avec REST-NRSF provoque une accumulation du complexe dans le noyau et une répression de l'expression, entre autres, du BDNF^{46,47}. Finalement, quel que soit le mécanisme impliqué, les altérations transcriptionnelles consécutives à l'expression de la Huntingtine mutée génèrent des dysfonctions de la transduction intra-neuronale, de la transmission synaptique et du support trophique normal. Tout ceci est donc *a priori* suffisant pour provoquer des dysfonctions précoces se traduisant par des manifestations fonctionnelles anormales et finalement la mort neuronale.

Altérations des transports axonal et vésiculaire

Les neurones sont des cellules fortement polarisées et composées d'un corps cellulaire et d'un axone principal dont la longueur peut être très importante. Néanmoins, la synthèse protéique est restreinte au corps cellulaire. Un transport actif est donc nécessaire pour alimenter l'axone et les terminaisons en matériel nouvellement synthétisé. D'un autre côté, les signaux extérieurs doivent être répercutés vers le corps cellulaire ce qui nécessite également un transport actif. Pour assurer les communications entre le corps cellulaire et les terminaisons axonales, il existe donc des moteurs moléculaires qui transportent

continuellement vésicules et organelles, en particulier, le long des microtubules. Les moteurs moléculaires sont unidirectionnels : les complexes dynéines sont responsables du transport rétrograde (terminaisons vers corps cellulaire) et les kinésines sont liées au transport antérograde (corps cellulaire vers membrane et terminaisons). Ces deux types de moteurs sont nécessaires à la survie neuronale et leurs altérations a des conséquences dramatiques pour les neurones. Pour preuve de cela, une dysfonction génétique du complexe dynéine-dynactine dans des neurones post-nataux inhibe le transport rétrograde et cause un phénotype dégénératif progressif. Différentes pathologies sont d'ailleurs associées à une perturbation du transport axonal⁸⁶⁻⁸⁸.

La Huntingtine joue un rôle important dans le trafic intracellulaire. Différentes études sur matériel humain ont révélé un enrichissement de la Huntingtine dans les compartiments cellulaires contenant des protéines associées aux vésicules⁸⁹. Dans le même sens, il a été observé que la Huntingtine et l'un de ses partenaires protéiques, HAP1, étaient transportés antérogradement et rétrogradement dans les axones à une vitesse caractéristique des vésicules se déplaçant le long des microtubules⁹⁰. Ces observations sont cohérentes avec l'interaction de HAP1 avec p150^{Glued} qui est une sous-unité du complexe dynactine. Finalement, d'autres observations démontrent que la Huntingtine cytosolique est colocalisée avec les microtubules, interagit avec la β -tubuline et est associée avec HIP1, HIP14 et la PACSIN1, des protéines impliquées dans le trafic intracellulaire⁹¹⁻⁹⁶. Ainsi, la Huntingtine participerait aux transports rétrograde et antérograde⁹⁷⁻⁹⁸.

Fonctionnellement, une réduction de l'expression de la Huntingtine cause des altérations du transport axonal chez la Drosophile⁹⁷. L'implication de la Huntingtine dans le transport intracellulaire est renforcée par l'observation récente que la Huntingtine stimule le transport axonal du BDNF et que cette fonction altérée en présence de Huntingtine mutée, conduit au détachement du complexe Huntingtine/HAP1/p150^{Glued} des moteurs moléculaires⁹⁸. L'altération du transport axonal se manifeste également par la présence de neurites dystrophiques démontrant une accumulation anormale de vésicules et d'organelles^{56,89}. L'accumulation neuritique sous forme d'agrégats de fragments N-terminaux d'Huntingtine mutée induit ainsi une altération du transport axonal^{97,99-102}. Dans ce cas, le blocage du transport pourrait être de nature physique mais également impliquer la titration par les agrégats de Huntingtine mutée de protéines motrices (p150^{Glued}, chaînes lourdes des kinésines).

Finalement, aux stades précoces de la MH, l'expression de la Huntingtine mutée induirait une perte de la fonction normale de la Huntingtine vis-à-vis d'HAP1/p150^{Glued}, un phénomène renforcé, aux stades plus tardifs, par un gain de fonction toxique de la protéine mutée sous forme agrégée.

Dysfonctions synaptiques

Une conséquence directe de l'altération du transport axonal est une malfonction de la transmission synaptique. Cette dysfonction serait en particulier liée à une déplétion en vésicules synaptiques et en protéines impliquées dans le recyclage de ces dernières ainsi que dans l'endocytose des récepteurs au niveau des terminaisons nerveuses. Différentes études suggèrent que la Huntingtine mutée induit une dysfonction synaptique en altérant la disponibilité de différentes protéines synaptiques¹⁰³ impliquées par exemple dans la fusion des vésicules avec la membrane plasmique pré-synaptique (complexine II), dans le recyclage vésiculaire (PACSIN1/syndapin) ou l'endocytose (HIP1)^{95,104,105}. Ces effets peuvent résulter d'une interaction directe de la protéine mutée avec des protéines synaptiques (i.e. PACSIN1), conduisant à leur séquestration. Alternativement, ces dérégulations seraient la conséquence d'un défaut au niveau transcriptionnel. Par ailleurs, la Huntingtine normale interagit avec différentes protéines vésiculaires intervenant dans l'endocytose (i.e. HIP1). Ces interactions sont modifiées en présence de la protéine mutée et perturberaient les processus synaptiques¹⁰³. Enfin, la Huntingtine mutée altère la fonction synaptique au niveau post-synaptique en inhibant l'expression et/ou l'activité de différents récepteurs aux neurotransmetteurs. Ainsi, en interférant avec la transcription Sp1-dépendante, la Huntingtine mutée induit une perte des récepteurs D1, D2 et D3¹⁰⁶. La Huntingtine mutée interagit également anormalement au niveau post-synaptique avec le récepteur A_{2A} pour l'adénosine^{107,108}. Enfin, la protéine mutée interfère avec la liaison de la Huntingtine normale avec la protéine PSD95 et dérégule l'activité, en particulier, du récepteur NMDA¹⁰⁹.

Dérégulations métaboliques

Des études par imagerie fonctionnelle démontrent, en utilisant la recapture de Fluoro-deoxyglucose comme traceur, un dysfonctionnement métabolique striatal très précoce, bien avant l'apparition de symptômes et en absence d'atrophie chez des patients atteints de la MH¹¹⁰⁻¹¹³. Ces observations sont en accord avec des études plus récentes réalisées par spectroscopie RMN et démontrant une augmentation des concentrations cérébrales en lactate dans le *striatum*¹¹⁴⁻¹¹⁶. De manière importante, la sévérité des atteintes métaboliques semble corrélée avec la taille des expansions CAG¹¹⁶. Dans le sens d'une altération plus générale de l'activité métabolique cellulaire induite par l'expression de la Huntingtine mutée, une réduction de la synthèse d'ATP musculaire est également observée chez des patients^{117,118}.

Par ailleurs, différentes études biochimiques *post mortem* mettent en évidence une diminution significative (39-59 %) de l'activité du complexe II-III (contenant la succinate déshydrogénase) dans le noyau caudé de patients atteints par la MH¹¹⁹⁻¹²¹. L'activité des complexes IV et I apparaît, par contre, respectivement,

peu perturbée ou pas du tout altérée^{119,120}. L'expression de la Huntingtine mutée affecte par ailleurs la synthèse des sous-unités protéiques constituant le complexe II dont la restauration réverse la toxicité de la protéine mutée¹²². Il existe donc une atteinte préférentielle de l'activité du complexe II dans la MH jouant un rôle instrumental dans la dégénérescence neuronale dans la MH¹²³.

Enfin, la présence de la Huntingtine mutée affecte d'autres fonctions mitochondriales. Des lymphoblastes de patients atteints de la MH démontrent une susceptibilité accrue à des agents pro-apoptotiques¹²⁴, associée à une altération du potentiel transmembranaire mitochondrial et à une dysfonction des capacités de rétention calcique de l'organite¹²⁵. Ces données récentes renforcent l'idée que la Huntingtine mutée, en interagissant directement avec la membrane externe de la mitochondrie^{125,126} fragilise sa fonction et, facilite, en aval, certains mécanismes de mort neuronale. En ce sens, la Huntingtine mutée abaisse le seuil de déclenchement de la perméabilité de transition induite par le calcium et favorise la libération cytosolique de cytochrome c¹²⁶. De plus, la protéine mutée sensibilise les cellules aux effets pro-toxiques d'une inhibition du complexe II, mais pas du complexe I¹²⁷. Enfin, il a été récemment démontré que les altérations mitochondriales induites par la Huntingtine mutée seraient favorisées par des mécanismes dépendant de p53¹²⁸.

L'ensemble de ces données convergent donc vers un rôle physiopathologique majeur d'une inhibition métabolique d'origine mitochondriale dans la MH.

Excitotoxicité

L'excitotoxicité, décrite pour la première fois par James Olney en 1969, implique une hyperactivation anormale et neurotoxique des récepteurs du glutamate¹²⁹. Le concept d'excitotoxicité directe d'Olney propose que le glutamate et ses analogues structuraux soient capables d'induire une mort sélective des neurones en interagissant de façon hautement spécifique avec les récepteurs glutamatergiques ionotropiques NMDA qui présentent une forte conductance calcique et qui sont présents sur certaines populations neuronales, notamment les neurones striataux épineux de taille moyenne. La suractivation des récepteurs provoquerait alors une entrée massive et anormale de Ca²⁺ dans l'espace intracellulaire conduisant à l'activation délétère d'une cascade excitotoxique aboutissant, en particulier, à l'activation de protéases protoxiques (caspases, calpaïnes). Cette hypothèse est étayée, en particulier, par l'observation que, chez les animaux, une hyperstimulation striatale des récepteurs NMDA par des agonistes, et par l'acide quinolinique en particulier, reproduit une dégénérescence striatale sélective semblable à celle observée dans la MH¹³⁰⁻¹³³.

Une autre forme d'excitotoxicité, indirecte cette fois, pourrait également aboutir à l'activation d'une voie

neurotoxique comparable dans la MH. Le concept d'excitotoxicité indirecte suppose qu'une atteinte, même partielle, du métabolisme énergétique neuronal induise une sensibilisation des récepteurs glutamatergiques de type NMDA, rendant excitotoxiques des concentrations physiologiques non toxiques de glutamate. Pour preuve de l'existence de ce phénomène, des antagonistes des récepteurs NMDA parviennent à bloquer la toxicité induite par des inhibiteurs métaboliques ou par des carences en substrats énergétiques^{123,134}. Par ailleurs, différents travaux ont démontré *in vivo* qu'une atteinte énergétique partielle mais entretenue, induite par le malonate ou l'acide 3-nitropropionique était à elle seule capable d'induire des lésions striatales, et une dégénérescence particulière des neurones épineux de taille moyenne, tout à fait semblable à celles observées dans la MH¹²³. Ce type de dégénérescence est fortement atténué par l'inhibition de la libération striatale de glutamate^{135,136} et des antagonistes des récepteurs NMDA¹³⁷, présumant que le déficit énergétique causé par un dysfonctionnement mitochondrial engendre une dégénérescence excitotoxique dans la MH.

Pendant longtemps, l'implication du glutamate dans la MH est restée spéculative¹³⁸⁻¹⁴⁰. Récemment, différentes études ont fortement impliqué la Huntingtine mutée comme un élément perturbateur de l'activité des récepteurs glutamatergiques susceptibles d'induire une excitotoxicité neuronale. Ainsi, des observations faites dans des modèles génétiques de la MH suggèrent une altération de la recapture du glutamate via une diminution de l'expression de GLT-1 ainsi qu'une augmentation de la neurotransmission glutamatergique, en général, et de l'activation des récepteurs NMDA, en particulier¹⁴¹⁻¹⁴⁷. Cette dernière serait plus particulièrement liée, en présence de la Huntingtine mutée, à une altération de l'activité de la sous-unité NR2B du récepteur^{145,148} qui est exprimée préférentiellement par les neurones épineux moyens au niveau du *striatum*. Ainsi, la Huntingtine mutée augmente le courant NMDA induit par le glutamate uniquement lorsque ce récepteur contient la sous-unité NR2B¹⁴⁹. Cette dérégulation intracellulaire serait médiée par une perte de la fonction de la protéine PSD95 normalement associée à la sous-unité NR2B et dont l'interaction avec cette dernière serait réduite par la Huntingtine mutée, engendrant un accroissement de l'activité du récepteur NMDA¹⁰⁹.

L'hyperactivation des récepteurs NMDA dans la MH aurait également pour origine un dysfonctionnement externe lié à une synthèse endogène accrue d'un agoniste de ces récepteurs, l'acide quinolinique. En effet, les niveaux corticaux et striataux, mais pas cérébelleux, d'acide quinolinique sont fortement augmentés chez des patients atteints de la MH à des stades précoces¹⁵⁰. Une autre étude du même groupe démontre également, chez la levure, que la régulation de la voie métabolique du tryptophane, qui aboutit à la formation d'acide quinolinique, est un facteur important dans la susceptibilité cellulaire à la Huntingtine mutée¹⁵¹. Ainsi, l'expression de la protéine mutée provoquerait une production cérébrale d'un agoniste des récepteurs NMDA, favorisant l'émergence d'une

excitotoxicité striatale.

Dérégulations calciques

Le calcium est un effecteur important du phénomène excitotoxique. Les perturbations de l'homéostasie calcique générées par l'expression de la Huntingtine mutée sont donc susceptibles d'amplifier la cascade excitotoxique et d'influer de manière importante sur la survie des neurones striataux¹⁵².

En plus de l'accroissement de l'activité des récepteurs NMDA et de la dérégulation de rétention calcique mitochondriale observés en présence de la Huntingtine mutée, un dysfonctionnement du récepteur inositol (1,3,4)-triphosphate perturberait la gestion striatale du calcium intracellulaire dans la MH (Figure 2). Ce dernier est un canal intracellulaire impliqué dans la libération du Ca²⁺ par le réticulum endoplasmique. Il existe 3 isoformes identifiées de ce récepteur dont le type 1 est exprimé de façon prédominante au niveau neuronal. C'est par des expériences de double-hybride utilisant la partie C-terminale du récepteur inositol (1,3,4)-triphosphate, que Tang *et al.*¹⁵³ ont mis à jour l'existence d'un complexe composé du récepteur inositol (1,3,4)-triphosphate de type 1, de la protéine HAP1 et de la protéine Huntingtine. Des expériences biochimiques ont démontré que la Huntingtine interagissait directement avec la partie cytosolique C-terminale du récepteur inositol (1,3,4)-triphosphate de type 1, interaction dépendante de la présence de HAP1 et de l'expansion polyglutamine. Dans des expériences de reconstruction de bicouche lipidique, Tang *et al.*¹⁵³ ont démontré une sensibilisation du récepteur inositol (1,3,4)-triphosphate de type 1 à son ligand, l'inositol (1,3,4)-triphosphate, en présence de la Huntingtine mutée. Ces données supportent donc que l'expression de la Huntingtine mutée produit une surcharge calcique intracellulaire en promouvant l'activation excessive du récepteur inositol (1,3,4)-triphosphate. Finalement, la surcharge cellulaire calcique, favorisée par l'accroissement de l'activité des récepteurs NMDA et le déficit métabolique, conduit d'une part, à l'activation des protéases calpaïnes calcium-dépendantes protoxiques et d'autre part, à la libération cytosolique de protéines pro-apoptotiques telles que le cytochrome c, Smac/Diablo ou l'AIF qui contrôlent la mort cellulaire caspase-dépendante et indépendante^{154,155}.

Rôle de la neurotransmission dans la susceptibilité striatale dans la MH

La Huntingtine mutée étant exprimée de manière ubiquitaire, les mécanismes mis en jeu dans la vulnérabilité préférentielle du *striatum* ne sont pas clairement définis. Les données expérimentales présentées plus haut suggèrent que les altérations de production/transport du BDNF cortical, le dysfonctionnement de la transcription CREB-dépendante et l'inhibition métabolique via la déficience du complexe II seraient impliqués dans ce phénomène. D'autres facteurs, environnementaux, pourraient

également jouer un rôle. Les données relatives à la physiologie du *striatum* nous indiquent que cette structure est un lieu d'intégration privilégié entre différents systèmes de neurotransmission : glutamatergique, dopaminergique et adénoenergique. La transmission glutamatergique, ou plutôt sa dérégulation, n'est pas le seul système extrinsèque impliqué dans la MH (voir plus haut). Différentes études récentes indiquent également un rôle des transmissions dopaminergiques et adénoenergiques dans la physiopathologie de la MH.

Le *striatum* reçoit l'innervation dopaminergique la plus dense du cerveau et le profil de neuro-dégénérescence de la MH progresse selon un gradient dorso-ventral qui correspond au gradient de concentration de dopamine dans le *striatum*¹⁵⁶. Ceci indique que, possiblement, la libération de dopamine pourrait participer à la vulnérabilité préférentielle et progressive du *striatum*. De manière intéressante, d'une part, la dopamine aggrave la mort neuronale induite par la Huntingtine mutée via l'activation de la voie pro-apoptotique c-Jun/JNK par stress oxydatif ; d'autre part, la dopamine accroît la formation des agrégats cellulaires via l'activation du récepteur D2 connu pour être préférentiellement localisé à la surface des neurones enképhalinergeriques, les plus vulnérables dans la maladie¹⁵⁷. *In vivo* l'inactivation du transporteur de la dopamine chez des souris exprimant la Huntingtine mutée produit également une augmentation des agrégats cérébraux et augmente la symptomatologie motrice des animaux¹⁵⁸. Même si le rôle pathologique des agrégats n'est pas clairement défini, ces données indiquent que la dopamine est un élément potentiellement modulateur de la toxicité induite par la protéine mutée. Un tel rôle est en accord avec des expériences démontrant que la réduction de dopamine striatale protège les neurones de cette structure d'une inhibition métabolique du complexe II mitochondrial^{159,160}.

Par ailleurs, la neurotransmission adénoenergique est altérée précocement dans le *striatum* des patients atteints de la MH. En effet, l'expression du récepteur A_{2A} pour l'adénoergine décroît fortement et précocement chez des patients et des souris transgéniques modèles de la pathologie¹⁶¹. De manière intéressante, au niveau du *striatum*, ces récepteurs sont principalement localisés au niveau des neurones enképhalinergeriques exprimant le récepteur D2 et les plus vulnérables dans la pathologie. Si l'on prend en compte le fait que l'activation des récepteurs A_{2A} post-synaptiques serait protectrice pour les neurones striataux^{162,163}, la baisse d'expression précoce pourrait entraîner une vulnérabilité accrue des neurones enképhalinergeriques. Ceci est en accord avec l'observation récente d'un ralentissement pathologique chez des souris exprimant la Huntingtine mutée et traitées par un agoniste de ces récepteurs¹⁶⁴. Néanmoins, comme c'est le cas pour la dopamine, la modulation adénoenergique dans le *striatum* pourrait avoir des effets plus complexes compte tenu de ses autres localisations, pré-synaptiques ou extra-neuronales¹⁶⁵.

BIBLIOGRAPHIE

Les références bibliographiques sont disponibles dans la seconde partie de ce manuscrit qui sera publiée dans le numéro de décembre 2007 de la *Revue Médicale de Bruxelles*.

Correspondance et tirés à part :

K. BANTUBUNGI et D. BLUM
INSERM U837
Centre de Recherche Jean-Pierre Aubert
Université de Lille 2
1 place de Verdun
F-59045 Lille Cedex
E-mail : Bantubungi@lille.inserm.fr
Blum@lille.inserm.fr

Travail reçu le 12 décembre 2006 ; accepté dans sa version définitive le 12 juin 2007.