

L'UNIVERSITE D'EVRY VAL D'ESSONNE  
Ecole Doctorale « Des Génomes Aux Organismes »



THESE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE D'EVRY VAL D'ESSONNE

Spécialité

Biologie Cellulaire et Moléculaire

**Utilisation des cellules souches embryonnaires  
humaines porteuses de la mutation causale de la  
maladie de Huntington en tant que nouveau modèle  
pathologique**

Maxime Feyeux

Soutenue le 12 Octobre 2011

Devant le jury composé de :

Dr. Jocelyne Caboche, Rapporteur

Dr. Gilles Bonvento, Rapporteur

Pr. Bernard Prum, Président

Dr. Jean Charles Lievens, Examineur

Dr. Anselme Perrier, Directeur de thèse

Instituts  
thématiques



**Inserm**

Institut national  
de la santé et de la recherche médicale





## **Abréviations**

ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
BAC	Chromosome artificiel de bactérie
BDNF	Facteur neurotrophique dérivé du cerveau
CHCHD2	Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 2
cM	Centième de Morgan
CNS	Système nerveux central
CREB	Protéine liant le motif de réponse à l'adénosine monophosphate cyclique
EGF	Facteur de croissance épidermique
$\beta$ -FGF	Facteur de croissance des fibroblastes $\beta$
hESC	Cellules souches embryonnaires humaines
hESC-MH	Cellules souches embryonnaires humaines porteuses de la mutation causale de la maladie de Huntington
hPSC	Cellules souches pluripotentes humaines
HDCRG	Groupe de recherche collaborative de la Maladie de Huntington
HDAG	Groupement d'analyses transcriptomiques de maladies héréditaires
Hdh	Homologue murin du gène de la HTT
<i>HTT</i>	<i>Huntingtine</i>
<i>IT15</i>	Transcrit intéressant numéro 15
kb	Kilobase
MCI	Masse cellulaire interne
MH	Maladie de Huntington
MSN	Neurones GABAergiques moyens épineux
mut-HTT	<i>Huntingtine</i> mutante
NIH	Institut national de santé des Etats Unis d'Amérique
NSC	Cellules souches neurales
NSC-MH	Cellules souches neurales porteuses de la mutation causale de la maladie de Huntington
PKIB	Inhibiteur $\beta$ de la protéine kinase dépendante de l'adénosine monophosphate cyclique
polyQ	Poly-glutamine
REST/NRSF	Facteur de transcription inhibiteur liant l'élément répresseur/facteur inhibiteur spécifique des neurones
siRNA	Petit ARN interférent
Sox8	Motif 8 similaire à la région déterminante du sexe du chromosome Y
TRIM4	Tripartite motif containing 4
YAC	Chromosome artificiel de levure
3'UTR	Région non traduite en 3' de l'acide ribonucléique messenger

## Sommaire

Abréviations.....	3
Sommaire.....	4
Liste des figures.....	6
Remerciements.....	8
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>11</b>
<b>I. La maladie de Huntington.....</b>	<b>12</b>
A. Historique.....	12
1) Découverte.....	12
a) De Salem à Long-Island.....	12
b) Tableau clinique.....	15
c) A la recherche du gène.....	23
2) Avancées scientifiques.....	25
a) <i>IT15/HTT</i> .....	25
b) Une protéine omniprésente mais insaisissable.....	30
c) Mécanistique pathologique.....	37
d) Les effets transcriptionnels.....	48
e) Les stratégies thérapeutiques.....	54
B. Modélisation.....	55
1) Une variété de modèles.....	55
a) Les modèles animaux.....	55
b) Les modèles cellulaires.....	60
c) Les tissus humains.....	61
d) La versatilité des modèles.....	61
2) Les limites de la modélisation.....	63
a) La variabilité interspécifique.....	63
b) La variabilité intraspécifique.....	63
c) La stœchiométrie allélique.....	64
d) Instabilité génétique.....	64
e) Une précaution simple.....	65
<b>II. Les hESC : un outil au service de la médecine.....</b>	<b>66</b>
A. Les cellules souches.....	66
1) Un concept, des réalités.....	66
a) La variété des cellules souches.....	66
b) Les cellules souches pluripotentes.....	67
2) Les cellules souches embryonnaires humaines.....	68
3) Cadre légal et éthique.....	69
4) Les Mécanismes de la pluripotence, comprendre et copier.....	70
a) La découverte de la reprogrammation.....	70
b) Un changement de paradigme.....	71
5) Un outil versatile.....	72
a) La modélisation pathologique.....	72
b) La thérapie substitutive.....	74
B. La différenciation neurale.....	75
1) L'induction neurale.....	75
2) Obtenir des cellules neurales striatales à partir de hESC.....	78
3) La dérivation de NSC à partir de rosettes neurales.....	79
<b>III. L'approche transcriptomique.....</b>	<b>80</b>
A. Le transcriptome.....	80
1) L'identification des transcrits.....	80
2) La révolution des puces.....	81

RESULTATS.....	83
Objectifs et stratégie générale des recherches.....	85
Résumé des résultats .....	86
➤ Article 1 :.....	87
➤ Expériences supplémentaires : .....	89
DISCUSSION.....	115
1) L'approche transcriptomique .....	117
Le choix des types cellulaires impliqués dans notre étude .....	117
Analyses sur neurones différenciés.....	118
Les gènes candidats.....	119
Cohérence avec les autres études transcriptomiques de la MH.....	119
Combien de lignées cellulaires pour modéliser une pathologie génétique? .....	120
2) Etude des gènes candidats .....	122
Analyse de CHCHD2 (coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 2) .....	123
Analyse de PKIB (cAMP-dependent Protein Kinase Inhibitor protein $\beta$ ).....	124
Analyse de TRIM4 (Tripartite Motif containing 4) .....	125
3) Mieux exploiter le modèle cellulaire.....	125
Le contrôle qualitatif des modèles cellulaires pathologiques .....	125
PERSPECTIVES.....	127
1) Comment améliorer la validation des perturbations liées à la HTT ?.....	129
I. La perte de fonction .....	129
II. Le gain de fonction .....	130
III. L'expression inductible .....	131
IV. Relations entre gènes candidats .....	132
2) La stratégie d'analyse transcriptomique.....	132
I. Des Puces en constante évolution .....	132
II. Vers une réelle analyse transcriptomique .....	133
3) Possibilités offertes par le modèle.....	133
I. Différencier sélectivement les hPSC .....	133
II. Le risque de la stratégie tout hiPS.....	135
Conclusions personnelles.....	135
ANNEXES.....	137
➤ Article 2 :.....	161
➤ Article 3 :.....	163
Bibliographie.....	137
<b>Summary</b> .....	159
Résumé .....	166

## Liste des figures

Figure 1 : Georges Huntington .....	12
Figure 2 : Noyau caudé du striatum .....	17
Figure 3 : Imagerie de la neurodégénérescence au cours de la MH .....	17
Figure 4 : Atteintes périphériques des modèles murins .....	21
Figure 5 : Atteintes périphériques des patients de la MH .....	22
Figure 6 : Corrélacion inverse entre nombre de répétitions et âge de déclaration des symptômes.....	27
Figure 7 : La transmission paternelle est responsable du biais d'anticipation de la MH.....	29
Figure 8 : Interactions moléculaires de la HTT et fonctions cellulaires .....	35
Figure 9 : Modifications post-traductionnelles de la HTT .....	37
Figure 10 : Mécanismes intracellulaires connus de la maladie de Huntington .....	39
Figure 11 : Mécanismes intercellulaires connus de la maladie de Huntington .....	39
Figure 12 : Formation des agrégats et voies de dégradation connues .....	41
Figure 13 : Lien entre excitotoxicité, gestion du calcium et perméabilité mitochondriale .....	44
Figure 14 : Interaction protéiques de la HTT centrées sur le transport vésiculaire.....	47
Figure 15 : Coordination du transport vésiculaire par la Huntingtine .....	48
Figure 16 : Les différents mécanismes proposés pour les effets transcriptionnels de la HTT mutée ..	53
Figure 17 : Les stratégies thérapeutiques en cours d'évaluation pour le traitement de la MH .....	55
Figure 18 : Capacité de différenciation des cellules souches au cours du développement .....	67
Figure 19 : Lignée hESC porteuse de la mutation causale de la MH au stade indifférencié .....	69
Figure 20 : Mécanismes de l'induction du neuroectoderme.....	78
Figure 21 : Principe de détection des sondes de puces à ADN.....	81
Figure 22 : Vitesse du transport vésiculaire du BDNF dans les NSC dérivées de hESC.....	112
Figure 23 : L'activation de la voie de signalisation IGF1/Akt améliore le défaut de transport du BDNF dans les neurones dérivés de hESC-MH .....	113
Figure 24 : Réseau des nouveaux biomarqueurs de la MH.....	124
Figure 25 : Effet de la perte d'expression de la HTT sur l'expression d'un biomarqueur en fonction de l'effet de la mutation. ....	130

Tableau 1 : Pénétrance de la MH en fonction du nombre de répétitions CAG du gène <i>HTT</i> .....	27
Tableau 2 : Interactions protéiques principales de la HTT .....	33
Tableau 3 : bilan des études transcriptomiques récentes réalisées dans le contexte de la MH .....	50
Tableau 4 : Modèles murins .....	57
Tableau 5 : modélisation pathologique à l'aide d'hiPS .....	73
Tableau 6 : Récapitulatif des gènes candidats et de leur comportement par rapport à la mutation .....	88

## Remerciements

Nous sommes sur les épaules des Géants.

Les Géants sont parmi nous! Il n'y a pas de raison de paniquer cependant, la plupart sont enclins à nous laisser monter sur leurs épaules.

Je remercie donc les Géants : ceux qui n'ont pas vraiment eu le choix bien sûr (j'avoue ne jamais avoir demandé à James D. Watson, Francis Crick ou Rosalind Franklin l'autorisation de monter sur leurs épaules avant chaque transfection ou PCR), mais aussi et surtout ceux qui auraient pu refuser :

Merci donc à Anselme Perrier, mon directeur de thèse pour m'avoir accueilli au sein de son équipe et m'avoir permis de concilier ces deux disciplines fascinantes que sont la neurologie et l'étude des cellules souches, un rêve d'étudiant qui reste bien vivant. Merci aussi pour avoir su maintenir une ambiance de travail agréable en toutes circonstances.

Merci à Marc Peschanski, sans lequel le travail dans ce cadre privilégié qu'est I-stem n'aurait tout simplement pas été possible. Sans Marc, je ne serais plus en France à l'heure qu'il est, pays où il n'y aurait peut-être pas de cellules souches embryonnaires humaines. Merci pour les conditions de travail exceptionnelles dont j'ai profitées à I-stem. Je suis donc immensément reconnaissant de cette opportunité qui m'a été offerte.

Un grand merci aux membres de mon jury de thèse :

Jocelyne Caboche, Gilles Bonvento, Bernard Prum, Jean Charles Lievens, merci d'avance pour le courage requis pour lire ma thèse et la juger. C'est un honneur d'être évalué par ceux qui vont, je l'espère, devenir mes pairs.

Merci à Laetitia Aubry, pour avoir guidé mes premiers pas à Istem dans la joie et la bonne humeur, il y a bien longtemps, dans un laboratoire qui ne ressemblait pas vraiment à ce à quoi il ressemble aujourd'hui.

Merci à Aurore Bugi, qui bien qu'elle n'ait jamais eu l'obligation de le faire, a su trouver le temps pour m'aider dans les moments où j'en avais le plus besoin, sans regarder l'heure sur sa montre. J'apprécie tout particulièrement de n'avoir eu droit qu'à de « rares » froncements de sourcils au regard du niveau sans cesse diminué de mes blagues, en salle de culture ou ailleurs.

Merci à Alexandra Benchoua, pour avoir, avec Laetitia Aubry permis les interactions qui m'ont donné un accès facilité à mon phénotype favori, lequel a occupé au bas mot des centaines de mes heures de culture, les cellules souches neurales.



Merci à Nathalie Lefort pour ses conseils, sa bonne humeur, sa capacité à passer de Oups ! à Nature Biotech en quelques secondes, et pour son intégrité.

Merci à Fany Bourgois-Rocha, que j'ai entraînée dès ses premiers jours à I-stem dans des journées de cultures aux horaires parfois peu avouables, et qui n'a (presque) jamais ronchonné. Elle prend ma relève et je pense que les cellules seront dans de bonnes mains avec elle.

Merci à Jérémie Charbord pour ses coups de mains, ses bonnes blagues et sa tolérance face aux miennes. J'espère qu'un jour nous pourrons fonder une école de ninjas/commandos armés de shurikens estampillés « Big Willie Style » et que nous rencontrerons le succès que nous méritons.

Merci à Morgane Gauthier, source inépuisable d'enthousiasme scientifique et talentueuse raccourcisseuse de trajets de RER, sujet d'expériences d'anosmie du sommeil, voisine de confiance et j'en passe...

Merci à Antoine Marteyn, psychopathe attachant, compagnon de galèRER sur lequel on peut s'appuyer et voisin de grand secours.

Merci à Sophie Aubert pour son humour, ses qualités indéniables de voisine de bureau et son aide technique, écourtée par une magnifique aventure.

Merci à Jérôme Denis pour ses qualités d'interlocuteur scientifique, sa présence tardive au laboratoire qui met du baume au cœur à la sortie de la salle de culture, et pour avoir été un presque-voisin de bureau compréhensif pendant de nombreux mois.

Merci à Pedro pour tous ses bons conseils, scientifiques ou non et dispensés sans compter, pour ses qualités indéniables de danseur et pour sa bonne humeur communicative.

Merci à Camille Nicoleau pour de grandes discussions en culture et un certain sens de l'efficacité qui est crucial au sein de l'équipe.

Merci à Benoite Champon, Camille Lecuyer, Rémi Vernet pour avoir contribué à quelques épisodes mémorable de ma vie istemienne.

Merci à Jessica Feteira pour m'avoir fait suivre un mail très important, et m'avoir suivi dans les péripéties de la condition de moniteur.

Merci à Véronique Cordette, Valérie Itier, Michel Cailleret, et l'ensemble du secteur quatre pour ces petits moments d'humour, ces petits conseils, et les découvertes musicales qui ont ponctué mon quotidien.

Je remercie aussi mes amis Aurélien, Blaise, Franck, Julie, Mélodie, Romain et les autres qui ont su résister à mon isolement parisien et ont continué contre vents et marées à me proposer des sorties, visites, voyages, et lectures de manuels de survie! Bref, merci d'avoir tenté de me garder en contact avec une partie importante du monde réel.

Je remercie mes parents pour leur soutien indéfectible au cours de ma vie, quels qu'aient été mes choix, et sans lesquels, aussi trivial que cela puisse paraître, je ne serai pas là.

Je remercie mon frère Julien qui a toujours été un modèle pour moi, qui a su trouver les mots pour que je puisse me rendre à l'évidence : le vivant plutôt que les bilans de forces. Merci d'avoir supporté en silence mes années les plus terribles, et d'accompagner les suivantes avec talent.

Je remercie enfin ma femme Laetitia qui a su m'accompagner et m'épauler au long de ma thèse et m'a offert le plus beau des cadeaux pendant celle-ci, mon fils Luc.

# INTRODUCTION

# I. La maladie de Huntington

## A. Historique

### 1) Découverte

#### a) De Salem à Long-Island

En 1692, un « procès » pour sorcellerie a eu lieu dans un petit village de l'état du Massachusetts aux Etats-Unis. Les « sorcières » incriminées présentaient des troubles de l'humeur et des mouvements incontrôlés. Parmi les accusés, certains étaient des descendants d'immigrants de Bures dans le Suffolk en Angleterre, lignée dont certains descendants sont aujourd'hui atteints de la MH. Cette information fait penser à des observateurs modernes, au fait du caractère héréditaire de la MH, que certaines « sorcières » pourraient avoir été atteintes de la maladie (Maltzberger 1961). Près de deux siècles plus tard, après quelques descriptions partielles de la maladie (Charles Oscar Waters 1842 ; Charles Gorman 1846 ; Johan Christian Lund 1860), le 13 avril 1872, George Huntington, un jeune médecin de 22 ans (voir Figure 1), publie dans « The Medical and Surgical Reporter : A Weekly Journal » un article fondateur intitulé « On Chorea » (Huntington 2003). La partie de cet article qui traite d'une chorée héréditaire est remarquablement précise et concise et permet une très juste introduction à la maladie qui portera son nom.

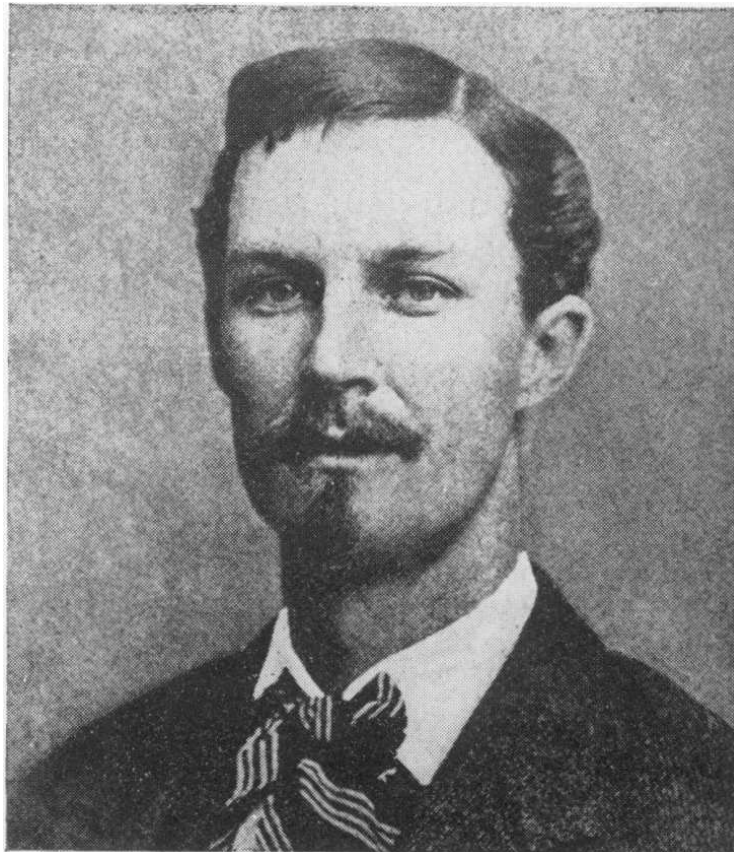


Figure 1 : Georges Huntington (modifié de (Huang, Turner et al. 2011))

Je vais donc m'appuyer sur des extraits du texte de Georges Huntington "On Chorea" pour illustrer sa pertinence remarquable.

*" La chorée héréditaire, comme je vais l'appeler, est heureusement limitée à quelques rares familles et leur a été transmis, en sombre héritage des générations passées. Elle n'est évoquée par ceux dont les veines portent les germes de la maladie qu'avec une sorte d'horreur, et n'est mentionnée en tant que "ce désordre" seulement par nécessité absolue. Elle reproduit généralement tous les symptômes de la chorée commune, dans une forme aggravée. Elle ne se manifeste presque jamais avant l'âge adulte ou l'âge mûr, puis s'aggrave progressivement mais sûrement, augmentant par degrés, son développement occupant souvent des années, jusqu'à ce que le malheureux patient ne soit plus que l'ombre frémissante de lui-même. "*

L'article fondateur de la description moderne de la MH ne parle pas que de chorée héréditaire, mais également de « chorée commune », que l'on pourrait associer aujourd'hui à de l'hyperactivité infantile ou à des troubles psychiques. Georges Huntington ne parle vraisemblablement de la « chorée commune » que pour introduire la maladie qui prendra son nom, documentée par son père et son grand père au cours de leur activité de médecin à Long Island. Il pointe à juste titre la rareté de cette maladie, dont la prévalence est de trois à sept naissances sur 100 000 en Europe occidentale et plus rare en Afrique et en Asie. Il devient concis, précis et étonnamment pertinent pour son époque lorsqu'il aborde en seulement une page et demie l'existence d'une chorée héréditaire. Cette publication est une très bonne introduction à la maladie. Elle est très complète et encore largement d'actualité malgré ses 130 ans.

En particulier, G. Huntington décrit précisément le caractère héréditaire de la maladie :  
*" Lorsque un ou deux des parents ont montré les manifestations de la maladie, et plus particulièrement lorsque ces manifestations ont été d'une grande gravité, un ou plusieurs des enfants souffrent presque invariablement de cette maladie s'ils vivent jusqu'à l'âge adulte. Mais si, par hasard, ces enfants traversent la vie sans elle, le fil est cassé et les petits-enfants et les arrière petits-enfants des malades d'origine peuvent être assurés qu'ils sont indemnes de la maladie. "*

A une époque où les travaux de Mendel sur l'hérédité étaient à peine publiés et semblaient lentement dans l'indifférence générale, cette remarque est très intéressante. Il s'agit d'une description aujourd'hui évidente du mode de transmission autosomique dominant de la maladie.

George Huntington a aussi clairement décrit les atteintes psychiatriques associées à la maladie :

*" il y a une grande prépondérance du tempérament nerveux. [...] quand bien même ils n'aient pas été d'un tempérament nerveux lorsqu'ils étaient en bonne santé. [ ... ] La tendance à la folie, et parfois cette forme d'aliénation mentale qui conduit au suicide, est marquée. J'ai connaissance de plusieurs cas de suicide de personnes souffrant de cette forme de la chorée, ou qui appartenaient à des familles où la maladie existait. Avec la progression de la maladie, l'esprit devient plus ou moins diminué, jusqu'à la folie, tandis que dans d'autres le corps et l'esprit font graduellement défaut jusqu'à ce que la mort ne les soulage de leurs souffrances. J'ai connaissance de deux hommes mariés, dont les femmes sont vivantes et qui font constamment l'amour à des jeunes femmes, sans sembler percevoir qu'il s'agit là d'un comportement inapproprié. "*

Les troubles du comportement, de l'humeur et de la mémoire ainsi que des changements de personnalité (notamment des pertes d'inhibitions) sont des caractéristiques éprouvées de la maladie, pouvant survenir avant l'apparition de la chorée (van Duijn, Kingma et al. 2007); (Walker 2007). Par ailleurs, les tentatives de suicide sont plus fréquentes chez les personnes porteuses de la mutation causale de la MH (Farrer 1986).

Un autre trait fondamental de la maladie est la survenue de la chorée uniquement à l'âge adulte :

*" Je n'ai pas connaissance d'un seul cas qui ait montré des signes marqués de la chorée avant l'âge de trente ou quarante ans, tandis que ceux qui passent la quarantième année, sans symptôme de la maladie sont rarement atteints. "*

Là encore, la description est tout à fait pertinente, la maladie de Huntington est dans sa forme classique un trouble de l'adulte, avec apparition des symptômes en moyenne entre 35 et 42 ans (Quinn and Schrag 1998). Cependant, la maladie peut débuter à tout âge et cinq à 10% des cas se déclarent avant 20 ans. Ces cas dits « juvéniles » peuvent très bien avoir été assez rares pour ne pas avoir été rencontrés parmi les malades suivis par la famille Huntington. Par ailleurs, les manifestations de la maladie dans les cas précoces sont différentes notamment par l'absence fréquente de chorée, signe le plus évident pour le médecin.

Il décrit enfin les troubles du mouvement, et la fin inéluctable de la maladie :

*"Cela commence comme une chorée ordinaire pourrait commencer, par l'action irrégulière et spasmodique de certains muscles, du visage, des bras, etc. Ces mouvements augmentent progressivement, lorsque des muscles jusqu'à présent non affectés subissent à leur tour des contractions spasmodiques, jusqu'à ce que tous les muscles du corps soient touchés (à l'exception des involontaires), et les pauvres patients présentent un spectacle, qui est tout sauf agréable à voir. Je n'ai jamais connu une rémission ou même une amélioration des symptômes de cette forme de chorée; du moment où elle commence, elle s'accroche jusqu'à la tragique fin. Aucun traitement ne semble être de quelque utilité, et même aujourd'hui, sa fin est si bien connue de la victime et de ses amis, que la consultation médicale est rarement demandée. Il semble pour le moins qu'elle soit incurable."*

George Huntington conclut son essai sur l'inévitabilité de l'issue fatale de la maladie. Malheureusement, plus de 130 ans après l'écriture de ce texte, et près de 20 ans après la découverte du gène de la MH, ce constat est toujours d'actualité.

L'exercice de la médecine au sein de la famille Huntington a donc permis de collecter des informations sur une grande durée et a donné accès à un tableau clinique pertinent. On peut considérer que la structure médicale et sociale du 19<sup>ème</sup> siècle a fourni un contexte favorable à une compréhension d'une maladie héréditaire à évolution longue grâce à la présence conjuguée d'une tradition familiale médicale, de la proximité entre médecin et familles, et d'une ouverture des colonnes des périodiques médicaux aux constatations d'un médecin de famille.

## **b) Tableau clinique**

### b.1 L'évolution des symptômes

Les signes cliniques de la MH deviennent perceptibles entre 35 et 42 ans pour la majeure partie des patients (Quinn and Schrag 1998), mais peuvent commencer à tout âge. L'évolution de la maladie s'étale en moyenne sur 17 à 20 ans, mais semble d'autant plus lente qu'elle débute tardivement (Mahant, McCusker et al. 2003). Le tableau clinique de la MH dans sa forme classique regroupe trois types de symptômes : moteurs (chorée, dystonie, bradykinésie, troubles de la marche et de l'équilibre, aphasie), cognitifs (troubles de la planification, de l'attention et troubles mnésiques) et psychiatriques (anxiété, dépression, irritabilité, agressivité, désinhibition). *In fine*, le tableau clinique devient homogène, mais l'apparition, la progression et l'étendue des symptômes cognitifs et psychiatriques varient considérablement entre les individus (Berrios, Wagle et al. 2002). Certains symptômes sont moins fréquents et peuvent n'être qu'indirectement liés à la maladie (épilepsie, troubles du sommeil ou incontinence).

### b.2 Les symptômes physiques

Les symptômes physiques sont généralement les premiers à être remarqués, car les symptômes cognitifs et psychiatriques ne sont généralement pas suffisamment graves pour être reconnus dans les phases précoces. Les symptômes physiques initiaux les plus communs sont des mouvements saccadés, aléatoires et incontrôlables appelés chorée. Elle est dans un premier temps limitée à une agitation générale, des petits mouvements involontairement initiés et inachevés, un manque de coordination et un ralentissement des mouvements saccadés oculaires. Les premiers symptômes cliniques sont d'ordre moteur, plus précisément une perte du contrôle des muscles faciaux, des parties distales des membres, puis du thorax (Folstein, Leigh et al. 1986). Par la suite, la progression de la maladie entraîne une rigidité et des anomalies posturales signes d'une altération progressive du striatum. Cette évolution fait qu'après une phase croissante puis un plateau, l'atteinte choréique décline face à la bradykinésie, la dystonie et la rigidité. Progressivement, les fonctions psychomotrices sont affaiblies, de sorte que toute action qui exige un contrôle musculaire est affectée. Les conséquences deviennent alors très reconnaissables : instabilité posturale, expressions faciales anormales, difficultés de mastication, de déglutition et de diction. Ces difficultés, combinées à un désordre métabolique, causent une forte perte de poids qui évoluera jusqu'à la cachexie.

### b.3 Les symptômes cognitifs

Les aptitudes cognitives sont aussi diminuées progressivement, sont particulièrement touchées : les fonctions exécutives, comprenant la planification, la flexibilité cognitive, la pensée abstraite, l'intégration de règle générale, l'initiation des actions appropriées et l'inhibition des actions inappropriées (Montoya, Price et al. 2006). L'évolution de la maladie instaure des troubles mnésiques affectant les mémoires : à court terme, à long terme, autobiographique, procédurale et de travail (Montoya, Price et al. 2006). Les troubles cognitifs ont tendance à s'aggraver au fil du temps, conduisant finalement à la démence.

#### b.4 Les symptômes psychiatriques

Les manifestations psychiatriques sont l'irritabilité, l'apathie, l'anxiété, la dépression, un affichage réduit d'émotions, l'égoïsme, l'agressivité et les comportements compulsifs (van Duijn, Kingma et al. 2007). Les malades rencontrent de plus des difficultés à reconnaître les expressions faciales négatives (Montoya, Price et al. 2006). Pour de nombreux malades et leurs familles, ces symptômes sont parmi les aspects les plus pénibles de la maladie, et constituent souvent l'élément déclencheur de l'institutionnalisation.

#### b.5 Les causes de la mort

La pneumonie (45%), les maladies cardiovasculaires (25%) et la cachexie (11%) sont les causes les plus fréquentes de la mort. Les suicides (6%) totalisent plus de deux fois la prévalence de la population globale, mais il faut noter qu'il n'y a pas de différence entre personnes atteintes et non atteintes de la même fratrie, traduisant peut-être un contexte familial anxigène (Lanska, Lavine et al. 1988) ; (Sorensen and Fenger 1992). De façon opposée, la fréquence de diagnostic de cancers est faible pour les patients de la MH, n'étant que de 5% contre 31% pour les personnes non atteintes de la même fratrie (Sorensen and Fenger 1992 ; Sorensen, Fenger et al. 1999). La variabilité naturelle des symptômes de la MH pourrait cependant causer un défaut de diagnostic en masquant des symptômes qui auraient pu conduire à une consultation oncologique en dehors du contexte de la MH, par exemple, les patients souffrent majoritairement d'anorexie à leur mort. L'ensemble de ces phénomènes sont responsable d'une espérance de vie limitée à 54-55 ans (Harper 2005).

#### b.6 La phase pré-symptomatique

Il est maintenant bien établi que des désordres cognitifs subtils peuvent apparaître jusqu'à dix ans avant le début de la phase symptomatique. Il a été proposé que les symptômes psychiatriques puissent être détectés plus précocement encore. Par ailleurs, il a été démontré que les mouvements de saccades oculaires, perturbés chez les patients symptomatiques (Collewijn, Went et al. 1988 ; Garcia Ruiz, Fontan et al. 2001) le sont aussi chez les patients pré-symptomatiques (Berardelli, Noth et al. 1999 ; Tabrizi, Langbehn et al. 2009). Un test non invasif fondé sur cette approche pourrait permettre de détecter la dégénérescence du noyau caudé (Figure 2) jusqu'à dix ans avant la phase clinique (Tabrizi, Langbehn et al. 2009). Dans tous les cas, les volumes corticaux (principalement frontaux) et striataux commencent à être altérés avant l'âge prévisible de déclaration chez les individus porteurs morts accidentellement (Gomez-Tortosa, MacDonald et al. 2001). De la même façon, l'utilisation de techniques d'imagerie montre une atrophie cérébrale préclinique significative, à même d'expliquer les désordres précoces et subtils précédemment évoqués (Figure 3). Il existe donc une phase « asymptotique » ou paucisymptomatique qui précède tout déclin fonctionnel majeur dans la MH. Ceci soulève l'espoir d'une intervention efficace pour ralentir cette progression pathologique et étendre la période pendant laquelle un individu porteur jouit d'une vie exempte de morbidité de la MH (Thieben, Duggins et al. 2002). Cette fenêtre est celle la plus à même de valider un intérêt d'agents neuroprotecteurs comme la minocycline, le co-enzyme Q10, ou la créatine, autant de stratégies proposées pour le traitement de la MH.



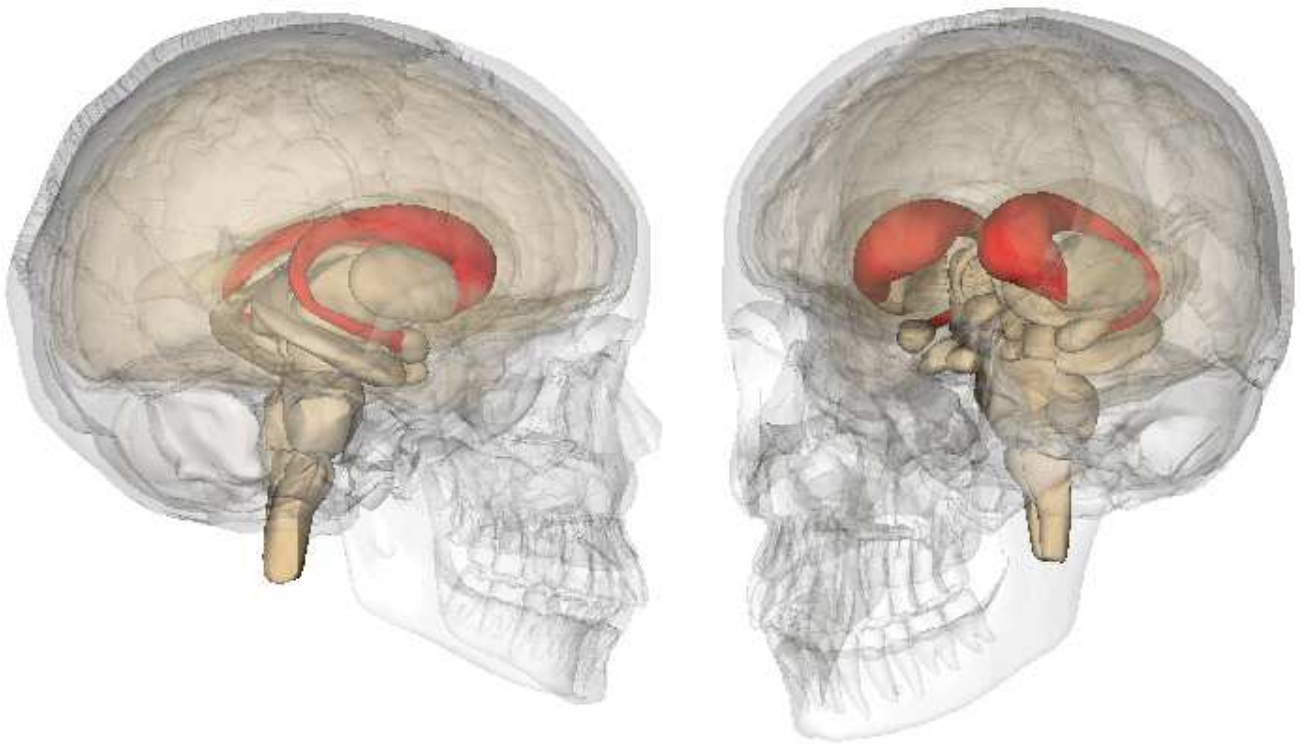


Figure 2 : Noyau caudé du striatum (modifié de Life Science Databases)

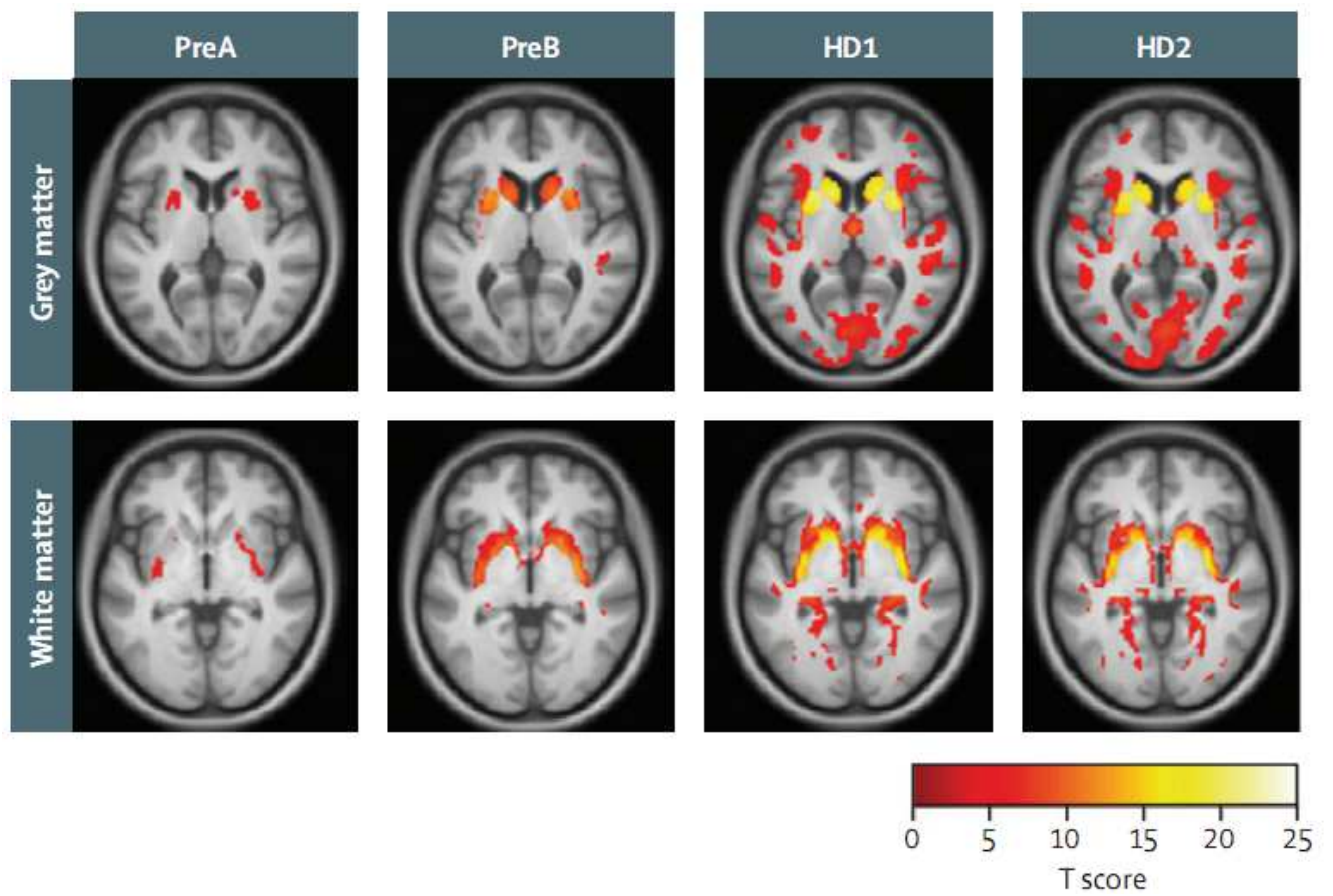


Figure 3 : Imagerie de la neurodégénérescence au cours de la MH (modifié de (Ross and Tabrizi 2011))

### b.7 Une neurodégénérescence ciblée

La pathologie de la maladie de Huntington (MH) montre une spécificité neuronale marquée par l'atrophie du noyau caudé et du putamen (Reiner, Albin et al. 1988 ; Vonsattel and DiFiglia 1998).

Le système de classement le plus couramment utilisé pour évaluer la gravité de la dégénérescence dans la MH a été développé par le neuropathologiste Jean Paul Vonsattel à l'Université de Columbia en 1985. Il est fondé sur la dégénérescence striatale dans les tissus post mortem et classifie les cas de MH en cinq grades de gravité différents (0 à 4). Le grade 0 est indiscernable de cerveaux normaux à l'examen macroscopique. Cependant, 30 à 40% de perte neuronale peut être détecté dans la tête du noyau caudé après examen histologique. Le grade 1 montre une atrophie cérébrale, la perte neuronale et l'astroglie étant localisées dans la queue et, dans certains cas, dans le corps du noyau caudé. Les grades 2 et 3 sont caractérisés par une atrophie progressive du striatum. Le grade 4 comprend les cas les plus graves de MH avec une importante atrophie du striatum et jusqu'à 95% de perte neuronale (Vonsattel, Myers et al. 1985). Cependant, une étude plus profonde de la dégénération striatale révèle qu'elle n'est pas homogène. Il y a de façon certaine une dégénération sélective des MSNs (Marshall, Landis et al. 1983 ; Ferrante, Kowall et al. 1985 ; Graveland, Williams et al. 1985 ; Seto-Ohshima, Emson et al. 1988 ; Goto, Hirano et al. 1989; Ferrante, Kowall et al. 1991 ). Les neurones cholinergiques, et les neurones de Deiters semblent au moins transitoirement épargnés (Dawbarn, De Quidt et al. 1985 ; Ferrante, Kowall et al. 1985 ; Ferrante and Kowall 1987 ; Albin, Reiner et al. 1990). Pour les grades les plus avancés de la maladie, les projections vers toutes les cibles striatales sont perdues à l'exception d'une partie des projections vers la substantia nigra pars compacta (Reiner, Albin et al. 1988). Bien que le striatum soit la région la plus affectée, d'autres régions subissent une perte neuronale significative. Il n'est pas clair qu'il s'agisse d'effets secondaires dus à la mort striatale ou d'événements autonomes plus tardifs. En effet dès le grade 3, le cortex (particulièrement les couches III, V, et VI), le globus pallidus, le thalamus, le noyau subthalamique, la substantia nigra pars reticulata (Richardson 1990 ; Ferrante, Kowall et al. 1991), la matière blanche, et même le cervelet peuvent être affectés (Vonsattel and DiFiglia 1998). L'imagerie fonctionnelle a récemment mis en évidence l'atrophie de l'hypothalamus chez les patients atteints de la MH (Kassubek, Gaus et al. 2004 ; Kassubek, Juengling et al. 2005 ; Politis, Pavese et al. 2008) ce qui confirme des soupçons qui existaient sur des sous parties de l'hypothalamus (Kremer, Roos et al. 1990 ; Kremer, Roos et al. 1991 ; Petersen, Gil et al. 2005). Les améliorations des techniques de neuro-imagerie ont permis de corrélérer certains symptômes avec les modifications anatomiques qui semblent les causer au sein du cerveau (Rosas, Feigin et al. 2004 ; Paulsen, Magnotta et al. 2006 ; Bohanna, Georgiou-Karistianis et al. 2008 ; Rosas, Salat et al. 2008). Ces altérations précèdent les symptômes associés (Rosas, Hevelone et al. 2005 ; Rosas, Tuch et al. 2006). Un symptôme n'est ainsi mesurable que lorsqu'une part importante des neurones est morte, démontrant la résilience des circuits neuronaux. L'implication corticale et la résilience variable des structures affectées pourraient expliquer l'hétérogénéité clinique de la MH (Rosas, Salat et al. 2008). Les régions affectées par la dégénérescence ne présentent pas une expression de la HTT supérieure au reste du tissu nerveux. Ainsi, l'atteinte neurale de la MH peut être grossièrement liée à un niveau d'expression plus élevé de la HTT à l'échelle de l'organe, mais il n'en est pas de même à l'échelle du tissu (Strong, Tagle et al. 1993). Au sein du tissu, l'expression de la HTT est inhomogène. Ceci pourrait au moins en partie

expliquer que certains types cellulaires soient plus affectés que d'autres par la maladie (Ferrante, Gutekunst et al. 1997). Par ailleurs, la perte d'expression conditionnelle de la HTT est responsable d'une augmentation de l'apoptose dans le striatum, le cortex, l'hippocampe et les testicules, signalant une importance particulière de la HTT pour la survie de ces tissus (Dragatsis, Levine et al. 2000). Mieux décortiquer les mécanismes de cette spécificité tissulaire est nécessaire si l'on veut espérer traiter la MH. Heureusement, nous verrons ci-après que l'état des connaissances sur les mécanismes pathologiques donne un ensemble d'indications sur les causes de la spécificité tissulaire de la MH. Malgré la grande importance de la neurodégénérescence dans le tableau clinique, l'expression ubiquitaire de la HTT est à mettre en parallèle avec des aspects plus discrets du syndrome. Ainsi, les perturbations périphériques liées à la HTT font l'objet d'un regain d'intérêt ces dernières années, notamment car elles pourraient jouer un rôle non négligeable dans l'évolution de la maladie.

#### b.8 Les atteintes non neurales

Bien que la recherche sur la MH se soit focalisée sur les effets de la HTT mutante (mut-HTT) au sein du cerveau, des travaux pointent régulièrement des perturbations périphériques dans la MH (Podolsky, Leopold et al. 1972 ; Farrer 1985 ; Hurlbert, Zhou et al. 1999 ; Ribchester, Thomson et al. 2004 ; Bjorkqvist, Fex et al. 2005 ; Strand, Aragaki et al. 2005; Bjorkqvist, Petersen et al. 2006 ). Malgré la prédominance des symptômes neurologiques, il est maintenant clair que la MH est également associée à de graves défauts systémiques (Figure 4 ; Figure 5). Ces altérations ne sont pas simplement la conséquence des problèmes neurologiques, mais les accompagnent et reflètent l'expression ubiquitaire de la HTT mutée (mut-HTT). Ainsi, les anomalies périphériques associées à la MH sont : une insuffisance cardiaque, une atrophie musculaire, une atrophie testiculaire, de l'ostéoporose, une perturbation du métabolisme du glucose (Podolsky, Leopold et al. 1972; Podolsky and Leopold 1977), une importante perte pondérale (Sanberg, Fibiger et al. 1981 ; Djousse, Knowlton et al. 2002 ; Hamilton, Wolfson et al. 2004 ; Aziz, Pijl et al. 2009) et des modifications des fibroblastes (Menkes and Stein 1973 ; Leonardi, De Martini et al. 1978 ; Beverstock 1984), des lymphocytes (Pettegrew, Nichols et al. 1981 ; McGovern and Webb 1982) et des érythrocytes (Pettegrew, Nichols et al. 1980 ; Zanella, Izzo et al. 1980) voir Figure 4 et Figure 5. La défaillance cardiaque est la deuxième cause de mortalité liée chez les patients atteints de la MH (Lanska, Lavine et al. 1988 ; Sorensen and Fenger 1992). Les modèles murins R6/2 et HdhQ150 montrent des inclusions intracardiaques dispersées (Moffitt, McPhail et al. 2009). De plus, une perturbation cardiaque est décrite pour les souris R6/2 (Mihm, Amann et al. 2007). Ainsi les modèles murins de la MH présentent une distribution des inclusions nucléaires qui n'est pas restreinte au système nerveux central. Il existe notamment des inclusions intramusculaires chez les souris R6/2 (Sathasivam, Hobbs et al. 1999), Hdh150 (Moffitt, McPhail et al. 2009) et les patients (Saft, Zange et al. 2005). Il est ainsi frappant que le premier symptôme chez un patient de la MH marathonien semi-professionnel ait été une myopathie progressive (Kosinski, Schlangen et al. 2007). Par ailleurs le plasma des patients atteints de la MH se charge en cytokines associées à la perte musculaire (IL6 et TNF $\alpha$ ) dès 16 ans avant l'âge probable de déclaration de la maladie (Bjorkqvist, Wild et al. 2008). Une dégénérescence testiculaire a aussi été mise en évidence par les modèles murins (Leavitt, Guttman et al. 2001 ; Papalex, Persson et al. 2005 ; Van Raamsdonk, Pearson et al. 2005) (Van Raamsdonk, Gibson et al. 2006), puis confirmée à un

stade tardif chez les patients (Van Raamsdonk, Murphy et al. 2007). La dégénérescence testiculaire est caractérisée par une diminution progressive des spermatozoïdes et des spermatozoïdes, allant jusqu'à une perte complète des spermatozoïdes chez certains patients, probablement aspermiques au moment de la mort (Van Raamsdonk, Murphy et al. 2007). Le caractère progressif de cette atteinte explique que les patients présentent une fertilité normale aux stades précoces (Shokeir 1975; Mastromauro, Meissen et al. 1989 ; Pridmore and Adams 1991 ). Les modèles YAC72 Hdh<sup>-/-</sup> et YAC128 Hdh<sup>-/-</sup> ont un phénotype testiculaire aggravé par rapport aux souris YAC72 et YAC128. La HTT mutante permet un développement précoce normal mais ne remplace pas entièrement la HTT normale, notamment au niveau testiculaire (Van Raamsdonk, Pearson et al. 2005). Il y a une tendance à la perte de densité osseuse ostéoporotique chez les patients atteints de la MH et dont la sévérité semble corrélée au nombre de répétitions CAG du gène HTT (van der Burg, Bjorkqvist et al. 2009). Les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans pancréatiques présentent des inclusions dans tous les modèles transgéniques N-terminaux : la souris R6/2 (Sathasivam, Hobbs et al. 1999 ; Andreassen, Dedeoglu et al. 2002 ; Bjorkqvist, Fex et al. 2005 ; Hunt and Morton 2005), la souris R6/1 (qui exprime plus faiblement la même construction que la R6/2) (Josefsen, Nielsen et al. 2008), et la souris N171-82Q, où la taille des îlots de Langerhans est d'autant plus petite que la fréquence des agrégats est grande (Martin, Golden et al. 2009). Les souris R6/2 ont une homéostasie glucidique très perturbée, une perte de cellules  $\beta$  et une forte incidence de diabète (Hurlbert, Zhou et al. 1999), Luesse HG, Schiefer J 2001 ; (Fain, Del Mar et al. 2001 ; Andreassen, Dedeoglu et al. 2002 ; Hunt and Morton 2005) tout comme les souris R6/1 (Josefsen, Nielsen et al. 2008), et N171-82Q (Duan, Guo et al. 2003 ; Martin, Golden et al. 2009) mais aussi les souris Knock-in Hdh Q150 (Strand, Aragaki et al. 2005). L'extension de ces résultats aux patients n'est pas évidente. Une baisse de la sécrétion d'insuline a été décrite chez des patients atteints de la MH et normo-glycémiques (Lalic, Maric et al. 2008), mais non reproduite dans une étude indépendante (Bacos, Bjorkqvist et al. 2008). Cependant, il a été proposé qu'une augmentation de l'activité du système nerveux végétatif sympathique soit à l'origine de celle du métabolisme du glucose chez les patients, via l'activation de la glycolyse (Aziz, Pijl et al. 2009). Il existe par ailleurs des agrégats de HTT dans les adipocytes des souris R6/2, N171-82Q et HdhQ150/Q150 (Weydt, Pineda et al. 2006). Dans les souris R6/2, les taux de leptine sérique sont anormalement élevés (Fain, Del Mar et al. 2001) ce qui est reproduit en modèle Knock in Hdh140 (Phan, Hickey et al. 2009) ce qui suggère qu'un phénomène intracellulaire adipocytaire puisse être impliqué dans la MH. Les malades de la MH sont plus maigres que les personnes non affectées de la même famille (Sanberg, Fibiger et al. 1981 ; Farrer and Yu 1985 ; Morales, Estevez et al. 1989). Cette perte de poids n'est imputable ni à un déficit alimentaire ni à une hausse de la dépense énergétique liés aux symptômes neuraux tels que les mouvements choréiques (Pratley, Salbe et al. 2000 ; Djousse, Knowlton et al. 2002). Par ailleurs, il est intéressant de noter l'association entre un indice de masse corporelle élevé et une progression plus lente de la MH (Myers, Sax et al. 1991). Incidemment, les greffes adipocytaires semblent avoir un potentiel protecteur contre la neurodégénérescence dans un modèle murin (Lee, Chu et al. 2009). Les patients rendent souvent compte d'une augmentation de l'appétit (Farrer and Yu 1985 ; Morales, Estevez et al. 1989). Enfin, l'analyse du régime alimentaire des patients montre qu'ils consomment plus de calories en moyenne que les personnes saines (Sanberg, Fibiger et al. 1981 ; Farrer and Yu 1985 ; Morales, Estevez et al. 1989). L'ensemble de ces données suggère fortement un

syndrome métabolique chez les patients atteints de la MH. Malgré ces faits importants, très peu de choses sont connues à propos de la perte de poids chez les patients atteints de la MH. Enfin, au stade final de la maladie apparaît une baisse de l'apport alimentaire et une association anorexie/cachexie, comme c'est le cas pour les stades avancés des cancers. Néanmoins, le nombre de répétitions présentes dans les modèles pour lesquelles des atteintes périphériques ont été décrites les rapproche des formes juvéniles de la MH, ce qui pose la question de leur pertinence pour la majorité des malades.

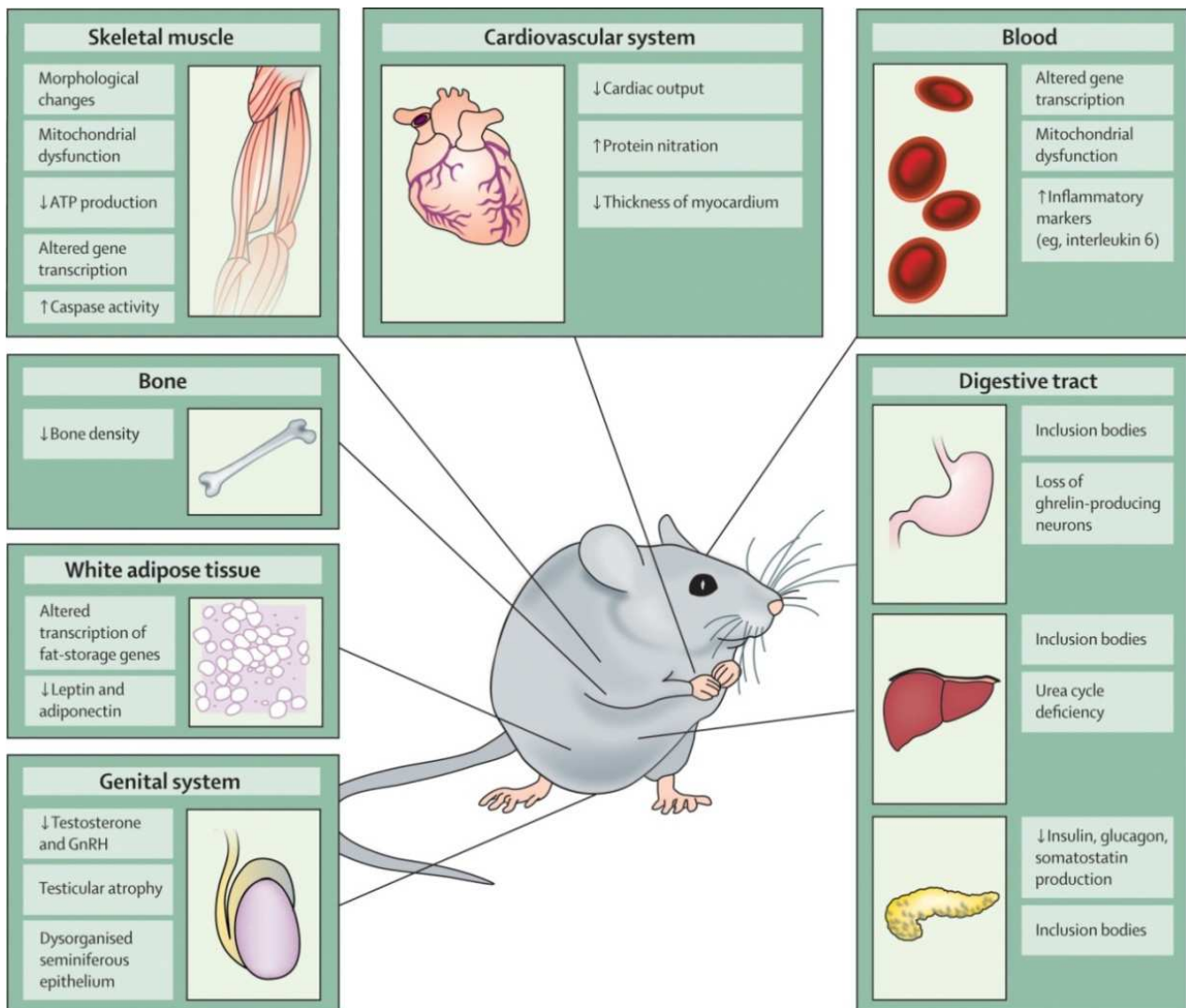


Figure 4 : Atteintes périphériques des modèles murins (van der Burg, Bjorkqvist et al. 2009)

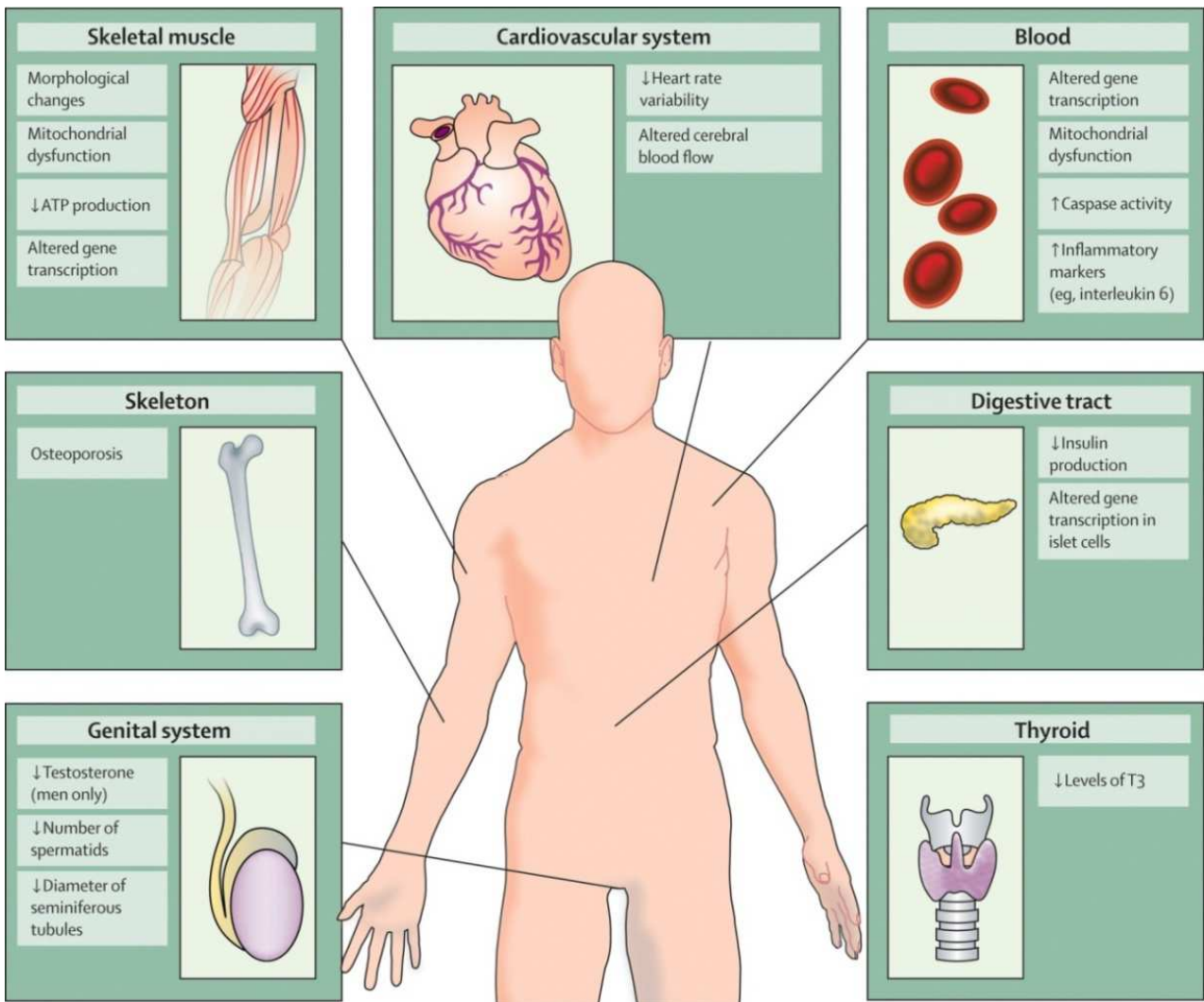


Figure 5 : Atteintes périphériques des patients de la MH (van der Burg, Bjorkqvist et al. 2009)

### b.9 Les formes juvéniles

Six à dix pourcents des cas de MH se révèlent avant l'âge de 20 ans (Nance and Myers 2001). Ces formes dites « juvéniles » peuvent présenter un tableau clinique très différent de celui de la MH, mais la classification dépend de l'âge de déclaration et non des symptômes. Dans ces cas, le symptôme moteur principal n'est pas la chorée (Walker 2007) mais plutôt une rigidité musculaire, un manque de souplesse, pour un tiers des cas des épisodes épileptiques avec perte de conscience et parfois un myoclonus (contraction répétée d'une unité musculaire). Sur le plan anatomique, la principale différence est une gliose réactionnelle précoce au sein du globus pallidus, corrélée avec la rigidité musculaire. Il peut aussi y avoir une perte des neurones de Purkinje et des grains du cervelet (apprentissage et contrôle moteur), ainsi que le noyau denté (contrôle des mouvements rapides), l'hippocampe (gestion de l'interface entre mémoire à court et à long terme) et le néocortex. Malgré ces différences, les formes juvéniles ont été reconnues très tôt comme une forme altérée de la MH car elles n'apparaissent jamais spontanément et toujours au sein de familles affectées par la MH. Il s'agit la plupart du temps d'une transmission paternelle de la maladie. Plus la déclaration est précoce plus l'évolution de la maladie est rapide (Beighton and Hayden 1981 ; Conneally 1984). De façon cohérente, les formes juvéniles évoluent plus rapidement que les formes adultes. L'évolution vers la démence et les difficultés de déglutition sont des symptômes partagés entre les formes juvéniles et classiques. La variation du tableau clinique est importante comme pour les formes adultes de la maladie, et la mort survient en une dizaine d'années.

## **c) A la recherche du gène**

### c.1 Une maladie familiale

Le mode de transmission de la MH est autosomal dominant, un individu affecté a donc une chance sur deux de transmettre la maladie à chacun de ses enfants, indépendamment de leur sexe. La pénétrance de la maladie est très importante, il n'existe donc pas de porteurs sains et l'âge de déclaration a tendance à diminuer au fur et à mesure des générations d'une même famille. Ce phénomène est connu sous le nom d'anticipation (voir Figure 7). La transmission paternelle de l'allèle mutant comporte un biais vers une déclaration plus précoce chez l'enfant, ce qui n'est pas le cas de la transmission maternelle (Ridley, Frith et al. 1988). Les cas de patients pour lesquels la MH est un événement nouveau dans l'histoire familiale sont rares (Semaka, Creighton et al. 2006). De même, les fratries issues de deux parents affectés sont rares, et composées pour moitié d'individus hétérozygotes et d'un quart d'individus homozygote qui présentent une évolution plus rapide de la maladie (Squitieri, Gellera et al. 2003). Les patients homozygotes transmettent de façon certaine la maladie à leurs enfants. Les jumeaux « vrais » homozygotes partagent le même capital génétique, mais ont souvent un âge de déclaration des symptômes différent (Squitieri, Gellera et al. 2003), ce qui souligne la variabilité intrinsèque de l'évolution pathologique et l'influence de facteurs environnementaux. La découverte du déterminant génique de la maladie et une meilleure compréhension de sa variabilité, notamment de l'âge de déclaration, ont été permises par la découverte d'une communauté très particulière au Venezuela.

### c.2 Le lac Maracaibo (adapté de Psychopharmacology - 4th Generation of Progress, Cha and Young, 2000)

Les patients atteints par la MH décrits par Huntington avaient probablement eu des ancêtres en Angleterre, mais c'est au Venezuela que l'on rencontre la plus grande communauté de malades. En 1955, un jeune médecin nommé Amerigo Negrette se voit assigner le poste de médecin local à San Luis, un petit village de pêcheurs à l'extérieur de Maracaibo, au Nord-ouest du Venezuela. Negrette, choqué de constater que de nombreux villageois titubaient comme s'ils étaient ivres, même tôt dans la journée, a vite appris que ces villageois ne l'étaient pas, mais souffraient d'une affection familiale connue localement comme « El Mal de San Vito ». Negrette a été assez clairvoyant pour conclure que « El Mal de San Vito » était en fait la MH. Il a alors réalisé que le village permettrait de mieux comprendre la maladie, et entama l'étude attentive des habitants de San Luis (Negrette A. San Francisco (informe Rural) Maracaibo, 1958). En 1972, un colloque pour commémorer les cent ans de l'article publié par Georges Huntington eu lieu à Columbus, Ohio. Les médecins et les scientifiques du monde entier se réunirent pour discuter de ce qu'ils considéraient comme une maladie particulièrement rare. Ramon Avila-Giron, un collègue de Negrette, étonna le public en montrant le film d'un village du Venezuela occupé par des patients atteints de la MH. Jamais un tel nombre de patients de la MH n'avait été décrit. Dans le public, Nancy Wexler dont la propre mère est morte de la MH, assiste à la projection. Wexler, titulaire d'un doctorat en psychologie, était alors en poste au National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke. Dès 1979, elle dirigea la première expédition à Maracaibo dans l'Etat de Zulia, au Venezuela. Wexler, avec Thomas Chase du National Institutes of Health (NIH), a alors arpenté la région et interviewé de nombreux membres de la famille étudiée par Negrette. Une collaboration entre le NIH et l'Université de Zulia a éclo, et chaque printemps depuis 1981, une équipe de scientifiques et de médecins étudie la plus grande population connue de patients atteints de la MH (Young, Shoulson et al. 1986 ; Penney, Young et al. 1990). C'est grâce à des échantillons d'ADN prélevés chez des patients vénézuéliens que le premier marqueur de position pour le gène *HTT* a été trouvé (Gusella, Wexler et al. 1983), conduisant finalement à la découverte du gène lui-même (Huntington's Disease Collaborative Research Group, (1993)). Les expéditions annuelles continuent dans la région de Maracaibo, collectant des données et des échantillons précieux pour l'étude de la MH.

### c.3 Le groupe de recherche collaborative sur la maladie de Huntington

L'étude commencée en 1979 à l'initiative de Nancy Wexler a mis en place une collection très riche d'échantillons de sang et de peau obtenus dans deux villages touchés par la maladie: Barranquitas et Lagunetas,. En 1983, le « Huntington's Disease Collaborative Research Group» (HDCRG), alors composé de 14 chercheurs, a découvert un locus de 10cM associé à la maladie sur le chromosome 4 (4p16.3) (Gusella, Wexler et al. 1983). Cette identification est d'autant plus marquante qu'il s'agit du premier gène responsable d'une maladie autosomale à avoir été localisé avec précision dans le génome humain. Les techniques utilisées (polymorphisme de longueur des fragments de restriction ou RFLP et analyses de liaison) ont ouvert la voie à l'identification des gènes associés aux maladies humaines en général, et au-delà au séquençage du génome humain.



Dix ans plus tard, en 1993 le HDCRG, regroupant alors plus de 50 chercheurs et médecins, a découvert le gène *IT15* (littéralement *transcrit intéressant numéro 15*) de la maladie de Huntington (The Huntington's Disease Collaborative Research Group, (1993)), depuis renommé *HTT* par cohérence avec la protéine HTT. Cet événement a éclairé d'un jour nouveau la nature de la maladie. Les échantillons issus de ce travail de longue haleine sont maintenant accessibles à la communauté scientifique à partir des banques de cellules internationales et représentent une ressource inestimable pour la compréhension de la maladie, mais aussi pour les études génétiques en général. Cette étude a contribué à la découverte de gènes associés à Alzheimer, au nanisme et à certaines formes de cancer.

La contribution de l'étude des populations du Lac Maracaibo a donc été centrale pour la compréhension de la maladie.

## 2) Avancées scientifiques

### a) *IT15/HTT*

#### a.1 Une expression ubiquitaire

La HTT est une protéine exprimée de façon ubiquitaire avec des niveaux d'expression supérieurs dans les neurones du système nerveux central (DiFiglia, Sapp et al. 1995 ; Trottier, Devys et al. 1995 ; Ferrante, Gutekunst et al. 1997 ; Velier, Kim et al. 1998 ; Fusco, Chen et al. 1999). Elle est fortement exprimée au sein des neurones pyramidaux des couches corticales III et V qui projettent sur les neurones striataux (Fusco, Chen et al. 1999). Chez l'Homme comme chez la souris, deux isoformes de l'ARN messager de la HTT sont produites et diffèrent de trois kilobases dans la partie 3' non traduite (Lin, Rommens et al. 1993 ; Lin, Nasir et al. 1994). L'isoforme au long 3'UTR est exprimée dans le système nerveux central et la forme courte est réellement ubiquitaire (Lin, Rommens et al. 1993). Au sein de la cellule, la HTT est associée avec beaucoup d'organites, notamment le noyau, mais aussi le réticulum endoplasmique, le Golgi et la mitochondrie (Hilditch-Maguire, Trettel et al. 2000 ; Hoffner, Kahlem et al. 2002 ; Kegel, Meloni et al. 2002 ; Panov, Gutekunst et al. 2002 ; Strehlow, Li et al. 2007). La HTT est aussi localisée au sein des neurites et des synapses où elle est associée avec différentes structures vésiculaires comme les vésicules à Clathrine, les cavéoles, les endosomes et les microtubules (DiFiglia, Sapp et al. 1995 ; Velier, Kim et al. 1998 ; Hilditch-Maguire, Trettel et al. 2000 ; Hoffner, Kahlem et al. 2002). Cette répartition on ne peut plus large ne facilite pas la définition de sa fonction. L'étude d'expression de la HTT au sein de deutérostomes dits « basaux », comme l'oursin (échinoderme) ou l'ananas de mer (urochordé), suggère que l'expression de la HTT au sein du tissu neural puisse être une nouveauté évolutive des chordés (Kauffman, Zinovyeva et al. 2003). La HTT mutante comme la HTT normale sont donc des protéines présentes dans l'ensemble de l'organisme.

## a.2 La mutation

La mutation causale de la MH est une augmentation de taille de la séquence CAG dans le gène codant la HTT (MacDonald, Barnes et al. 1993), (The Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993 (1993)). Il a été démontré que la taille de cette répétition était inversement corrélée avec l'âge de déclaration des symptômes moteurs (Andrew, Goldberg et al. 1993 ; Langbehn, Brinkman et al. 2004), voir Figure 6 pour une estimation de la corrélation fondée sur 2913 patients. Le polymorphisme des mutations causant la MH a permis d'expliquer de façon élégante la variation de l'âge de déclaration de la maladie entre les patients, et surtout en ce qui concerne les cas juvéniles pour lesquels le nombre de répétitions CAG est souvent supérieur à 55 et fréquemment situé au-delà de 70. Par ailleurs les personnes porteuses de répétitions entre 27 et 35 ne développent pas la maladie (Ashizawa, Wong et al. 1994 ; Semaka, Collins et al. 2010) mais il existe un risque pour leurs enfants d'hériter d'un allèle avec plus de 36 CAG à pénétrance réduite ou complète (Tableau 1). L'anticipation est un phénomène plus fréquent dans le cas d'une transmission paternelle de l'allèle muté, et le biais vers une augmentation du nombre de CAG semble lié à la spermatogénèse (Pearson 2003). Malgré l'attrait de la simplicité de cette corrélation, elle n'est responsable que de 50% de la variance de l'âge de déclaration des symptômes moteurs, le reste étant influencé par des facteurs génétiques et environnementaux (Andrew, Goldberg et al. 1993 ; Brinkman, Mezei et al. 1997 ; Wexler, Lorimer et al. 2004).

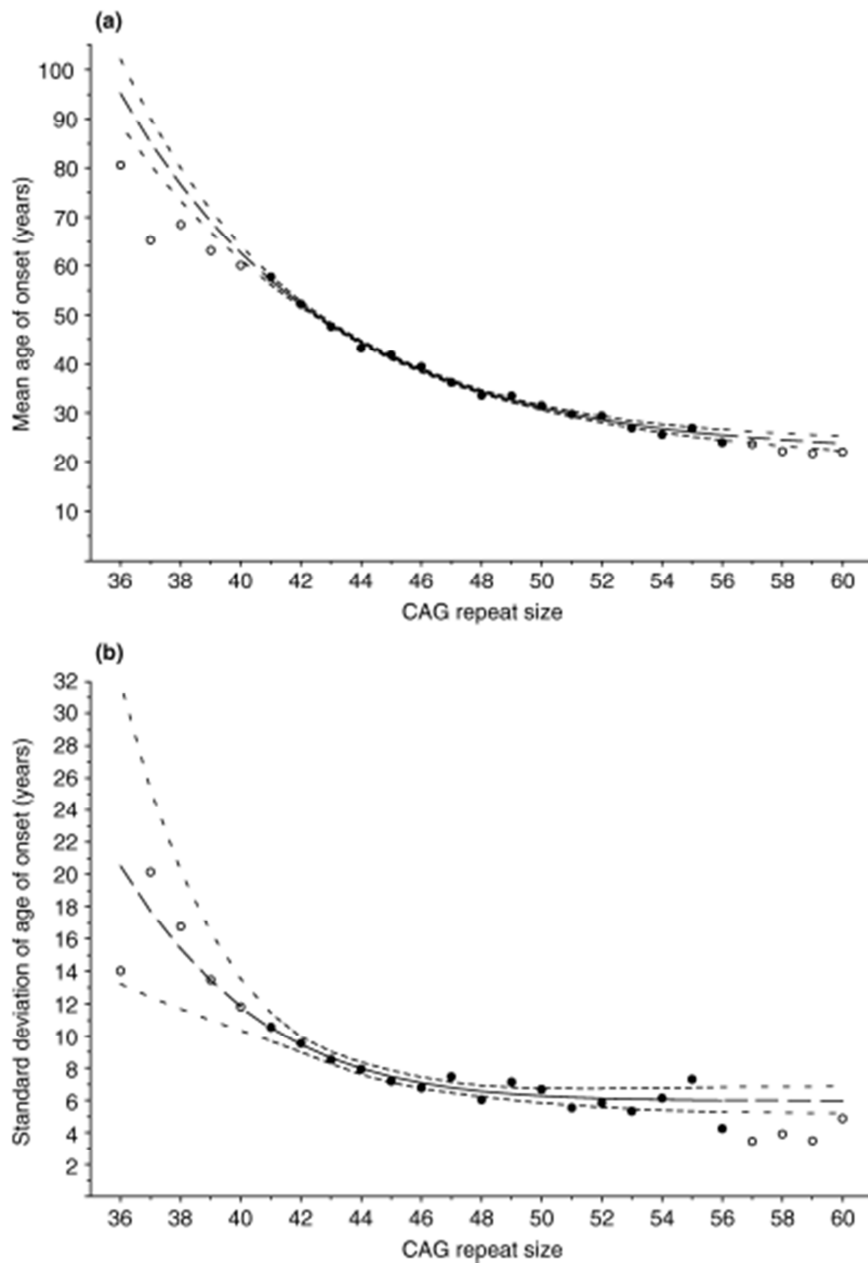


Figure 6 : Corrélation inverse entre nombre de répétitions et âge de déclaration des symptômes  
 (a) : âge moyen de déclaration des symptômes ; (b) : écart type associé (Langbehn, Brinkman et al. 2004)

Répétitions CAG	Classification	statut
<28	Normal	sain
28–35	Intermédiaire	sain
36–40	Pénétrance réduite	faiblement affecté
>40	Pénétrance complète	Affecté

Tableau 1 : Pénétrance de la MH en fonction du nombre de répétitions CAG du gène *HTT* modifié de (van Duijn, Kingma et al. 2007)

### a.3 L'amplification des CAG

La mutation de la MH est instable dans les lignées germinale et somatique. Cette expansion des répétitions CAG a des conséquences délétères. Ainsi, la transmission de la mutation entre générations est caractérisée par un biais vers l'expansion dans le cadre de la transmission paternelle, ce qui cause le phénomène d'anticipation voir Figure 7 (Ridley, Frith et al. 1988 ; Duyao, Ambrose et al. 1993 ; Telenius, Kremer et al. 1994 ; Wheeler, Persichetti et al. 2007). Ce phénomène est donc responsable de la tendance vers une plus grande sévérité de la maladie au fil des générations. De plus, il existe une augmentation somatique inhomogène du nombre de répétitions, notamment dans le cerveau, dont les régions sont différenciellement affectées chez les modèles comme chez les patients (Telenius, Kremer et al. 1994); (Kennedy, Evans et al. 2003). Ainsi, l'instabilité somatique est beaucoup plus grande au sein du striatum qu'au sein du cervelet. Ce profil est cohérent avec celui de la neurodégénérescence de la MH et au sein du striatum les interneurons épargnés sont précisément ceux pour lesquels il n'y a pas d'amplification des CAG (Shelbourne, Keller-McGandy et al. 2007 ; Gonitell, Moffitt et al. 2008). Il a donc été logiquement proposé que l'expansion somatique des CAG conduise à l'expression de protéines de plus en plus toxiques, accélérant ainsi l'évolution de la MH (Kennedy, Evans et al. 2003 ; Shelbourne, Keller-McGandy et al. 2007 ; Swami, Hendricks et al. 2009). Ce phénomène est d'autant plus intéressant que cette augmentation somatique du nombre de répétitions CAG précède l'apparition des symptômes (Kennedy, Evans et al. 2003 ; Lee, Zhang et al. 2010). Un certain nombre d'arguments pointe vers une implication précoce des phénomènes d'amplification des CAG dans la MH. Ainsi, les modèles murins déficients pour les protéines de réparation des mésappariements Msh2 ou Msh3 ne présentent plus d'expansion somatique et l'apparition du phénotype est retardée (Wheeler, Lebel et al. 2003 ; Dragileva, Hendricks et al. 2009), ce phénomène est aussi retrouvé avec la perte d'expression d'OGG1 impliquant les mécanismes de réparation des bases excisées et le stress oxydatif (Kovtun, Liu et al. 2007). Cependant le niveau d'expression des gènes de réparation et de la HTT n'est pas différent entre cellules touchées ou épargnées par l'augmentation CAG (Lee, Zhang et al. 2010). Ceci suggère que le contexte cellulaire pourrait jouer un rôle dans l'instabilité des CAG, potentiellement via le stress excito-toxique. Ainsi, la compréhension des mécanismes à l'origine de l'amplification des CAG est incomplète. Cependant, la possibilité d'une inhibition pharmacologique de ce phénomène représente une piste thérapeutique prometteuse pour la maladie (Dragileva, Hendricks et al. 2009).

Considérant l'implication du motif poly-Q dans les interactions protéiques (Harjes and Wanker 2003) et avec l'ADN (Benn, Sun et al. 2008), Il est probable que les mécanismes pathologiques sont inhomogènes dans les tissus lésés, en particulier vis-à-vis de la transcription, et ce, quel que soit le grade clinique du patient considéré. Le motif de répétition CAG est potentiellement instable dans l'organisme et entre générations, nous allons voir qu'il l'a été à l'échelle de l'évolution mais dans un contexte protéique d'une stabilité exceptionnelle.

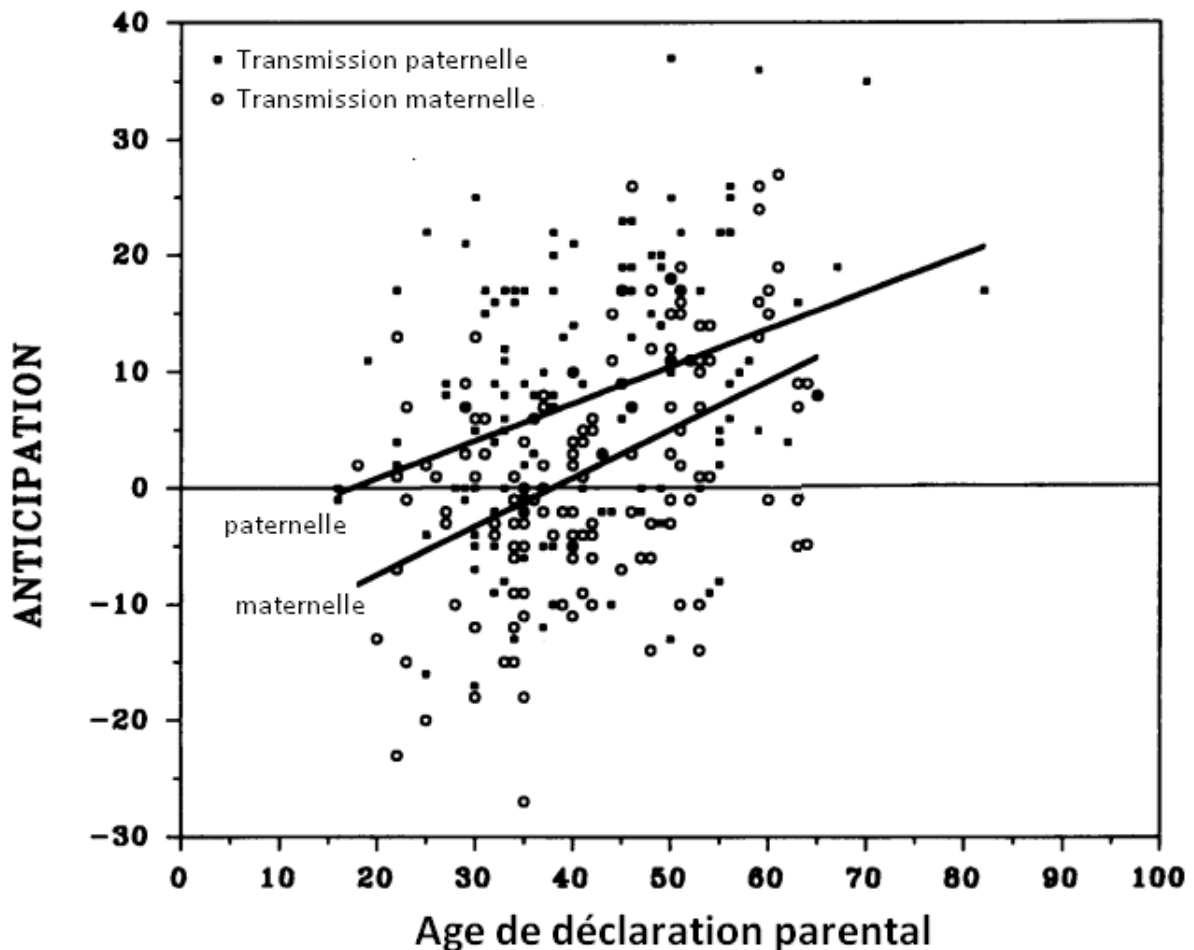


Figure 7 : La transmission paternelle est responsable du biais d'anticipation de la MH (modifié de Ranen NG, Stine OC 1995)

#### a.4 Une conservation évolutive exceptionnelle

La plupart des homologues connus de la HTT humaine appartiennent aux vertébrés et montrent un degré élevé d'homologie. Cette forte homologie limite la compréhension de la fonction des différents domaines de la protéine. Tous les vertébrés séquencés partagent une structuration en 67 exons et couvre une région d'environ 170 kilobases. Le vertébré le plus divergent, par rapport à *Homo sapiens* est le poisson *Fugu Rubripes* avec 80% de conservation de séquence. Fait intéressant, en raison de la présence de courts introns, le gène contient bien 67 exons, mais s'étend sur une région de 22 kilobases seulement (Sathasivam, Baxendale et al. 1997). Le seul protostome, pour lequel une séquence d'un gène homologue de la HTT est connue sans équivoque, est *Drosophila melanogaster*. Il se caractérise par cinq régions de 20 à 50% de conservation de séquence distribuées sur toute la longueur de la protéine (Li, Karlovich et al. 1999 ; Zhang, Feany et al. 2009). La HTT de drosophile renseigne sur la HTT ancestrale, qui est donc antérieure à la séparation entre protostomes et deutérostomes (de -600 à -550 millions d'années) (Cattaneo, Zuccato et al. 2005). En accord avec cette hypothèse, la HTT est présente chez le tunicier *Halocynthia roretzi* (ananas de mer), et chez l'échinoderme *Heliocidaris herithrogramma* (oursin) deux deutérostomes dits basaux (Kauffman, Zinovyeva et al. 2003). Plus récemment, les travaux du groupe de Miguel Andrade et ses collègues du Centre Max-Delbrück de médecine moléculaire à Berlin (Palidwor, Shcherbinin et al. 2009) ont prédit,

par analyse de séquence, la présence de la protéine chez l'amibe *Dyctostelium discoideum*, mais pas chez *Saccharomyces cerevisiae* ou chez les plantes, indiquant une possible ancienneté phylogénétique de la HTT supérieure à 600 millions d'années. L'équipe d'Elena Cattaneo a cherché à identifier les domaines clés de la HTT par cette approche évolutive à l'aide des séquences des HTT d'échinoderme (*Strongylocentrotus purpuratus*, oursin), de céphalocordé (*floridae Branchiostoma*, amphioxus) et de tunicier (*Ciona intestinalis*, ascidie) (Gissi, Pesole et al. 2006 ; Candiani, Pestarino et al. 2007 ; Tartari, Gissi et al. 2008). L'ascidie et l'amphioxus représentent deux niveaux croissants de céphalisation. L'oursin, présente un système nerveux simple formé d'un anneau nerveux péribuccal et de nerfs radiaux. De façon surprenante, la HTT de l'oursin est plus semblable à celle de l'Homme que de celle de l'ascidie (Gissi, Pesole et al. 2006 ; Tartari, Gissi et al. 2008). En outre, la HTT d'amphioxus est très similaire à celle de l'Homme, reflétant peut être la céphalisation du système nerveux, donc plus proche de celui des vertébrés (Candiani, Pestarino et al. 2007). Ces études ont permis d'identifier trois domaines putatifs correspondant aux nucléotides 1-386 (htt1), 683-1,586 (htt2), et 2,437-3,078 (htt3) de la HTT humaine. Le fragment NH-terminal (htt1) est la partie qui évolue le plus jusqu'à la séquence humaine, tandis que le fragment COOH-terminal représente la partie la plus conservée chez tous les animaux. L'évolution de la partie NH-terminale peut être mise en parallèle avec celle des structures cérébrales des deutérostomiens (Tartari, Gissi et al. 2008). En revanche, la partie COOH-terminale est peut être dotée d'activités primordiales dans les tissus non neuronaux (Tartari, Gissi et al. 2008). Ceci sous-entend que la HTT réalise plusieurs fonctions distinctes.

## **b) Une protéine omniprésente mais insaisissable**

### b.1 Un gène, beaucoup de fonctions

La HTT a été identifiée il y a presque 20 ans, mais on est loin d'avoir fait le tour de ses fonctions, normales ou pathologiques. On ne peut donc pas assigner une unique fonction à la HTT. Elle est présente dans toute la cellule : cytoplasme, noyau et est associée aux membranes du Réticulum endoplasmique, du Golgi et des mitochondries (Hoogeveen, Willemsen et al. 1993 ; Kegel, Meloni et al. 2002 ; Atwal, Xia et al. 2007 ; Rockabrand, Slepko et al. 2007 ). Elle est ubiquitaire (c'est-à-dire exprimée dans l'ensemble du corps) et participe probablement à une large variété de processus. Les études fondées sur une surexpression et de perte d'expression de la HTT ont permis de révéler des fonctions normales de la HTT. La perte d'expression de la HTT stoppe précocement (au jour 8) le développement embryonnaire chez la souris (Duyao, Auerbach et al. 1995 ; Nasir, Floresco et al. 1995 ; Zeitlin, Liu et al. 1995). Une baisse en dessous de 50% du niveau normal d'expression de la HTT permet d'obtenir un développement précoce normal mais conduit à développement anormal du cerveau chez la souris (White, Auerbach et al. 1997 ; Auerbach, Hurlbert et al. 2001), et conduit secondairement à une neurodégénérescence dans le noyau subthalamique chez les souris *Hdh + / -* (Nasir, Floresco et al. 1995). Par ailleurs une fois le développement terminé, elle est nécessaire à la survie des MSNs, mais aussi des neurones corticaux. Elle protège ainsi de la mort neuronale par apoptose déclenchée par des stimuli toxiques *in vitro*. Cet effet a lieu en amont de la Caspase 3, est

contrôlé par l'interaction avec HIP1 (Hackam, Yassa et al. 2000), et l'inhibition de l'activation de la pro-Caspase 9 (Rigamonti, Sipione et al. 2001). Le même rôle anti-apoptotique a été démontré *in vivo* chez la souris où elle protège de la neurodégénérescence après une ischémie (Zhang, Li et al. 2003). La HTT sauvage compense la dégénérescence testiculaire détectée chez des souris YAC72 HTT-/- (Leavitt, Guttman et al. 2001) et protège de manière dose-dépendante contre l'excitotoxicité chez la souris (Leavitt, van Raamsdonk et al. 2006). Par ailleurs, la HTT favorise le transport vésiculaire rapide des vésicules le long des axones, aussi bien de façon rétrograde qu'antérograde (Block-Galarza, Chase et al. 1997) voir Figure 15. Elle semble jouer aussi un rôle dans le contrôle du trafic nucléo-cytoplasmique des facteurs de transcription et des protéines liées au spliceosome (Faber, Barnes et al. 1998 ; Xia, Lee et al. 2003). Il existe aussi des arguments développementaux chez le zebrafish (Lumsden, Henshall et al. 2007) et au sein de cellules souches murines (Hilditch-Maguire, Trettel et al. 2000) qui montrent un rôle dans le transport du fer. Enfin, un rôle dans l'orientation du fuseau mitotique a été proposé récemment (Godin, Poizat et al. 2010). Les différentes fonctions de la HTT pourraient s'exercer via l'interaction avec différents complexes protéiques via ses motifs HEAT. Ces motifs contrôlent les interactions entre protéines impliquées dans l'expression des gènes, l'endocytose, le trafic vésiculaire les voies de signalisation et le métabolisme (Harjes and Wanker 2003 ; Li and Li 2004), répartis le long de sa séquence (Andrade and Bork 1995). Cette polyvalence fonctionnelle trouve ainsi un écho dans la variété de ses interactions avec les autres protéines.

## b.2 Des interactions sans compter

L'identification et la compréhension des interactions de la HTT avec les autres protéines sont une étape importante pour mieux cerner ses fonctions physiologiques et pathologiques. La HTT interagit ainsi avec de nombreux partenaires jouant un rôle dans les fonctions cellulaires liées aux déficits caractérisés de la MH : voir Figure 8. L'étude de la structure protéique de la HTT a révélé l'existence de 36 motifs d'interaction protéiques HEAT (Andrade and Bork 1995) (voir Figure 9). La présence de ces domaines et leur agencement le long de la séquence de la HTT sont en accord avec un rôle d'échafaudage protéique (Palidwor, Shcherbinin et al. 2009 ; Grinthal, Adamovic et al. 2010). De façon cohérente, l'utilisation de diverses techniques permettant d'identifier les protéines interagissant avec la HTT (double hybride, pull down, immunoprécipitation) a permis de révéler près de 70 interactions directes de la HTT avec d'autres protéines. Un nombre important de ces interactions cible la partie N-terminale de la HTT, et la longueur du motif poly-Q est dans certain cas un élément modulateur de ces interactions (Harjes and Wanker 2003 ; Goehler, Lalowski et al. 2004 ; Li and Li 2004 ; Kaltenbach, Romero et al. 2007). Parmi ces interactants, on retrouve des protéines associées à diverses fonctions. L'endocytose, l'apoptose, le transport vésiculaire, les voies de transduction, et la régulation transcriptionnelle sont bien représentées (Harjes and Wanker 2003 ; Li and Li 2004). Il est intéressant de citer la Huntingtin Associated Protein 1 (HAP1) qui interagit avec la HTT et P150glued, une sous unité du complexe Dynactine, ce qui lie la HTT au transport intracellulaire, notamment du BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor) (Gauthier, Charrin et al. 2004). De même la Huntingtin Interacting Protein 1 (HIP1) lie l' $\alpha$ -Adaptine et la Clathrine qui jouent un rôle dans l'endocytose et le recyclage des vésicules pré-synaptiques (Gonzalez-Gaitan and Jackle 1997). La HTT est donc indirectement liée à l'homéostasie membranaire de la synapse. De plus, elle lie PACSIN-1 et Post-

Synaptic Density 95 (PSD95), ce qui traduit un rôle dans la régulation de l'activité synaptique (Smith, Brundin et al. 2005). Dans le cas précis de PSD95, l'interaction avec la HTT régule le positionnement des récepteurs NMDA et KA à la membrane post-synaptique, ce qui éclaire le mécanisme de sensibilité accrue au stress excitotoxique dans la MH (Sun, Savanenin et al. 2001). Beaucoup de facteurs de transcriptions se lient à la HTT (Cha 2007), notamment le Repressor Element-1 Transcription Factor/Neuron-Restrictive Silencer Factor (REST/NRSF) via la REST-Interacting LIM Domain Protein (RILP) et HAP1. Cette interaction capture REST dans le cytoplasme et l'empêche d'exercer un contrôle négatif en se liant au motif RE1, notamment pour le BDNF (Shimojo 2008 ; Zuccato and Cattaneo 2009). L'interaction de la HTT avec HAP1 et Mixed-Lineage Kinase 2 (MLK2) favorise l'expression de NeuroD un facteur de transcription impliqué dans la morphogénèse du gyrus denté et des îlots de Langerhans, structures affectées dans la MH (voir : b.8 Les atteintes non neurales) (Marcora, Gowan et al. 2003). La HTT exerce une partie de son activité anti-apoptotique en interagissant avec HIP1, l'empêchant ainsi de former un complexe avec HIP1-Protein Interactor (HIPPI), qui active la Caspase-8 (Gervais, Singaraja et al. 2002). De façon opposée, Rhes lie la HTT mutante, favorisant sa sumoylation, ce qui inhibe la formation de macro-agrégats et augmente sa cytotoxicité dans les cellules STHdh111Q (Subramaniam, Sixt et al. 2009). Rhes est une protéine G récemment découverte qui est exprimée dans les tissus affectés par la MH, et notamment le striatum (Subramaniam, Sixt et al. 2009). Il faut garder à l'esprit que la séquence de la protéine HTT est très largement conservée, en particulier chez les vertébrés (Cattaneo, Zuccato et al. 2005). Cette conservation concerne aussi bien la partie NH-terminale que la partie COOH-terminale. En 1994 l'équipe du prix Nobel Max Perutz a montré que le motif poly-Q pouvait former une structure « polar zipper » importante dans les interactions protéine/protéine (Perutz, Johnson et al. 1994). Il a depuis été démontré que le motif poly-Q est un régulateur clé des interactions entre la HTT et divers partenaires (Harjes and Wanker 2003). Ainsi, les deux éléments structurels les plus caractéristiques de la HTT : le motif poly-Q et les motifs HEAT sont tous deux impliqués dans des interactions protéiques variées. Les fonctions de la HTT sont donc difficiles à décortiquer. Le grand nombre d'interactions protéiques réparti sur toute la séquence de la HTT souligne aussi l'importance de considérer la protéine entière pour les études fonctionnelles. Notamment, les interactions contrôlées par la partie C-terminale peuvent avoir une importance vis-à-vis des mécanismes étudiés.



Tableau 2 : Interactions protéiques principales de la HTT (modifié de Li S-H et Li X-J 2004)

Nom	Fonction	motif lié dans la HTT	Influence du motif PolyQ	méthode
<b>Transcription</b>				
CA150	Activateur transcriptionnel	Inconnu	Aucune	Double hybride (levure)
CBP	Activateur transcriptionnel	1-588	Augmente	GST-pull down
CtBP	Répresseur transcriptionnel	Inconnu	Diminue	Double hybride (levure)
HYP-A, B	Facteur d'épissage de l'ARN	Polyproline	Augmente	Double hybride (levure)
HYP-C	Facteur de transcription	Polyproline	Augmente	Double hybride (levure)
NCOR	Répresseur transcriptionnel	1-171	Augmente	Double hybride (levure)
NF-κB	Facteur de transcription	Motifs HEAT	Inconnue	Co-Immunoprécipitation
SP1	Activateur transcriptionnel	1-171	Augmente	GST-pull down, double hybride (levure)
TAFII130	Activateur transcriptionnel	1-480	Aucune	Double hybride (levure)
TBP	Facteur général de transcription	Inconnu	Inconnue	Filter assay
P53	Facteur de transcription	Polyproline	Aucune	Isolation à partir d'inclusions de HTT
REST-NRSE	Répresseur transcriptionnel	1-548	Diminue	Co-Immunoprécipitation
<b>Transport intracellulaire et endocytose</b>				
HAP1	Transport intracellulaire, endocytose	1-230	Augmente	Double hybride (levure)
HIP1	Endocytose, pro-apoptotique	1-540	Diminue	Double hybride (levure)
HIP14	Transport intracellulaire, endocytose	1-550	Diminue	Double hybride (levure)
PACSIN1	Endocytose	Polyproline	Augmente	Double hybride (levure)
PSD-95	Assemblage des complexes synaptiques	SH3	Diminue	Co-Immunoprécipitation

Nom	Fonction	motif lié dans la HTT	Influence du motif PolyQ	méthode
<b>Voies de Signalisation</b>				
PSD95	Assemblage des complexes synaptiques	SH3	Diminue	Co-Immunoprécipitation
Calmoduline	Protéine régulatrice sensible au Ca <sup>2+</sup>	Inconnu	Augmente	Chromatographie d'affinité
CIP-4	Régulation du cycle cellulaire	1-152	Augmente	Double hybride (levure)
FIP2 (ou HYP-L)	GTPase, interagissant avec Rab8	1-550	Inconnue	Double hybride (levure)
GRb2	Signalisation	Polyproline	Inconnue	Co-Immunoprécipitation
IP31	Canal calcique	1-158	Augmente	Co-Immunoprécipitation
SH3GL3	Endocytose, recyclage des vésicules	Polyproline	Augmente	Double hybride (levure)
RasGAP	Activation des Ras GTPases	Polyproline	Inconnue	Co-Immunoprécipitation
<b>Métabolisme</b>				
Cystathionine β-synthase	synthèse de la cystéine	1-171	Aucune	Double hybride (levure)
GAPDH	enzyme de la glycolyse	Polyproline	Augmente	Chromatographie d'affinité
HIP2	enzyme conjuguée à l'Ubiquitine	1-540	Aucune	Double hybride (levure)

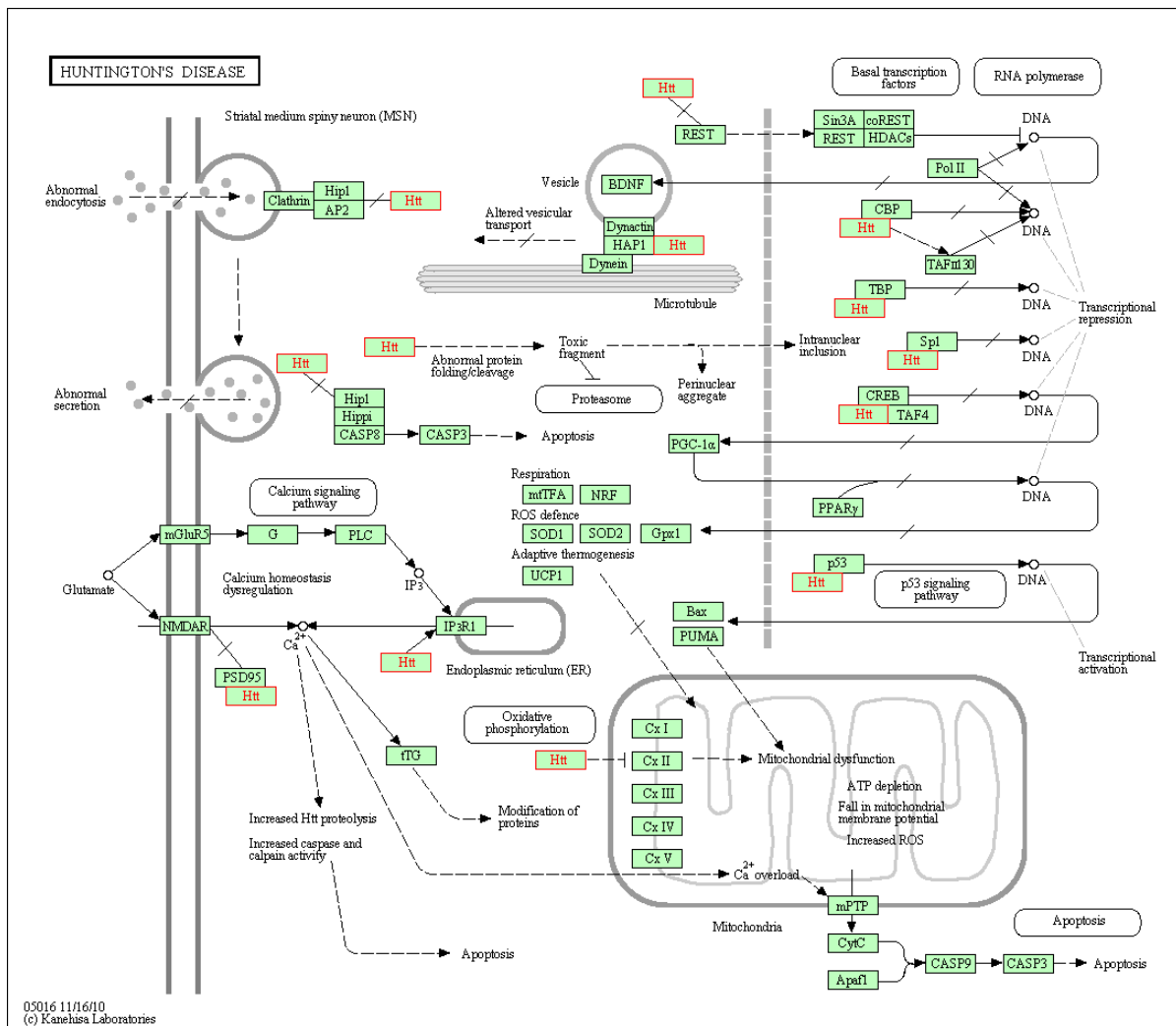


Figure 8 : Interactions moléculaires de la HTT et fonctions cellulaires (KEGG pathway)

### b.3 Une structure et une régulation complexes

La HTT est une très grosse protéine de 3144 acides aminés (348 KDa, pour 23 résidus glutamine). Sa taille rend pour l'instant impossible toute purification et a fortiori toute cristallisation ou analyse par spectrométrie de masse pour élucider sa structure. En conséquence plus de 17 ans après le clonage du gène *HTT*, il n'y a toujours pas d'information structurale fiable sur la protéine. Les informations de séquences ont néanmoins permis d'identifier certains motifs, sites de liaison et de modification post-traductionnelles (voir Figure 9). Les 17 premiers acides aminés de la HTT sont capables de lier les membranes et suffisent à la co-localiser avec la mitochondrie, le réticulum Endoplasmique et le Golgi (Atwal, Xia et al. 2007; Rockabrand, Slepko et al. 2007). Le motif poly-glutamine (poly-Q) du côté N-terminal de la HTT est évidemment important car c'est son élévation qui est à l'origine des mécanismes de la MH. Il commence au 18<sup>ème</sup> acide aminé de la HTT et contient jusqu'à 35 résidus glutamines pour un individu non affecté (HD Collaborative Research Group (1993)). L'apparition de ce motif est très ancienne (-525 millions d'années) (Tartari, Gissi et al. 2008) et pourrait intervenir dans l'interaction avec d'autres protéines à motif poly-Q (Harjes and Wanker 2003). Le motif poly-Q semble capable de prendre une grande variété de conformations (hélice, bobine, boucle) qui pourraient jouer un rôle régulateur (Kim, Chelliah et al. 2009). Le motif poly-Q est directement suivi par un motif poly-

proline qui semble jouer un rôle dans le maintien de la solubilité de la Huntingtine et dans les interactions protéiques (Tableau 2). Il est apparu simultanément avec l'évolution des poly-Q longs chez les vertébrés (Steffan, Agrawal et al. 2004). Le motif, constitué par les motifs poly-Q et poly-proline constitue donc un module d'interaction de la HTT avec ses partenaires susceptible d'être perturbé par la mutation. En aval du poly-Q, le motif HEAT : Huntintgtin, Elongation factor 3, protein phosphatase 2A, and IOR 1, long de 40 acides aminés joue un rôle important dans les interactions protéine-protéine (Andrade and Bork 1995 ; Neuwald and Hirano 2000). Le motif HEAT est présent 36 fois et se répartit en trois clusters le long de la protéine. Malgré une séquence dégénérée, des motifs HEAT-like semblent conserver une homologie de répartition chez la drosophile (Takano and Gusella 2002). Le trafic nucléo-cytoplasmique de la HTT est contrôlé par un signal d'export nucléaire carboxy-terminal et un motif d'import nucléaire faible (Xia, Lee et al. 2003). De plus les 17 premiers acides aminés interagissent avec TPR (Translocated Promoter Region) qui exporte les protéines hors du noyau. Récemment la possibilité d'une homodimérisation a été soulevée par l'analyse de la séquence de la HTT. Une prédiction de structure fondée sur l'analyse des chaînes alpha antiparallèles et de leur empilement montre une structure en trois blocs, capable de dimérisation (Palidwor, Shcherbinin et al. 2009). La HTT est sujette à des modifications post-transcriptionnelles qui sont répertoriées en Figure 9. La phosphorylation de différents sites de la HTT semble avoir des effets bénéfiques en contexte pathologique et physiologique, en particulier la phosphorylation de la serine 421 par AKT (Humbert, Bryson et al. 2002 ; Rangone, Poizat et al. 2004 ; Warby, Chan et al. 2005). De façon générale les événements de phosphorylation, participant aux fonctions de la HTT et à son homéostasie semblent diminués par la mutation. De la même façon la sumoylation en N-terminal de la HTT contrôle la localisation, la stabilité et l'activité de la HTT (Steffan, Agrawal et al. 2004). A l'opposé, la diminution de la palmitoylation de la partie N-terminale de la HTT diminue son catabolisme, favorise la formation d'inclusions et augmente la neurotoxicité (Yanai, Huang et al. 2006). Il en est de même avec la baisse de l'acétylation de la lysine 444 qui diminue la dégradation de la HTT par autophagie (Jeong, Then et al. 2009). La HTT contient des motifs consensus de clivage par plusieurs enzymes protéolytiques (Caspases, Aspartyl protéases, et Calpaine) qui sont à l'origine d'une large variété de fragments. La majorité de ces sites de clivage sont situés entre les acides aminés 469 et 586 de la protéine : générant des fragment N-terminaux porteurs du motif poly-glutamine (Wellington, Ellerby et al. 1998 ; Wellington, Singaraja et al. 2000 ; Kim, Yi et al. 2001; Wellington, Ellerby et al. 2002 ; Hermel, Gafni et al. 2004 ). L'utilisation des modèles murins a conduit à l'accumulation d'arguments en faveur de leur toxicité accrue par rapport aux formes natives. En effet, la déclaration des symptômes est plus précoce dans les modèles exprimant des fragments N-terminaux comparativement aux modèles Knock-in ou exprimant la HTT-mut entière (voir tableau des modèles animaux).

Cependant une étude d'échantillons de cerveaux de patients semble indiquer que la HTT-mut est plus résistante à la protéolyse que la HTT normale (Dyer and McMurray 2001). Ces résultats sont en opposition avec la détection de fragments N-terminaux de la HTT-mut au sein d'inclusions nucléaires chez des patients atteints de la forme juvénile de la MH (Hoffner, Island et al. 2005), et chez les modèles murins (Lunkes, Lindenberg et al. 2002 ; Wellington, Ellerby et al. 2002). La contribution du clivage protéolytique de la HTT aux mécanismes pathologiques, et notamment à l'agrégation protéique chez l'Homme n'est donc pas claire.

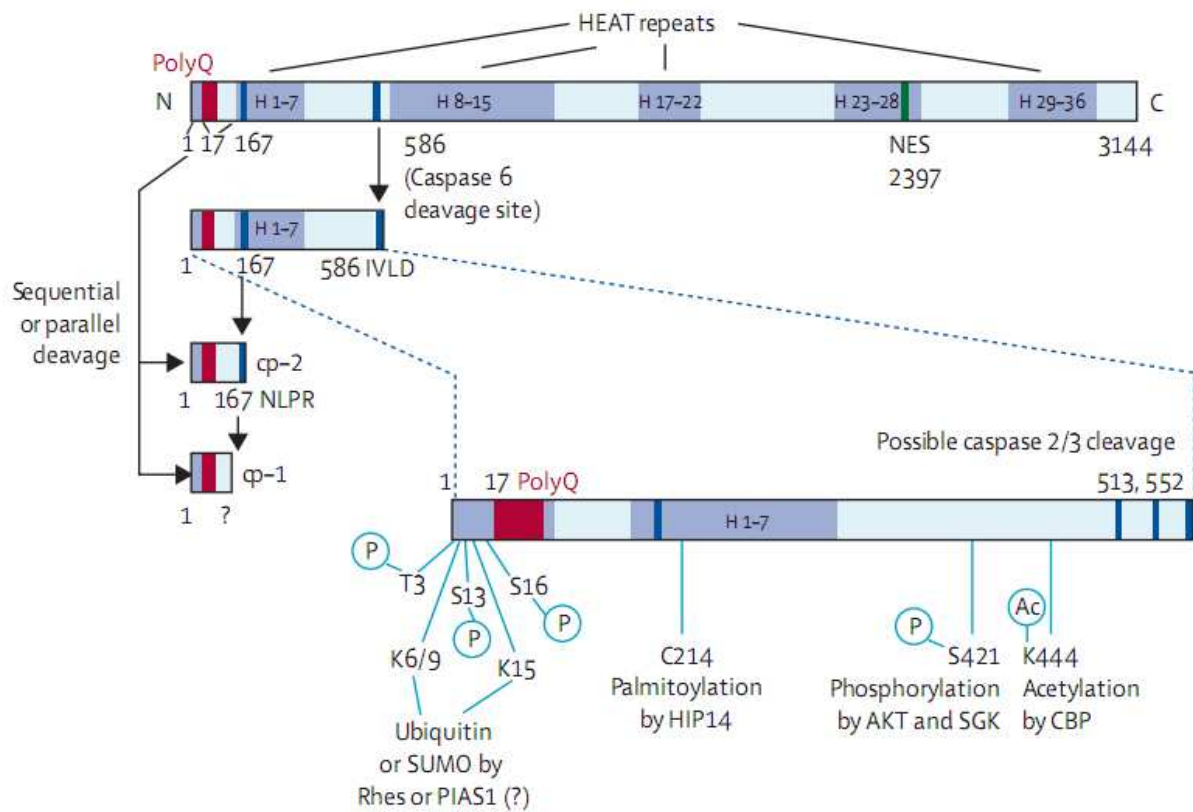


Figure 9 : Modifications post-traductionnelles de la HTT (modifié de (Ross and Tabrizi 2011))

### c) Mécanistique pathologique

Les mécanismes pathologiques de la MH sont complexes. Une altération moléculaire simple : l'expansion du motif poly-Q de la HTT déclenche un syndrome complexe et progressif. La mutation a des effets intracellulaires voir Figure 10 , intercellulaires locaux voir Figure 11 mais vraisemblablement aussi à l'échelle de l'organisme via des perturbations métaboliques et comportementales. La compréhension de la maladie repose sur les concepts de gain de fonction toxique et de perte de fonction normale de la mut-HTT. Le motif polyQ lui-même est également présent dans d'autres protéines qui provoquent au moins huit maladies neurodégénératives différentes caractérisées par la perte de différents types de neurones. La protéine porteuse de la répétition CAG semble donc jouer un rôle important dans la sélectivité de la neurodégénérescence. Une explication séduisante serait que ces protéines ont une fonction essentielle à la survie du sous type neuronal affecté par chaque maladie, et la perte partielle ou totale de cette fonction pourrait être responsable de la mort neuronale (Cattaneo, Rigamonti et al. 2001).

### c.1 Gain de fonction toxique et perte de fonction normale

L'extension du motif poly-Q perturbe les fonctions de la HTT. Certaines des fonctions de la mut-HTT ne sont pas réalisées par la HTT normale et ont un effet délétère. Il s'agit d'un gain de fonction toxique. Le mode de transmission autosomique dominant de la MH a toujours été interprété comme un argument en faveur de mécanismes de gain de fonction toxique. En effet, la mut-HTT a une affinité anormalement élevée pour certaines protéines et séquestre des éléments de la machinerie de transcription. Le motif poly-Q semble créer une résistance à la dégradation protéique qui sature le système Ubiquitine-protéasome et la mut-HTT semble perméabiliser la membrane mitochondriale. Ces deux effets favorisent une activation des voies d'apoptose. Par ailleurs, le motif poly-Q a pour effet d'entraîner l'oligomérisation de la mut-HTT qui est alors prise en charge par des processus cellulaires amenant à la formation d'agrégats de taille importante qui peuvent être nucléaires ou cytoplasmiques. Il semble que ces agrégats soient en partie protecteurs mais qu'ils participent néanmoins à une partie de la toxicité cellulaire de la mut-HTT, notamment par encombrement au sein des axones et par capture de protéines dans les inclusions nucléaires. Il est bien établi que la maladie est causée par un motif polyQ de plus de 35 répétitions au sein de la HTT et que la longueur de ce motif a un impact majeur sur l'âge auquel se déclare la maladie. Par ailleurs, il existe maintenant des indices clairs de la contribution à la pathogénèse de la perte de l'activité physiologique de la protéine normale. En particulier, la sélectivité cellulaire de la maladie pourrait être liée à ce processus de perte de fonction normale. Il existe des indices qui montrent que la HTT bien qu'ubiquitaire a des fonctions physiologiques qui sont importantes pour les neurones corticaux et striataux (Cattaneo, Zuccato et al. 2005). Dans le cas d'une perte de fonction normale, la présence d'un allèle muté a pour conséquence la perte d'activité d'un des deux allèles, pour au moins une partie des fonctions. Tout se passe alors comme si un des allèles était perdu : il s'agit de l'haploinsuffisance. Une perte de fonction partielle de la HTT semble rendre les neurones du striatum spécifiquement vulnérables (Zuccato and Cattaneo 2009). Surtout, il est prouvé que la réduction des niveaux de HTT sauvage ou de ses activités peut contribuer à la pathogénèse de la MH (Cattaneo, Zuccato et al. 2005).

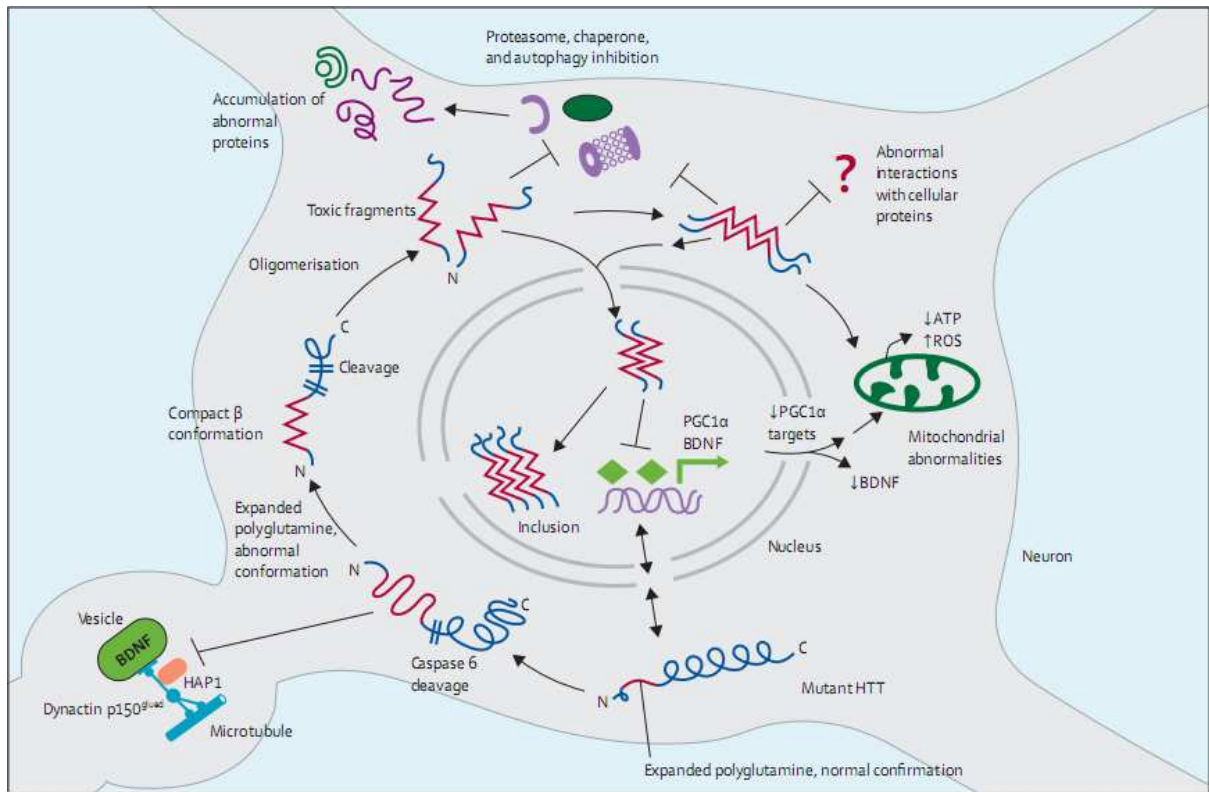


Figure 10 : Mécanismes intracellulaires connus de la maladie de Huntington ((Ross and Tabrizi 2011))

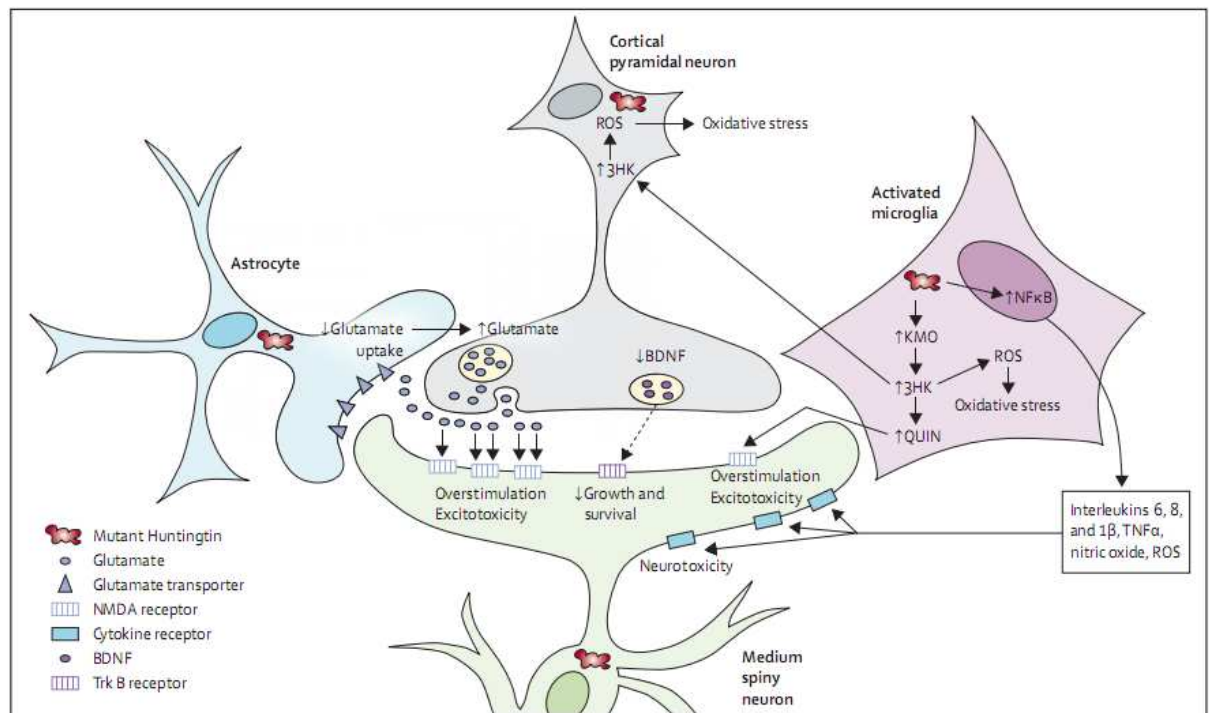


Figure 11 : Mécanismes intercellulaires connus de la maladie de Huntington ((Ross and Tabrizi 2011))

## c.2 La formation d'agrégats

Des altérations structurelles évoquant des figures d'autophagie ont été mises très tôt en évidence au sein des cerveaux de patients atteints de la MH (Roizin, Stellar et al. 1974). 20 ans plus tard, l'utilisation des modèles de souris de la série R6/2 a éclairé d'une nouvelle lumière ces résultats et révélé la présence d'inclusions nucléaires ubiquitinylées, suggérant un défaut de dégradation (Davies, Turmaine et al. 1997). La même année, la réévaluation de la présence de ces inclusions au sein des cerveaux de patients par l'étude de DiFiglia et al. (DiFiglia, Sapp et al. 1997) a placé les inclusions nucléaires au centre de l'attention de la communauté Huntington. La présence d'inclusions intranucléaires de HTT au sein des neurones du putamen, du noyau caudé et du cortex des patients permet un diagnostic certain de la maladie (Gutkunst, Li et al. 1999). La Figure 12 récapitule l'état des connaissances sur la dynamique de formation et de dégradation des agrégats. Les agrégats sont ainsi présents au sein du cytoplasme, dans les dendrites et les terminaisons axonales (DiFiglia, Sena-Esteves et al. 2007; Vonsattel, Keller et al. 2008). Ces agrégats protéiques massifs ne se retrouvent pas dans les zones épargnées par la neurodégénérescence comme le cervelet. De nombreux modèles de la MH, ainsi que d'autres maladies à triplet CAG reproduisent ces inclusions mais avec une répartition cérébrale variable. Les agrégats de HTT-mut sont aussi présents dans les tissus périphériques des modèles murins (Sathasivam, Hobbs et al. 1999; Bjorkqvist, Fex et al. 2005; Moffitt, McPhail et al. 2009). La fréquence de l'inclusion est six à 18 fois supérieure dans les formes juvéniles au sein des différentes couches corticales (DiFiglia, Sapp et al. 1997). Une différence d'activité du complexe Ubiquitine protéasome pourrait expliquer la distribution neuronale plutôt que gliale des inclusions intranucléaires (Tydlacka, Wang et al. 2008). Ainsi, une large bibliographie indique que les agrégats échappent à la prise en charge par le protéasome et semblent perturber son fonctionnement (Jana, Zemskov et al. 2001; Anderson, Lawrence et al. 2002; Verhoef, Lindsten et al. 2002; Bennett, Shaler et al. 2007; Hunter, Lesort et al. 2007). En plus d'effets sur la machinerie de dégradation des protéines, l'agrégation de HTT-mut séquestre la HTT normale (Kazantsev, Preisinger et al. 1999), des facteurs de transcription (Steffan, Kazantsev et al. 2000; Nucifora, Sasaki et al. 2001), et des protéines de transport (Gunawardena, Her et al. 2003; Trushina, Dyer et al. 2004). Cependant, la densité des agrégats n'est pas corrélée avec celle de la mort cellulaire (Saudou, Finkbeiner et al. 1998). Le modèle de souris BACHD (Gray, Shirasaki et al. 2008), et les cerveaux de patients montrent une plus grande quantité d'agrégats dans le cortex et les interneurons striataux que dans les MSNs (Gutkunst, Li et al. 1999; Kuemmerle, Gutkunst et al. 1999). L'étude de neurones striataux de rat transfectés transitoirement avec l'exon 1 de la mut-HTT a suggéré que la mort neuronale pourrait se produire en l'absence d'inclusions (Arrasate, Mitra et al. 2004). Les stratégies diminuant le nombre d'agrégats en stimulant l'activité des chaperonnes (protéines favorisant le bon repliement des protéines) (Carmichael, Chatellier et al. 2000; Vacher, Garcia-Oroz et al. 2005), comme les stratégies visant à promouvoir l'inclusion de la HTT-mut dans les agrégats (Bodner, Outeiro et al. 2006) ont des effets positifs sur les modèles. La toxicité des agrégats est donc incertaine. Ils pourraient diminuer la disponibilité de formes N-terminales de la mut-HTT, libres ou oligomériques, plus toxiques que les macro-agrégats eux-mêmes (Gong, Lim et al. 2008). Au-delà de la taille, il semble que la localisation des agrégats soit importante. La localisation péri-nucléaire est moins délétère que la localisation intranucléaire (Yang, Dunlap et al. 2002) elle-même moins grave



que leur présence dans les neurites (Li, Li et al. 2000 ; Li, Li et al. 2001 ; Lee, Yoshihara et al. 2004). Les agrégats ne sont donc pas à eux seuls les clés de la compréhension de la maladie, mais semblent impliqués en amont ou en aval dans les mécanismes pathologiques à l'origine de la spécificité cellulaire de la MH. Ces structures intracellulaires peuvent conduire à des défauts d'interactions cellulaires, notamment en perturbant les activités pérисynaptiques de la glie.

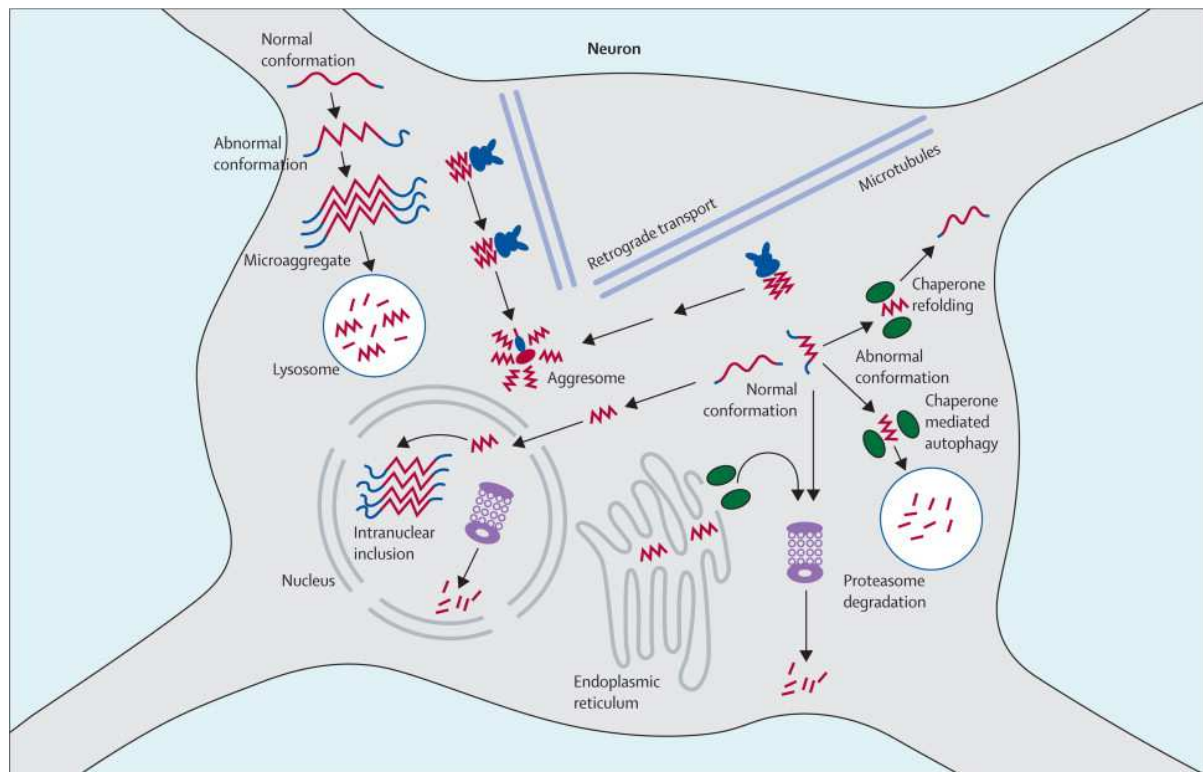


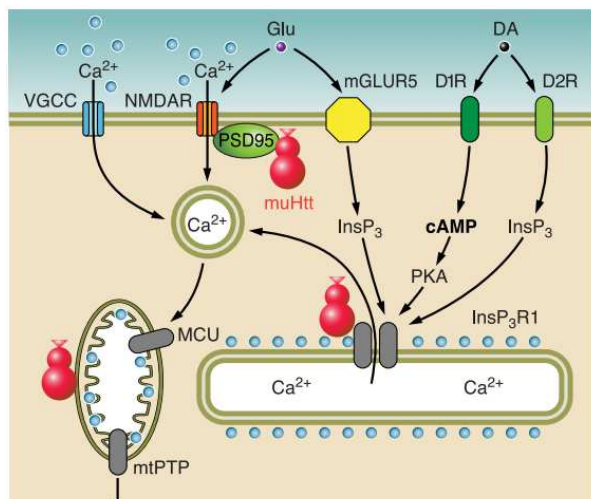
Figure 12 : Formation des agrégats et voies de dégradation connues ((Ross and Tabrizi 2011))

### c.3 Les effets intercellulaires : l'excitotoxicité et la perte du soutien trophique

La principale caractéristique fonctionnelle des neurones est d'être des intégrateurs et des transporteurs d'information. La communication entre neurones repose sur la génération d'un signal, son transport électrique (potentiel d'action) et moléculaire (neurotransmetteur) le long de l'axone et sa transmission de cellule à cellule au sein d'une structure cruciale : la synapse. La communication normale entre neurones est régulée par un grand nombre de protéines synaptiques et pérисynaptiques faisant intervenir le neurone pré-synaptique, le neurone post-synaptique mais aussi les astrocytes associés à la synapse. La HTT normale semble jouer un rôle dans les trois entités pour concourir à un bon fonctionnement synaptique. La HTT interagit avec des protéines cytosquelettiques et associées aux vésicules synaptiques essentielles à l'exo- et l'endocytose synaptiques, participant ainsi au contrôle de l'activité synaptique (Smith, Brundin et al. 2005). La HTT lie directement le domaine SH3 de PSD95 (Sun, Savanenin et al. 2001). PSD95 (Post Synaptic Density 95) lie les récepteurs au NMDA et au kainate au niveau post synaptique (Maue, Kraner et al. 1990). L'interaction entre PSD95 et la HTT est affaiblie par la mutation ce qui pourrait perturber l'activité des canaux NMDA et donc être responsable de la sensibilité accrue des neurones exprimant la mut-HTT à l'excitotoxicité (Sun, Savanenin et al. 2001), voir Figure 13. De plus la HTT joue aussi un rôle dans le complexe

présynaptique via son interactant HIP1 qui est associé aux terminaisons présynaptiques (Parker, Metzler et al. 2007). De plus la HTT interagit avec PACSIN1/Syndapine, la Syntaxine, et l'Endophiline A, trois protéines impliquées dans la transmission synaptique et le recyclage des récepteurs et vésicules synaptiques. Ces interactions sont plus fortes avec la mut-HTT, ce qui perturbe la transmission synaptique (Smith, Brundin et al. 2005). Par ailleurs, comprendre la spécificité striatale de la neurodégénérescence précoce fait l'objet de beaucoup d'expériences et de bien peu de consensus. Un argument fort pour l'implication d'effet intercellulaires a été apporté par le fait que l'expression de la mut-HTT exclusivement dans le cortex ou le striatum ne suffit pas à causer un phénotype pathologique (Gu, Li et al. 2005 ; Gu, Andre et al. 2007). Ainsi, l'accumulation de données sur les mécanismes pathologiques permet de proposer un effet additionnel des mécanismes intracellulaires. Tout d'abord, le striatum dépend du BDNF cortical en tant que signal de survie (Altar, Cai et al. 1997 ; Baquet, Gorski et al. 2004). Deux facteurs concourent à une baisse du BDNF disponible pour le striatum : la mut-HTT semble baisser l'expression du BDNF dans les neurones corticaux et affecte son transport le long des axones. Les MSNs sont des neurones inhibiteurs toniques qui déchargent en permanence et qui reçoivent beaucoup d'afférences, ce qui leur donne leur aspect épineux. Les MSNs présentent en effet des processus dendritiques très développés recevant une grande quantité d'afférences originaires de tout le néocortex (à l'exception des cortex auditifs et visuels primaires), mais aussi du thalamus et du tronc cérébral. Ils reçoivent ainsi un grand nombre d'afférences glutamatergiques corticales et dopaminergiques de la substance noire et sont donc exposés à un stress excitotoxique/calciqie vraisemblablement plus intense que le reste du système nerveux central. Cette configuration met les MSNs (qui représentent 90% des neurones striataux) dans une situation particulière. Ceci pourrait expliquer en partie une neurodégénérescence striatale précoce suivie d'une extension télencéphalique. De plus, beaucoup de travaux montrent que les afférences corticales relâchent une plus grande quantité de glutamate en contexte mutant (Zuccato, Valenza et al. 2010). La sensibilité à l'excitotoxicité est variable selon les modèles. Au stade présymptomatique, les modèles exprimant un fragment N-terminal de la HTT (lignées R6/1, R6/2, N171-82Q, N171-128Q, shortstop) montrent une sensibilité accrue à l'acide quinolonique alors qu'à l'état symptomatique l'effet est inversé et les souris deviennent résistantes (Hansson, Castilho et al. 2001 ; Zeron, Hansson et al. 2002 ; Graham, Pouladi et al. 2009). Elle pourrait être exacerbée dans les modèles exprimant une mut-HTT entière (lignées YAC) (Slow, Graham et al. 2005 ; Zuccato, Valenza et al. 2010). De plus l'élimination du site de clivage par la Caspase 6 (voir Figure 9) dans la lignée de souris YAC128 élimine leur sensibilité à l'excitotoxicité (Graham, Deng et al. 2006). Il est donc probable que le clivage pathologique de la mut-HTT soit impliqué dans la sensibilisation à l'excitotoxicité rencontrée dans la MH. Il est par ailleurs intéressant de noter que la surexpression de la HTT normale compense en partie la toxicité au sein de modèles transgéniques de la MH et réduit notamment l'effet de l'excitotoxicité glutamatergique (Leavitt, Guttman et al. 2001). L'excitotoxicité est contrôlée par le flux de calcium à travers la membrane post-synaptique voir Figure 13. Ainsi, les récepteurs NMDA induisent une augmentation du calcium intracellulaire qui est potentialisée par le signal dopaminergique (Ferrante, Kowall et al. 1985 ; Lipton and Rosenberg 1994 ; Cepeda, Colwell et al. 1998). De plus, le signal glutamatergique est renforcé par la mut-HTT qui interagit avec PSD-95, un modulateur des récepteurs au NMDA (Aarts, Liu et al. 2002). Chez les souris R6/2, l'association entre

Grp78 et IP3R est diminuée, perturbant la régulation de la libération du Ca<sup>2+</sup> à partir du réticulum (Higo, Hamada et al. 2010). La perturbation des taux de calcium intracellulaire est un signal pro-apoptotique (Lynch and Guttman 2002); (Higo, Hamada et al. 2010). De plus, le rôle de pompage et de recyclage périssynaptique du glutamate assuré par la glie est aussi perturbé dans la MH. Au-delà d'une libération glutamatergique augmentée, une diminution de la recapture du glutamate présent dans la fente synaptique par la glie semble augmenter la neurodégénérescence dans la MH, et son inhibition pharmacologique reproduit une lésion striatale chez le rat (Lievens, Dutertre et al. 1997). Le co-transporteur glial du glutamate et du sodium GLT1 est responsable de la réabsorption de la plupart du glutamate extracellulaire et est au cœur de la régulation de la transmission synaptique (Tzingounis and Wadiche 2007). Les modèle murins R6/2 et R6/1 montrent une diminution de l'expression de GLT1 dans le striatum, responsable d'une baisse de la réabsorption du glutamate (Lievens, Woodman et al. 2001 ; Behrens, Franz et al. 2002 ; Shin, Fang et al. 2005 ; Estrada-Sanchez, Montiel et al. 2009). Une diminution des niveaux d'ARNm des transporteurs GLT1 et une diminution de la réabsorption du glutamate ont été démontrées sur des tissus post-mortem de cerveau de patients atteints de la MH (Arzberger, Krampfl et al. 1997 ; Hassel, Tessler et al. 2008 ; Faideau, Kim et al. 2010). De façon intéressante, le traitement à la ceftriaxone augmente l'expression de GLT1 (Rothstein, Patel et al. 2005) et atténue les atteintes neurales de la MH chez les souris R6/2, ce qui suggère que la perturbation de la réabsorption gliale du glutamate dans la MH joue un rôle central dans la MH (Miller, Dorner et al. 2008). De même, le Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF) limite (probablement via l'augmentation de l'activité des transporteurs du glutamate gliaux) l'excitotoxicité dans un modèle excitotoxique de rat (Beurrier, Faideau et al. 2010). De plus, l'expression de Mitochondrial Uncoupling Proteins (UCPs) et d'un transporteur du glucose GLuT1 diminuent le phénotype de drosophiles exprimant la mut-HTT spécifiquement dans les cellules gliales, soulignant une possible implication du métabolisme énergétique dans les interactions cellulaires pathologique de la MH (Besson, Dupont et al. 2010). Par ailleurs, les mitochondries des MSNs affectés par la MH sont moins à même de gérer les variations de concentration de calcium intracellulaire et la demande énergétique importante liée à cette gestion rencontre un contexte de métabolisme énergétique mitochondrial perturbé par la MH.



**Figure 13 : Lien entre excitotoxicité, gestion du calcium et perméabilité mitochondriale**

#### c.4 Les effets mitochondriaux

La MH a été précocement associée à une altération structurelle des mitochondries dans les tissus corticaux de patients post mortem (Goebel, Heipertz et al. 1978 ; Gardian and Vecsei 2004). Ces résultats ont été confortés par des données de spectroscopie par résonance magnétique révélant une diminution du N-acétylaspartate, qui reflète le métabolisme mitochondrial neural, dans les ganglions de la base chez les patients (Jenkins, Koroshetz et al. 1993 ; Moffett, Ross et al. 2007). De plus, le cortex et les ganglions de la base montrent une

accumulation de lactate (Jenkins, Koroshetz et al. 1993 ; Koroshetz, Jenkins et al. 1997), suggérant une augmentation du métabolisme anaérobie. Ces effets ont été détectés précocement dans la maladie par tomographie à émission de positons (Kuhl, Phelps et al. 1982 ; Kuhl, Metter et al. 1984 ; Kuhl, Markham et al. 1985 ; Browne, Bowling et al. 1997 ; Fan and Raymond 2007). Parallèlement, l'établissement de modèles animaux à l'aide de toxines mitochondriales a conforté l'hypothèse d'une implication de la mitochondrie dans la MH (Butterfield, Howard et al. 2001), voir Tableau 4. De la même façon, la constatation de la possibilité de reproduire un phénotype clinique et pathologique proche de la MH par l'administration d'inhibiteurs de la succinate déshydrogénase (acide 3-nitropropionique) et du complexe II (malonate) renforce l'idée d'une dysfonction mitochondriale dans la MH (Brouillet, Hantraye et al. 1995). La HTT-mut co-localise avec la mitochondrie et altère la structure du réseau mitochondrial, son activité métabolique (Orr, Li et al. 2008) et la gestion du calcium ((Panov, Gutekunst et al. 2002 ; Choo, Johnson et al. 2004). Les mitochondries du modèle souris YAC72 montrent une diminution de leur capacité de prise en charge du calcium. Les lymphoblastes de patient confirment ces résultats, avec un effet accru pour les cas juvéniles (Panov, Gutekunst et al. 2002). La même équipe a par la suite démontré que l'incubation de mitochondries normales avec la protéine mutante suffisait à reproduire ce défaut (Panov, Burke et al. 2003). La sensibilité calcique mitochondriale, détectable au sein des lymphocytes est donc probablement ubiquitaire chez les patients. L'atteinte striatale pourrait être due à une sensibilité spécifique des neurones striataux comme l'étude des modèles semble le suggérer (Brustovetsky, LaFrance et al. 2005). L'analyse des mitochondries isolées est cependant source de variabilité, car cette étude montre une sensibilité plus faible au calcium chez les mitochondries de souris knock-in par rapport au contrôles. Par ailleurs, un grand nombre d'études ont révélé une baisse d'activité de différents éléments de la chaîne mitochondriale, et en particulier l'implication du complexe II, pour revue : (Damiano, Galvan et al. 2010). Ainsi, la surexpression des sous-unités du complexe II restaure la fonction mitochondriale (Benchoua, Trioulier et al. 2006). La HTT-mut lie P53 et agit sur son activité transcriptionnelle. BAX et PUMA, deux protéines régulées par P53, voient leur expression augmentée par la HTT-mut, augmentant la dépolarisation mitochondriale (Bae, Xu et al. 2005). De façon intéressante, la HTT-mut

réprime la transcription de PGC1alpha (Cui, Jeong et al. 2006). PGC1alpha est un gène nucléaire codant pour un co-activateur transcriptionnel régulant l'expression des gènes impliqués dans le contrôle de la respiration et de la biogénèse mitochondriale. Le Knock-out de ce gène chez la souris crée un phénotype moteur comparable à la MH et induit des lésions striatales (Cui, Jeong et al. 2006). PGC1alpha a par ailleurs été confirmé comme étant un gène modificateur de la maladie (Taherzadeh-Fard, Saft et al. 2009). Au sein du cortex de patients atteints de la MH, le génome mitochondrial semble instable (Horton, Graham et al. 1995; Cantuti-Castelvetri, Lin et al. 2005 ). Bien que les études aient porté principalement sur le cerveau, des anomalies mitochondriales ont été observées au sein des tissus périphériques des patients atteints de la MH. Un déficit de complexe I a été décrit au sein de muscles de patients atteints de la MH (Arenas, Campos et al. 1998), mais aucune différence significative ne semble détectable dans les activités des complexes I et IV (Turner, Cooper et al. 2007). Cependant, cette dernière étude révèle une corrélation significative entre l'activité des complexes II-III et la progression de la maladie ainsi que des preuves de la formation d'inclusion musculaires (Turner, Cooper et al. 2007). La production d'ATP est considérablement réduite dans le muscle de patients pré-symptomatiques et symptomatiques (Lodi, Schapira et al. 2000). D'autres groupes ont mis en évidence des morphologies anormales et la diminution du potentiel de membrane dans les mitochondries des lymphoblastes et des muscles de patients (Panov, Gutekunst et al. 2002 ; Squitieri, Cannella et al. 2006 ; Squitieri, Falleni et al. 2010). Comme dans le cerveau, l'ADN mitochondrial dans les leucocytes de patients est instable (Liu, Cheng et al. 2008). Les déficiences énergétiques, chez les patients de la MH, ont été observées dans de nombreuses études, et par une variété de méthodes. L'étude de l'accumulation cérébrale de 18F-2-désoxyglucose par tomographie par émission de positons (TEP) a montré une réduction significative de la captation du glucose en l'absence de mort neuronale dans le cortex et le striatum de patients de la MH pré-symptomatiques (Gil and Rego 2008). Une augmentation paradoxale du lactate a été observée dans le cortex et dans le striatum de patients symptomatiques par spectroscopie par résonance magnétique (SRM) (Jenkins, Rosas et al. 1998). En outre, la plupart des patients souffrent de perte de poids et d'atrophie musculaire, en dépit d'une prise alimentaire constante (Sanberg, Fibiger et al. 1981; Kirkwood, Su et al. 2001 ; Djousse, Knowlton et al. 2002 ).

#### c.5 La Huntingtine, le transport et les membranes

De façon correspondante, avec la perturbation de la structure des mitochondries au sein des tissus de patients, l'absence de HTT perturbe aussi la structure du nucléole, du réticulum endoplasmique, du golgi et des endosomes tardifs au sein de CSE de souris Hdh - / - (Hilditch-Maguire, Trettel et al. 2000). La HTT a été très rapidement associée aux vésicules au niveau du réticulum endoplasmique et des axones (DiFiglia, Sapp et al. 1995 ; DiFiglia, Sapp et al. 1997 ; Velier, Kim et al. 1998). De plus, la réduction d'expression de l'homologue de la HTT, chez *Drosophila melanogaster*, diminue la vitesse du transport des vésicules et des mitochondries (Gunawardena, Her et al. 2003 ; Gauthier, Charrin et al. 2004 ; Borrell-Pages, Zala et al. 2006 ; Caviston, Ross et al. 2007 ; Colin, Zala et al. 2008). La diminution de la vitesse du transport vésiculaire est confirmée dans les neurones de souris KO conditionnel Hdh - / - ou par interférence ARN (Dragatsis, Levine et al. 2000). La HTT est aussi impliquée dans le transport rapide des mitochondries dans les neurones de mammifères et

l'immobilisation est d'autant plus efficace que l'expression de la HTT est faible (Trushina, Dyer et al. 2004). La mut-MTT ralentit ainsi le transport axonal, et perturbe les fonctions synaptiques (Murphy, Carter et al. 2000 ; Cepeda, Hurst et al. 2003 ; Li, Wyman et al. 2003 ; Vetter, Jehle et al. 2003 ; Cummings, Milnerwood et al. 2006 ; Milnerwood, Cummings et al. 2006 ; Bauer, Wong et al. 2009). Par ailleurs, le BDNF nécessaire au bon fonctionnement du striatum est synthétisé dans le corps cellulaire des neurones corticaux et chargé dans des vésicules au sein du réseau trans-golgien (Thomas and Davies 2005). Ces vésicules sont transportées le long des axones projetant le long de l'axe cortico-striatal et sont cruciales pour la survie des neurones striataux (Altar, Cai et al. 1997 ; Saudou, Finkbeiner et al. 1998 ; Zuccato, Ciammola et al. 2001 ; Baquet, Gorski et al. 2004 ; Gauthier, Charrin et al. 2004). Ce processus est facilité par l'interaction de la HTT avec la chaîne intermédiaire de la Dynéine (Caviston, Ross et al. 2007). Elle interagit aussi avec la Huntingtin-associated protein-1 (HAP1) qui elle-même interagit avec p150/Glued (sous-unité du complexe Dynactine) (Engelender, Sharp et al. 1997 ; Li, Gutekunst et al. 1998 ; Gauthier, Charrin et al. 2004 ; Gunawardena and Goldstein 2005 ; McGuire, Rong et al. 2006) et la mut-HTT affecte le transport rétrograde et antérograde (Block-Galarza, Chase et al. 1997 ; Morfini, You et al. 2009). L'augmentation de taille du motif poly-Q empêche l'interaction de la mut-HTT avec HAP1 et diminue la fonction de la Dynéine (Caviston, Ross et al. 2007). La Dynéine est requise pour la pousse dendritique des neurones chez la drosophile (Sato, Sato et al. 2008; Zheng, Wildonger et al. 2008 ) et chez la souris (Braunstein, Eschbach et al. 2010). Par ailleurs, l'interactant de la Dynéine LIS1 est crucial pour l'établissement de la morphologie dendritique (Fleck, Hirotsune et al. 2000 ; Liu, Steward et al. 2000). Ceci est à mettre en relation avec la démonstration récente que la perte à l'état adulte de l'expression du BDNF montre une sensibilité particulière de la morphologie des structures dendritiques des MSNs par rapports à d'autres types de neurones (Rauskolb, Zagrebelsky et al. 2010). Par ailleurs, Une mutation ponctuelle de la chaîne lourde de la Dynéine induit une atrophie striatale (Braunstein, Eschbach et al. 2010), confirmant que l'interaction de la HTT avec les moteurs moléculaire est d'une grande importance pour la pathologie de la MH. Le rôle de la HTT dans le transport des organites le long des microtubules est régulé par sa phosphorylation, notamment de S421 par AKT (Colin, Zala et al. 2008 ; Zala, Colin et al. 2008). Ainsi, la phosphorylation de la HTT sur la sérine 421 (S421) augmente la vitesse de transport antérograde des vésicules de BDNF le long des microtubules (Humbert, Bryson et al. 2002 ; Colin, Zala et al. 2008) voir Figure 14 et Figure 15. La S421 est phosphorylée par AKT et la kinase induite par le sérum (SGK) et est déphosphorylée par la Calcineurine (Humbert, Bryson et al. 2002 ; Rangone, Poizat et al. 2004). La phosphorylation de la S421 est anormalement basse dans la MH (Caviston, Ross et al. 2007) ce qui est associée à une diminution de la vitesse de transport vésiculaire antérograde et le transport rétrograde est favorisé (Colin, Zala et al. 2008). Néanmoins le mécanisme exact et la spécificité cellulaire de ce mécanisme sont débattus (Her and Goldstein 2008).

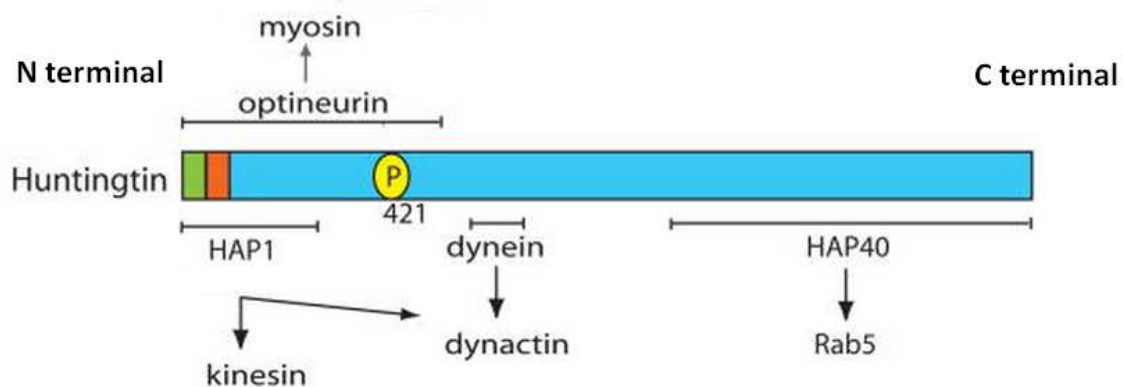


Figure 14 : Interaction protéiques de la HTT centrées sur le transport vésiculaire (simplifié de (Caviston and Holzbaur 2009))

De même, les souris transgéniques déficientes en BDNF reproduisent la crispation des pattes typique de la MH (Baquet, Gorski et al. 2004 ; Rauskolb, Zagrebelsky et al. 2010), et les souris déficientes en PGC-1 $\alpha$ , un co-activateur transcriptionnel impliqué dans la régulation du métabolisme énergétique, reproduisent la crispation des pattes ainsi qu'une hyperactivité transitoire (Lin, Wu et al. 2004). Fait important, tous ces animaux transgéniques présentent des lésions striatales évidentes. Ceci est intéressant, parce que l'ablation génétique des cellules exprimant les récepteurs de la dopamine D1 (donc striatales), donne un phénotype moteur très similaire à celui observé chez les souris mutantes pour la Dynéine (Dync1h1, mutant Cra Y1055C, (Hafezparast, Klocke et al. 2003 ; Gantois, Fang et al. 2007 ; Braunstein, Eschbach et al. 2010). La survenue de troubles moteurs dans les souris Knock-in modèles de la MH est antérieure aux lésions striatales (Menalled, Sison et al. 2002), ce qui est aussi le cas dans les mutants de la Dynéine Y1055C, bien que les lésions soit plus précoces (Braunstein, Eschbach et al. 2010). Ceci suppose que les mécanismes pathologiques responsables des atteintes motrices puissent être liés directement au défaut des transports intracellulaires et non une conséquence secondaire à la dégénérescence. Le croisement de souris mutantes Dynéine Y1055C avec les souris knock-in 94 CAG ont nettement aggravé les symptômes moteurs (Ravikumar, Acevedo-Arozena et al. 2005). Plus important encore, les souris mutantes pour la Dynéine présentent des troubles métaboliques périphériques analogues aux modèles souris de la MH, renforçant encore l'analogie entre les modèles animaux de la MH et la mutation de la Dynéine chez la souris et la crédibilité d'une implication centrale du transport intracellulaire dans la MH.

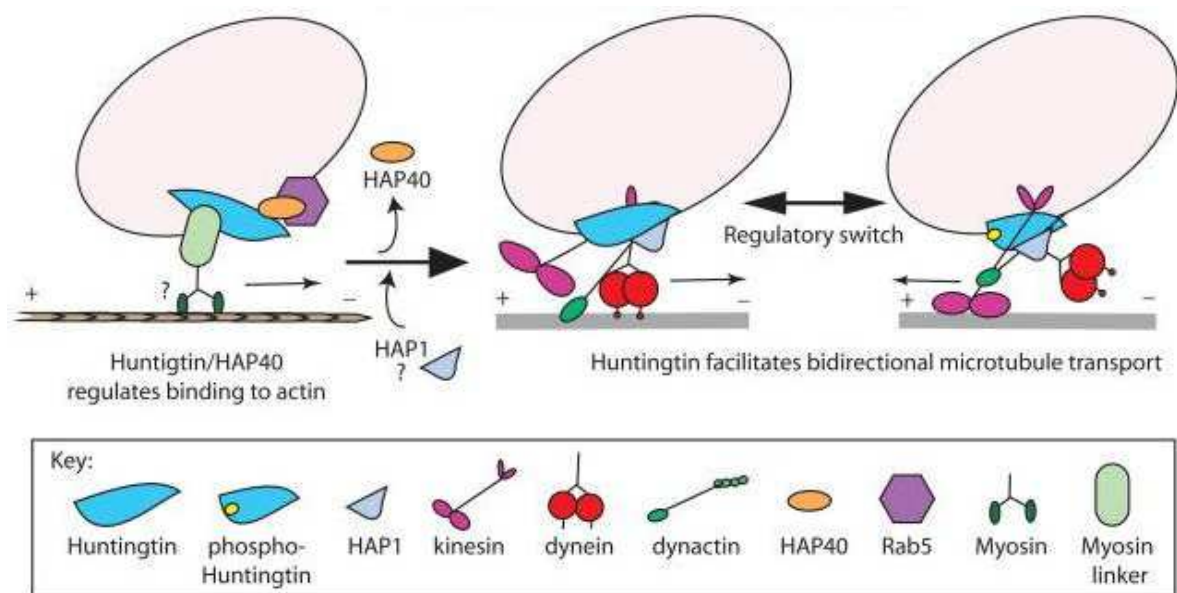


Figure 15 : Coordination du transport vésiculaire par la Huntingtine simplifié de (Caviston and Holzbaur 2009)

#### d) Les effets transcriptionnels

Les premiers indices d'une perturbation transcriptionnelle dans la MH ont été révélés au milieu des années 90 par hybridation in situ dans des cerveaux de patients, montrant que les ARNm de certains neuropeptides et récepteurs post-synaptiques sont plus rares au sein des neurones striataux (Augood, Faull et al. 1996 ; Norris, Waldvogel et al. 1996; Arzberger, Krampfl et al. 1997 ; Augood, Faull et al. 1997 ). Ces résultats ont rapidement été confirmés par des études d'expression des gènes dans les souris R6/2 (Cha, Kosinski et al. 1998 ; Cha, Frey et al. 1999). De nombreuses études de perturbation transcriptionnelle ont suivi, utilisant les techniques de puces à ADN sur les modèles cellulaires et animaux (revue : (Cha 2007)). Ces études ont mis en lumière l'interaction de la HTT avec des facteurs de transcription et les complexes HDAC/HAT. De façon intéressante ces études montrent que les perturbations transcriptionnelles sont présentes avant le déclenchement des symptômes. Ceci renforce l'intérêt de l'étude des phénomènes transcriptionnels pour élucider les causes de la MH. Il ressort de ces études que les effets transcriptionnels de la HTT-mut ne sont pas contrôlés par un seul régulateur de l'expression génique mais plutôt par la perturbation de plusieurs facteurs de transcriptions. Les voies de signalisation liées à CREB/P300, REST/NRSF ont notamment été impliquées (Cha 2007 ; Johnson and Buckley 2009). Un grand nombre de publications montrent que l'élément de régulation transcriptionnel répondant à CREB/cAMP (CRE) est perturbé dans le contexte de la MH (Lee, Kim et al. 2005; Cui, Jeong et al. 2006 ; DeMarch, Giampa et al. 2007; DeMarch, Giampa et al. 2008 ); (Nucifora, Sasaki et al. 2001 ; Obrietan and Hoyt 2004). CREB est un facteur de transcription de la famille des « basic leucine zipper » et intervient dans la régulation transcriptionnelle d'un grand nombre de gènes (Wilson, Mochon et al. 1996; Shieh, Hu et al. 1998 ; Tao, Finkbeiner et al. 1998 ; Redmond, Kashani et al. 2002 ; Kronke, Bochkov et al. 2003 ; Marie, Morishita et al. 2005 ; Suzuki, Zhou et al. 2007 ; Huang, Lin et al. 2008 ). Au sein du système nerveux, CREB régule un ensemble de processus neuroprotecteurs comme l'expression de facteurs trophiques, de gènes



antiapoptotiques, d'enzymes intervenant dans la détoxification, ainsi que la biogénèse des mitochondries via PGC1A (Wilson, Mochon et al. 1996 ; Shieh, Hu et al. 1998 ; Tao, Finkbeiner et al. 1998 ; St-Pierre, Drori et al. 2006 ; Fernandez-Marcos and Auwerx 2011).

Le développement des travaux d'analyse des ARNm et la variété des modèles utilisés pour l'étude de la MH ont amené à la mise en place du Hereditary Disease Array Group (HDAG). Le HDAG a été créé pour coordonner les efforts d'analyse transcriptomiques de plus d'une cinquantaine de scientifiques en maintenant une base de données internationale. Dans un souci d'harmonisation, les études ont partagé le même support technologique (Puces GeneChip d'Affymetrix). La coordination a permis une étude séquentielle dans le temps de l'altération transcriptomique dans les modèles, publiée en 2002 (Chan, Luthi-Carter et al. 2002 ; Fossale, Wheeler et al. 2002 ; Luthi-Carter, Hanson et al. 2002; Luthi-Carter, Strand et al. 2002 ; Sipione, Rigamonti et al. 2002). Les gènes impliqués ont pour une large part récapitulé des mécanismes déjà impliqués dans la maladie comme la transmission synaptique, les protéines du cytosquelette, la régulation transcriptionnelle, les signaux intracellulaires et la gestion de l'homéostasie calcique. L'avantage de cette approche est d'identifier des gènes précis au sein de ces fonctions, avec un débit inaccessible aux techniques antérieures de génomique fonctionnelle. Il est intéressant de noter que les gènes affectés sont globalement sous exprimés dans la MH, et que le nombre de gènes affectés croît avec l'évolution de la maladie. L'aspect progressif de cette perturbation transcriptionnelle peut être mis en parallèle avec la progressivité symptomatique de la MH. L'utilisation des modèles souris de la MH a permis d'identifier de nombreux gènes dont l'expression est modifiée par la présence d'un allèle mutant (Chan, Luthi-Carter et al. 2002 ; Luthi-Carter, Hanson et al. 2002; Luthi-Carter, Strand et al. 2002 ; Kuhn, Goldstein et al. 2007). L'ensemble des études transcriptomiques ayant contribué à la découverte de perturbations de l'expression des gènes dans la MH est reporté dans le Tableau 3.

Tableau 3 : bilan des études transcriptomiques récentes réalisées dans le contexte de la MH

First author	Publication year	HD model	Tissue	Technology
Iannicola	2000	R6/1 mice	Whole brain	Atlas Mouse cDNA Expression arrays
Luthi-Carter	2000	R6/2 mice	Striatum	Mu6500A, B, C, D arrays
Wytenbach	2001	PC12 rat cell line expressing first exon of 74 CAG-HTT	Rat pheochromocytoma	Various Atlas rat cDNA arrays
Chan	2002	HD46, HD100, YAC72	Striatum, cerebellum	No info
Luthi-Carter	2002	R6/2, N171-82Q mice	Striatum, cerebellum	Mu 11K arrays
Fossale	2002	HdhQ111 mice	Striatum	Human GENEFILTERS microarrays
Sipione	2002	ST14A rat cell line expressing N-terminal HTT with 67, 105 or 108 CAG	Immortalized rat embryonic striatum	Rat RGU34A arrays
Ferrante	2003	R6/2 mice	Cortex, striatum	Murine genome U74Av2 Affymetrix microarrays
Borovecki	2005	human patient	Blood, brain	Affymetrix GeneChip U133A CodeLink Uniset Human I&II bioarrays
Morton	2005	R6/2 mice	Whole brain	Murine genome U74Av2 Affymetrix microarrays
Benn	2005	NES144 and R6/2 mice	Cerebellum	Murine genome U74Av2 Affymetrix microarrays
Hodges	2006	human patient	Caudate nucleus, cerebellum, prefrontal association cortex and motor cortex	Affymetrix GeneChip U133A&B

First author	Publication year	HD model	Tissue	Technology
Desplats	2006	R6/1 mice	Striatum	MOE430 2.0 Affymetrix arrays
Crocker	2006	R6/2 mice	Striatum	Mouse 15 K EST microarrays
Apostol	2006	PC12 rat cell line expressing first exon of HTT with 103 CAG	Rat pheochromocytoma	Affymetrix GeneChips U34A
Kuhn	2007	Human patient, R6/1, R6/2, CHL2 150Q, Hdh80Q, Hdh92Q, YAC128, HD46 mice	Human caudate, mouse striatum	Affymetrix GeneChip U133A&B (human samples), MG-U74Av2, 430 2.0 (mice samples)
Thomas	2008	R6/2 mice with 300 CAG	Cortex, striatum, cerebellum	Illumina Mouse Mouseref-8 Expression Beadchips v1
Becanovic	2010	YAC128	Striatum	Illumina Sentrix Mouse-6 sample BeadChip, Mouse Genome 430 2.0 Arrays Affymetrix

Une hypothèse séduisante pour expliquer les perturbations transcriptionnelles causées par la mut-HTT est la capture par la mut-HTT de facteurs de transcriptions à la fois sous forme soluble et sous forme d'agrégats. Cette explication semble crédible pour la CREB-Binding Protein (CBP) (Steffan, Kazantsev et al. 2000 ; Nucifora, Sasaki et al. 2001), la TATA box Binding Protein (TBP) (Suhr, Senut et al. 2001 ; van Roon-Mom, Reid et al. 2002 ; Schaffar, Breuer et al. 2004), SP1 (Dunah, Jeong et al. 2002 ; Li, Cheng et al. 2002)), TAFII130 (Dunah, Jeong et al. 2002), p53 (Steffan, Kazantsev et al. 2000) et NF-Y (Yamanaka, Miyazaki et al. 2008) voir Figure 16. Il s'agit là d'arguments renforçant l'importance de la dérégulation transcriptionnelle dans la mécanique pathologique de la MH. Néanmoins ces modifications ne donnent pas d'indication évidente sur la spécificité de la dysfonction neuronale ou de la neurodégénérescence. Il n'existe pas de spécificité tissulaire de la régulation de gènes par la mut-HTT pour la plupart des cas de gène dérégulé (Luthi-Carter, Hanson et al. 2002; Luthi-Carter, Strand et al. 2002). Il n'est pas certain que la formation d'agrégats joue un grand rôle dans les perturbations transcriptionnelles. Malgré une fréquence élevée d'inclusions, les neurones des souris R6/2 ne montrent aucune corrélation entre présence d'inclusion et modifications transcriptionnelles (Sadri-Vakili, Menon et al. 2006). Néanmoins de nombreux facteurs de transcription interagissent avec la mut-HTT. C'est le cas de TBP (Schaffar, Breuer et al. 2004), de CBP (CREB [Cyclic-Adenosine Monophosphate (cAMP) Response Element (CRE) Binding Protein]-Binding Protein

(Steffan, Kazantsev et al. 2000 ; Schaffar, Breuer et al. 2004)), de SP1 (Specific Protein-1) (Li, Cheng et al. 2002), et du facteur associé à TBP (TAF)II130 (Dunah, Jeong et al. 2002), interagissant tous directement avec la HTT mutante via le motif poly-Q. D'autres protéines nucléaires telles que le facteur pro-apoptotique P53 interagissent aussi avec la mut-HTT (Steffan, Kazantsev et al. 2000) via les motifs SH3 qui sont distants du motif poly-Q (Tobin and Signer 2000 ; Sugars and Rubinsztein 2003 ; Landles and Bates 2004). Le cas particulier de l'influence de la transcription régulée par SP1 ou le motif CRE sont bien décrits. Dans des conditions normales CBP (co-activateur de la voie de transcription contrôlée par CRE) est recruté par phosphorylation, liant CREB à la machinerie de transcription. CBP joue aussi un rôle d'ouverture de la chromatine favorisant la transcription via l'acétylation des histones (Sugars and Rubinsztein 2003). La disponibilité de la CBP est diminuée par la mut-HTT, inhibant l'acétylation des histones et la transcription contrôlée par CBP (Cong, Pepers et al. 2005 ; Jiang, Poirier et al. 2006). De plus, la transcription contrôlée par le motif CRE est régulée par TAFII130, élément du complexe de transcription de base (Sugars and Rubinsztein 2003) qui interagit de façon anormale avec la mut-HTT, ce qui perturbe la fonction du complexe de transcription (Dunah, Jeong et al. 2002). SP1 quant à elle est une protéine qui lie les motifs d'ADN riches en guanine/cytosine et régule la transcription via son motif activateur riche en glutamine capable d'interagir avec les composants du complexe transcriptionnel de base, comme TAFII130 (Sugars and Rubinsztein 2003). De même l'interaction anormale de SP1 et TAFII130 avec la mut-HTT inhibe la voie de transcription de SP1 (Dunah, Jeong et al. 2002 ; Li, Cheng et al. 2002). De plus, malgré le maintien d'un taux d'expression normal, la liaison de Sp1 à ses promoteurs cible est diminuée significativement à la fois dans les cerveaux des souris R6/2, dans les cellules STHdh111Q et dans les cerveaux de patients humains, ce qui suggère que la mut-HTT perturbe l'expression des gènes correspondants (Chen-Plotkin, Sadri-Vakili et al. 2006). Cet effet semble être renforcé par le clivage de la HTT et être inhibé *in vitro* par HSP40, une chaperonne diminuant l'agrégation des fragments N-terminaux de la mut-HTT (Cornett, Smith et al. 2006). La mutation peut aussi causer une perte de liaison avec un facteur de transcription ciblé par la HTT, comme c'est le cas pour le facteur de transcription liant NRSE. Dans ce cas particulier, l'incapacité de la mut-HTT de retenir REST/NRSF dans le cytoplasme augmente sa disponibilité au sein du noyau où il lie les séquences NRSE, favorisant une désacétylation locale, un remodelage vers l'hétérochromatine et une perte d'expression du BDNF chez les souris et les patients (Zuccato, Ciammola et al. 2001 ; Zuccato, Tartari et al. 2003). Comme cité plus haut, la perte d'expression du BDNF, à elle seule, cause une dégénérescence striatale chez la souris (Strand, Baquet et al. 2007), soulignant l'importance probable de ce mécanisme transcriptionnel lié à NRSF dans la MH. Récemment, il a été montré que l'expression de la mut-HTT diminue l'expression de PGC-1 $\alpha$  (Peroxisome Proliferator-activated Receptor- $\gamma$  Coactivator-1 $\alpha$ ) (Cui, Jeong et al. 2006 ; Weydt, Pineda et al. 2006), un co-activateur transcriptionnel qui régule différents processus métaboliques dont la respiration et la biogénèse mitochondriales, toutes deux diminués au sein des modèles et des patients atteints de la MH. De façon intéressante, les MSNs des souris HdhQ140 sous-expriment PGC-1 $\alpha$ , alors que les interneurons striataux épargnés par la neurodégénérescence le sur-expriment, et la surexpression de PGC-1 $\alpha$  dans les MSNs les protège de la neurodégénérescence (Cui, Jeong et al. 2006). L'expression de PGC-1 $\alpha$  semble donc jouer un rôle dans la spécificité de la neurodégénérescence au niveau du striatum. La

régulation de l'expression de PGC-1 $\alpha$  semble se faire via MSK1, un gène dont le Knock-out cause une dégénérescence striatale progressive et une plus grande sensibilité à l'acide 3-Nitropropionique qui est un toxique mitochondrial (Martin, Betuing et al. 2011). Par ailleurs, la mut-HTT perturbe l'expression de PGC-1 $\alpha$  et des Uncoupling Proteins (UCPs) au sein des adipocytes (Weydt, Pineda et al. 2006 ; Phan, Hickey et al. 2009), ce qui cause des perturbations de la thermogénèse et des anomalies métaboliques. Par ailleurs, l'expression de PGC-1 $\alpha$  est aussi perturbée dans les biopsies musculaires de souris N171-82Q et de patients atteints de la MH (Chaturvedi, Adihetty et al. 2009). D'autres perturbations transcriptionnelles indépendantes de PGC-1 $\alpha$  ont aussi été détectées. Les îlots de Langerhans des souris R6/2 expriment des niveaux réduits d'hormones (insuline, somatostatine et glucagon) (Hurlbert, Zhou et al. 1999 ; Andreassen, Dedeoglu et al. 2002 ; Bjorkqvist, Fex et al. 2005). La diminution de la production d'ARNm de l'insuline est progressive et corrélée à celle de l'expression de CBP, P300, PDX-1 et E2A, facteurs de transcription impliqués dans la transcription de l'insuline (Andreassen, Dedeoglu et al. 2002).

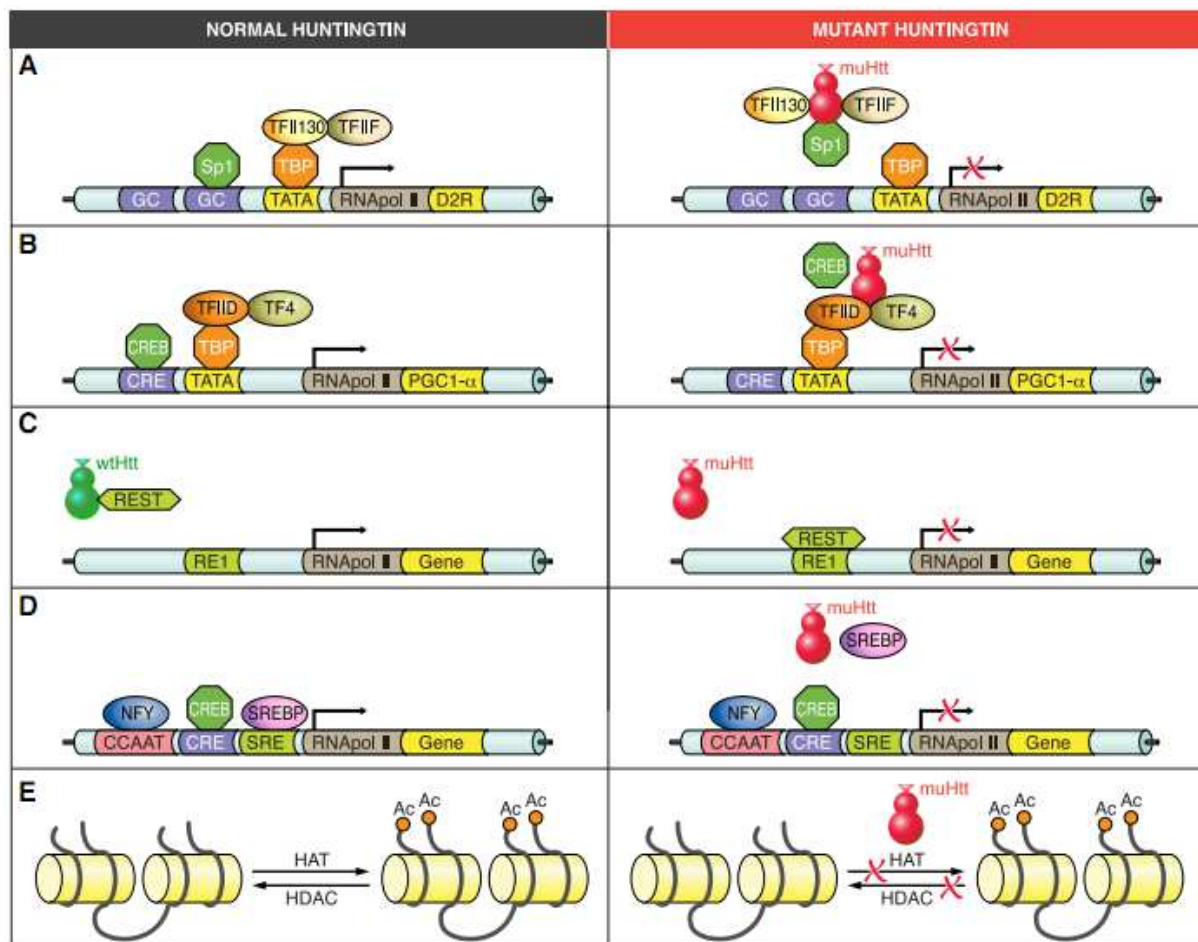


Figure 16 : Les différents mécanismes proposés pour les effets transcriptionnels de la HTT mutée (de (Zuccato, Valenza et al. 2010))

### e) Les stratégies thérapeutiques

Les mécanismes pathologiques déclenchés par la mut-HTT sont nombreux et il est important de déterminer lesquels correspondent à des phénomènes primaires directement impactés par la mutation et lesquels correspondent à des phénomènes secondaires. Logiquement, tout effort thérapeutique serait plus pertinent sur une cible « primaire » que sur une cible « secondaire ». Une cible « secondaire » est une cible de traitements symptomatiques, lesquels sont les bienvenus mais ne peuvent pas avoir un impact satisfaisant sur l'issue de la maladie. Il est donc important de décortiquer les mécanismes cellulaires et intercellulaires pour mieux identifier les cibles thérapeutiques potentielles pour la MH. Les efforts pour la recherche de biomarqueurs de la maladie sont donc justifiés par deux objectifs complémentaires. D'une part, un traitement pharmacologique ciblerait idéalement des patients pour lesquels la mort neuronale n'est pas ou que partiellement enclenchée et doit donc en l'absence de symptômes être évaluée par son effet sur un biomarqueur précoce associé à la mutation. Et d'autre part, obtenir un panel de biomarqueurs couvrant plusieurs mécanismes indépendant de la maladie permettrait d'évaluer si une cible thérapeutique est d'ordre « primaire » ou « secondaire ». A ce jour, la complexité des mécanismes pathologiques tels qu'ils sont compris fait que l'espoir d'un traitement unique est peu probable. Une combinaison d'approches thérapeutiques paraît nécessaire pour compenser les multiples effets de la mut-HTT. Un constat triste s'impose : les approches pharmacologiques pures ne peuvent s'appliquer aux malades pour lesquels la mort cellulaire est déjà importante, et donc potentiellement pour tous les malades symptomatiques. En conséquence, pour une grande partie des malades, un espoir important repose sur l'utilisation des cellules souches pluripotentes humaines, seule source actuellement capable de répondre durablement au besoin de greffons. Il est en effet difficilement envisageable de recruter chroniquement une neurogénèse endogène au striatum. Un espoir de remplacement neuronal ne peut vraisemblablement être adressé que par thérapie cellulaire, potentiellement sur la base de l'utilisation de cellules pluripotentes humaines, mais dont nous ne traiterons pas ici. L'ensemble des stratégies thérapeutiques en cours est rapporté Figure 17.

Pipeline	Basic Research	Preclinical	Phase I	Phase II	Phase III	Available
Targeting excitotoxicity						
Riluzole and memantine	=====					
Tetrabenazine	=====					
Strategies to increase BDNF						
Recombinant BDNF	=====					
BDNF gene therapy	=====					
BDNF-releasing cell grafts	=====					
BDNF mimetics	=====					
Diet and environment enrichment	=====					
BDNF inducers	=====					
Targeting caspases and huntingtin proteolysis						
Minocycline	=====					
Caspase 6 inhibitors	=====					
Targeting huntingtin aggregation and clearance						
Trehalose	=====					
C2-8	=====					
Drugs stimulating huntingtin clearance	=====					
Targeting mitochondrial dysfunction						
Creatine	=====					
Coenzyme Q10	=====					
Eicosapentaenoic acid (EPA)	=====					
Cysteamine	=====					
Targeting transcriptional dysregulation						
Sodium phenylbutyrate	=====					
HDACi 4b	=====					
Targeting mutant huntingtin						
RNA interference	=====					
Artificial peptides and intrabodies	=====					
Targeting cell loss						
Fetal cells	=====					
Embryonic/neural stem cells	=====					

Figure 17 : Les stratégies thérapeutiques en cours d'évaluation pour le traitement de la MH ( Zuccato, Valenza et al. 2010)

## **B. Modélisation**

### **1) Une variété de modèles**

La maladie de Huntington est une exception parmi les maladies rares car elle est identifiée depuis plus de cent trente ans (Huntington 2003). Comme toute maladie humaine et à cause de limitations éthiques évidentes, les études scientifiques ne sont réalisées directement sur les patients que dans le cadre clinique, portion congrue du processus scientifique. La majorité des études fait donc appel à un/des modèle(s) animaux et cellulaires de la maladie, pour des raisons méthodologiques et logistiques qui s'appliquent notamment aux échantillons cérébraux post-mortem. La conséquence directe est l'accumulation d'une grande variété de modèles : de la cellule de levure jusqu'au macaque transgénique, en passant par la drosophile.

#### **a) Les modèles animaux**

En pathologie et en génétique humaines, les modèles animaux occupent une place prépondérante. Dans le cas de la maladie de Huntington, la variété des modèles peut paraître surprenante (voir Tableau 4 pour les modèles murins) (Mangiarini, Sathasivam et al. 1996; Jackson, Salecker et al. 1998; Schilling, Becher et al. 1999; Wheeler, Auerbach et al. 1999; Steffan, Bodai et al. 2001; Slow, van Raamsdonk et al. 2003; von Horsten, Schmitt et al. 2003; Lee, Yoshihara et al. 2004; Slow, Graham et al. 2005; Gray, Shirasaki et al. 2008). La variété des modèles peut s'expliquer par trois facteurs. Tout d'abord, le caractère monogénique dominant de la MH qui permet d'établir un

modèle de la maladie par l'insertion unique d'un allèle muté dans un génome. Deuxièmement, les outils de la biologie moderne sont tous postérieurs aux premières études de la maladie, et donc graduellement pu être appliqué à l'étude de celle-ci. Enfin, chaque modèle présente avantages et inconvénients respectifs, ce qui fait que le dernier en date n'est pas nécessairement le plus adapté. Avant l'identification du gène codant la HTT, les modèles animaux étaient obtenus par l'injection de substances neurotoxiques dans le striatum, provoquant ainsi une mort cellulaire striatale qui simule la maladie. Les agonistes du glutamate comme les acides quinolinique (Beal, Kowall et al. 1986) et kainique (McGeer and McGeer 1976) ont été largement utilisés pour générer des modèles murins et de primates non humains de la maladie. Ils sont encore utilisés pour l'évaluation de thérapies cellulaires par greffe intra-striatale (Aubry, Bugi et al. 2008). Il s'agit là d'un argument fondateur de l'implication de l'excitotoxicité dans la maladie. De la même façon, les toxines mitochondriales comme les acides malonique et tri-nitropropionique (Palfi, Ferrante et al. 1996) récapitulent les lésions pathologiques striatales et impliquent des dysfonctionnement mitochondriaux dans la maladie. L'identification du gène responsable de la maladie (Huntington's Disease Collaborative Research Group, (1993)) a permis de développer des modèles animaux reproduisant plus fidèlement la maladie. Les différents modèles accessibles ne permettent pas de répondre aux mêmes questions. Il est évident qu'une étude comportementale ne se satisfera pas d'un modèle issu de *Caenorhabditis Elegans*. Il est en revanche moins évident d'évaluer la pertinence d'un modèle murin pour l'étude des interactions protéiques de la HTT. En effet le nombre de répétitions au sein de la HTT murine est de l'ordre de 7-8 répétitions (Barnes, Duyao et al. 1994) pour dix à 29 répétitions pour un allèle normal de la HTT humaine, avec une fréquence maximale vers 17-19 répétitions (Kremer, Goldberg et al. 1994). Les interactions protéiques de la HTT sont en partie contrôlées par le motif polyglutamine (Bao, Sharp et al. 1996). Il est donc raisonnable de penser que les résultats murins ne sont pas directement transposables à l'humain, puisque la HTT de souris porte naturellement une séquence CAG plus courte que l'Homme. Pour autant, la confirmation d'interactants de la HTT mis en évidence par double hybride (cDNAs humains) au sein de *Saccharomyces cerevisiae* (qui n'a pas d'homologue de la HTT endogène) a été réalisé avec un taux très élevé de confirmation (48/60) par crible phénotypique au sein de *Drosophila Melanogaster*. L'expression des homologues de drosophile des interactants modifie au sein du modèle la toxicité du premier exon de la HTT humaine portant 128 répétitions CAG (Kaltenbach, Romero et al. 2007). Il est intéressant de noter que l'homologue de la HTT chez la drosophile ne présente pas de répétition CAG (Li, Karlovich et al. 1999). Il n'y a donc pas de critère non trivial et absolu pour évaluer la pertinence d'un modèle. Seule la reproductibilité des résultats entre modèles et ultimement la recherche de confirmation au sein des patients est pertinente scientifiquement.



Tableau 4 : Modèles murins, modifié de (Zuccato, Valenza et al. 2010)

	R6/1 (Mangiarini et al.)	R6/2 (Mangiarini et al.)	N171-82Q (Schilling et al.)	YAC128 (Slow et al.)	BACHD (Gray et al.)	Transgenic HD rat (Von Horsten et al.)	Hdhq92-111 (Wheeler et al.)	Hdhq140 (Menalled et al.)	Hdh(CAG)150 (Lin et al.)
<i>Caractéristiques générales</i>									
Animal	Souris transgénique	Souris transgénique	Souris transgénique	Souris transgénique	Souris transgénique	Rat transgénique	Souris Knock-in	Souris Knock-in	Souris Knock-in
Construction	Fragment de 1,9 kb en 5' de la HTT humaine	Fragment de 1,9 kb en 5' de la HTT humaine	171 premiers acides aminés de la HTT humaine	Chromosome artificiel de levure exprimant la HTT humaine totale	Chromosome artificiel bactérien exprimant la HTT humaine totale	Fragment de 1,9 kb en 5' de la HTT de rat	Remplacement de l'exon 1 de la <i>Hdh</i> par celui de la <i>HTT</i>	Séquence CAG insérée dans <i>Hdh</i>	Séquence CAG insérée dans <i>Hdh</i>
Promoteur	Htt humaine	Htt humaine	Prion de souris	Htt humaine	Htt humaine	Htt rat	Htt souris	Htt souris	Htt souris
CAG	113	144	82	128	97	51	92-111	140	150
Déclaration des symptômes	15 à 21 semaines	5 à 6 semaines	10 semaines	8 à 12 semaines	3 à 6 mois	9 à 12 mois	22 mois	12 mois	4 mois
Espérance de vie	32 à 40 semaines	12 à 15 semaines	10 à 24 semaines	Normal	Normal	98 semaines	Normal	Normal	Normal

	R6/1 (Mangiarini et al.)	R6/2 (Mangiarini et al.)	N171-82Q (Schilling et al.)	YAC128 (Slow et al.)	BACHD (Gray et al.)	Transgenic HD rat (Von Horsten et al.)	Hdhq92-111 (Wheeler et al.)	Hdhq140 (Menalled et al.)	Hdh(CAG)150 (Lin et al.)
<i>Neuropathologie</i>									
Pathologie cellulaire	Inclusions nucléaires et agrégats neuritiques dans tout le CNS	Inclusions nucléaires et agrégats neuritiques dans tout le CNS	Inclusions nucléaires dans le cortex, l'hippocampe, les amygdales, et le striatum	Agrégats striataux, pas d'inclusions nucléaires	Agrégats neuritiques rares dans le cortex et le striatum (10 à 16 mois)	Inclusions nucléaires et agrégats neuritiques dans le striatum, rares dans le cortex (16 mois)	Inclusions nucléaires et agrégats neuritiques dans le striatum (15 mois)	Inclusions nucléaires et agrégats neuritiques dans le striatum, le cortex, l'hippocampe, et le cervelet (16 à 24 semaines)	Inclusion nucléaires dans le striatum (8 mois)
Atrophie cérébrale	Atrophie cérébrale globale, baisse du volume cérébral	Atrophie cérébrale globale, baisse du volume cérébral (44% à 12 semaines)	Atrophie cérébrale globale	Baisse du volume cortical (7-9%) et striatal (10-15%) à 11 mois	Atrophie cérébrale globale, baisse du volume cortical et striatal	Augmentation de volume des ventricules latéraux lésion focales dans le striatum	Pas d'atrophie constatée	Pas d'atrophie constatée	Pas d'information
Mort cellulaire	Pas de preuve de mort cellulaire massive	Pas de preuve de mort cellulaire massive	Pas d'information	Diminution du nombre de neurones striataux (9.1%) et corticaux (8.3%) à 11 mois	Pas d'information	Pas de perte cellulaire significative	Pas de mort observée	Pas de mort observée	Pas d'information
Dysfonction neuronale	Plasticité synaptique aberrante	Plasticité synaptique aberrante	Gliose réactionnelle, cellules avec une morphologie dégénérative à 20 semaines (toluidine)	Suractivation des récepteurs NMDA, AMPA, mglur1 et II.	Dégénérescence et accumulation de fuscine : neurones striataux (14%)	Baisse du métabolisme glucidique cérébral	3.5% de cellules avec une morphologie dégénérative (toluidine)	Pas d'information	Dysfonction cellulaire révélée par des inclusions sombres et des vacuoles cytoplasmiques
	Baisse d'expression des récepteurs D1-D2, mglur1 et II, et CB1	Baisse d'expression des récepteurs D1-D2, mglurII, AMPA, kainate et A <sub>2A</sub>			Baisse de l'excitabilité contrôlée par les récepteurs AMPA		Gliose striatale		Dégénération axonale

R6/1 (Mangiarini et al.)	R6/2 (Mangiarini et al.)	N171-82Q (Schilling et al.)	YAC128 (Slow et al.)	BACHD (Gray et al.)	Transgenic HD rat (Von Horsten et al.)	Hdhq92-111 (Wheeler et al.)	Hdhq140 (Menalled et al.)	Hdh(CAG)150 (Lin et al.)
-----------------------------	-----------------------------	--------------------------------	----------------------	---------------------	--	-----------------------------	---------------------------	--------------------------

*Symptômes*

Moteurs	Crispation des pattes (à 20 semaines)	Crispation des pattes (à 20 semaines)	Crispation des pattes (à 15 semaines)	Crispation des pattes	Pas de crispation des pattes	Perte progressive de coordination et de l'équilibre	Pas de crispation des pattes	Perte de l'activité locomotrice	Crispation des pattes
		Déficit au test Rotarod (5 semaines)	Déficit au test Rotarod (15 semaines)	Déficit au test Rotarod (24 semaines)		Déficit au test Rotarod (2 ans)			
		Hyperkinèse	Hypokinèse	Hyperkinèse (12 semaines)					
	Déficit au test Rotarod	Tremblement au repos	Tremblement au repos	Hypokinèse (24 semaines)	Déficit au test Rotarod (dès 8 semaines, plateau à 24 semaines)	Dyskinésie capitale	Pas de déficit au test Rotarod	Hyperactivité et hypoactivité	Hypoactivité
		Description de cercles	Anomalies de la démarche associées à des tremblements	Anomalie de la démarche					
	Anomalie de la démarche	Baisse de la poigne	Perte de coordination	Description de cercles	Ataxie	Anomalie de la démarche	Anomalie de la démarche	Anomalie de la démarche	
	Faiblesse musculaire								
Cognitifs	Diminution de l'anxiété	Rigidité cognitive	Rigidité cognitive	Comportements dépressifs (12 semaines)	Pas d'information	Diminution de l'anxiété, déclin émotionnel et cognitif	Pas de symptômes	Pas de symptômes	Pas de symptômes
		Augmentation de l'exploration à quatre semaines qui décline et disparaît à 8.5 semaines	Déficit de la mémoire de travail						
Autres	Perte de poids progressive	Perte de poids progressive	Perte de poids progressive	Prise de poids	Prise de poids	Perte de poids	Pas d'anomalie pondérale	Pas d'anomalie pondérale	Petite taille
		Crises d'épilepsie, diabète, et problèmes cardiaques							

## b) Les modèles cellulaires

La culture cellulaire a aujourd'hui une histoire presque aussi longue que celle de la maladie de Huntington. Les premiers travaux sur le cœur ex-vivo réalisés par le physiologiste Sydney Ringer, à l'origine de la base osmotique des milieux de culture modernes, datent de 1882 (Ringer and Sainsbury 1882; Ringer and Buxton 1885) soit dix ans après la publication, en 1872 d'«On Chorea» de Sir Huntington (Huntington 2003). Les travaux de Ross Grandville Harrison ont posé dès 1907 les bases méthodologiques de la culture cellulaire de neurones (Gahwiler 1999). Comme pour les modèles animaux, une grande variété de modèles cellulaires a été utilisée pour l'étude de la maladie de Huntington. Outre les COS (cellules immortalisées de singe vert), HeLa (cellules de cancer de col utérin humain) et hEK (cellules rénales embryonnaires humaines immortalisées) classiquement utilisées, un effort important a été fait pour la modélisation cellulaire de la maladie de Huntington. Ces études ont permis de mettre en évidence de nouveaux mécanismes ou de remettre en cause certaines idées à propos de la maladie. Le plus simple des modèles est celui de la levure (*Saccharomyces cerevisiae*) où la surexpression d'un transgène codant pour l'exon1 de la HTT (103Q) induit une toxicité cellulaire, en reproduisant l'agrégation cytoplasmique de fragments N-terminaux de la HTT (Krobitsch and Lindquist 2000; Meriin, Zhang et al. 2002). Les cellules de phéochromocytome de rat (PC12) sont des cellules capables de différenciation neuronale utilisées en modélisation neuronale (Greene and Tischler 1976). Différents modèles de la maladie de Huntington ont été générés à l'aide de ces cellules, reproduisant la toxicité cellulaire détectable chez la levure (Igarashi, Morita et al. 2003) ou des altérations plus fines des voies de signalisations cellulaires (Song, Perides et al. 2002; Sugars, Brown et al. 2004). Des cultures primaires de neurones striaux de souris exprimant les 480 premiers acides aminés de la HTT humaine (68Q) ont montré que les inhibiteurs de l'apoptose bloquaient la mort neuronale et révélé que la formation des inclusions n'était pas corrélée avec la mort cellulaire (Saudou, Finkbeiner et al. 1998). Une lignée de cellules striatales embryonnaires immortalisées de rat (ST14A) capable de se différencier en neurones a permis notamment de positionner l'action anti-apoptotique de la HTT en aval de BCL-2 et en amont des Caspases-3/7 (Cattaneo and Conti 1998), ce qui a été confirmé par la perte de fonction HTT au sein de cellules issues de neuroblastome murin (Zhang, Leavitt et al. 2006). A partir d'un modèle de souris knock-in (Wheeler, Auerbach et al. 1999), des lignées de cellules striatales homozygotes Hdh<sup>111Q</sup>/Hdh<sup>111Q</sup> immortalisées ont été dérivées, mettant en évidence un effet de la mutation sur la localisation intracellulaire de la HTT (Cattaneo and Conti 1998; Trettel, Rigamonti et al. 2000). L'étude de lymphoblastes issus de patients a révélé une activation caspasique chez les patients hétérozygotes et une exacerbation de ce phénomène chez les rares patients homozygotes (Sawa, Wiegand et al. 1999; Maglione, Cannella et al. 2006). Par ailleurs, ces mêmes cultures ont permis de mettre en évidence une altération de la structure du réseau mitochondrial chez les patients atteints de la maladie de Huntington (Squitieri, Cannella et al. 2006). Les fibroblastes de patients ont aussi été utilisés pour étudier des effets métaboliques globaux de la maladie (Valenza, Rigamonti et al. 2005). Nous verrons par ailleurs que les cultures issues de patients, et les fibroblastes en particulier peuvent potentiellement donner accès à des modèles cellulaires prometteurs. La culture de lymphoblastes et de fibroblastes de patients nous rapproche de l'utilisation des tissus humains, source d'informations précieuse pour la modélisation de la maladie.

### **c) Les tissus humains**

Il existe deux catégories de tissus humains historiquement accessibles pour la modélisation de la maladie. La première catégorie a été évoquée précédemment et concerne les tissus qui peuvent être échantillonnés sans dommage sur un patient atteint de la MH. Il est ainsi possible d'obtenir aisément des lymphoblastes à partir d'une simple prise de sang. Ces lymphoblastes peuvent être cultivés en suspension ex-vivo pour diverses applications de recherche. Il est aussi envisageable, à partir d'une simple biopsie de peau de dériver des cultures de fibroblastes de patients. Le principal avantage de ces approches est l'accès aux informations cliniques du patient, corrélables avec les résultats expérimentaux. Le principal impact de la maladie étant de nature neurale, le principal désavantage reste donc le phénotype cellulaire non neural. De plus, il a été démontré que les allèles présentent une instabilité somatique, tendant à augmenter la taille des répétitions CAG génomiques du patient, au sein notamment des tissus neuraux (Ishiguro, Yamada et al. 2001). En conséquence, les fibroblastes ne reflètent pas exactement le contexte allélique des cellules touchées. Les informations qui peuvent être obtenues à partir de ces modèles sont évidemment incomplètes. Malgré l'apparition récente de modèles humains plus versatiles à partir de la même ressource cellulaire (Takahashi and Yamanaka 2006), ces modèles cellulaires gardent un intérêt pour la recherche de biomarqueurs de la maladie à des fins de diagnostic et de suivi thérapeutique. La seconde catégorie concerne les échantillons post-mortem. Ce n'est évidemment qu'à la mort du patient que l'accès aux tissus les plus affectés peut être envisagé, dans le cadre d'un don à la science (Kapp 2006). De tels échantillons sont précieux pour la validation des données mises en lumière par l'étude des différents modèles. Pour les mêmes raisons que citées précédemment, l'amplification des répétitions CAG et la mort cellulaire massive au sein des tissus touchés apportent une source de variabilité au sein même de ces tissus. Nous verrons qu'il existe aujourd'hui des modèles cellulaires analogues aux cultures cellulaires issus de patients en terme de pertinence génétique.

### **d) La versatilité des modèles**

Les différents modèles cellulaires disponibles sont adaptés à des études biochimiques. Ils ont de fait été largement utilisés pour mieux comprendre les propriétés biochimiques de la HTT : l'agrégation, les interactions protéines-protéines, l'impact sur les voies de signalisation intracellulaires, et les effets transcriptionnels. La culture cellulaire donne accès à un substrat expérimental homogène nécessaire pour les expériences de biochimie. Les modèles animaux peuvent aussi être employés dans ce contexte, cependant leur force réside plus dans l'accès à des mécanismes plus intégrés de la maladie comme les effets intercellulaires et tissulaires.

L'accès aux technologies de criblage à haut débit de petites molécules n'est évidemment envisageable que dans ce cadre. Les modèles cellulaires reproduisent des manifestations moléculaires pathologiques dont la pertinence doit être vérifiée. Cependant, ils donnent accès à la lecture rapide et simplifiée de phénotypes liés à la mutation, des "biomarqueurs" de la maladie. Ces biomarqueurs peuvent ensuite être utilisés dans le développement d'un test à l'échelle cellulaire qui permette de quantifier un caractère pathologique. Le développement d'un tel test capable de satisfaire aux exigences techniques du criblage, est un objectif important, sur le long terme, de mon travail de thèse. Les modèles cellulaires sont adaptés pour détailler les mécanismes moléculaires de la maladie,

notamment grâce à la relative facilité avec laquelle ils peuvent être modifiés génétiquement. Le principal avantage d'un modèle sur le patient, outre sa disponibilité pour conduire des expériences à proprement parler, est la possibilité de modification génétique. L'ensemble des modèles est aujourd'hui modifiable génétiquement, en particulier grâce à la technologie récente de l'interférence ARN. Certains modèles profitent par ailleurs d'une « boîte à outils » génétique particulièrement bien fournie. C'est le cas de la Drosophile, au sein de laquelle l'étude de l'implication d'un gène dans les mécanismes pathologiques est grandement facilitée. Les modèles cellulaires présentent les temps de réponse les plus courts pour la modification génétique. L'avènement du clonage *in silico* devrait encore renforcer la réactivité des approches cellulaires. La compression des délais entre identification d'un mécanisme pathologique et développement d'une modification génétique devrait singulièrement accélérer l'étude des mécanismes pathologiques. Un autre avantage important des petits modèles tels que la drosophile est le débit des analyses qui peuvent être menées. Le développement de la biologie moléculaire permet aujourd'hui de réaliser des cribles génétiques (sur la base de l'interférence ARN) dans des conditions similaires aux cribles moléculaires qui permettent de faire à l'échelle du génome une analyse des gènes modificateurs d'un biomarqueur. La maladie de Huntington est une maladie à déclaration tardive (Huntington 2003) ; les modèles de la maladie permettent d'en étudier les mécanismes dans des intervalles de temps compatibles avec l'expérience (voir Tableau 4). Les altérations mises en évidence chez les patients sont des altérations tardives. Il est évident que la science progresse en utilisant des modèles versatiles dont on doit vérifier les prédictions. Les modèles présentent l'avantage de pouvoir être transmis entre laboratoires à travers le monde pour permettre de mener en parallèle un grand nombre d'études indépendamment du nombre de patients affectés. Cette réalité a fait la force de la recherche sur la maladie de Huntington, et malgré un nombre restreint de patients (6000 cas symptomatiques en France), a permis à une quantité importante d'équipes de mener des recherches sur le sujet, et dont les découvertes ont rejailli bien au-delà du cadre de la pathologie. Enfin, les modèles permettent de conjuguer pour une même maladie des approches très diverses, à même de donner des informations complémentaires et dont les points de vues s'enrichissent mutuellement. Tout résultat, fut-il une incohérence entre modèles est une information exploitable à la fois pour une meilleure compréhension de la maladie mais aussi en dehors de son cadre, dans la construction globale de la connaissance scientifique. Les modèles animaux sont bien évidemment les seuls à offrir l'accès aux études comportementales et sont d'inévitables maillons des études cliniques. Les études comportementales, bien que complexes et plus délicates à interpréter que les résultats moléculaires sont pour une maladie neurale une étape inévitable du chemin qui mène du modèle à l'Homme.

## 2) Les limites de la modélisation

### a) La variabilité interspécifique

Les modèles animaux représentent des outils très intéressants pour la modélisation de la maladie. Les possibilités expérimentales sont de façon évidente supérieure à celles offertes par les patients. Ainsi, beaucoup de mécanismes pathologiques ont été mis en lumière grâce aux modèles animaux et cellulaires dérivés des animaux, puis secondairement confirmés au sein des patients. Néanmoins bien que la HTT représente une protéine exceptionnellement conservée au cours de l'évolution, il existe des variations entre espèces. Par exemple, la HTT de souris ne présente que sept répétitions CAG contre 18 en moyenne chez l'Homme. La séparation évolutive entre la souris et l'Homme est estimée entre 75 et 125 millions d'années, celle de la drosophile et de l'Homme à 580 millions d'années. En conséquence, le passage d'un modèle à un autre est sujet à caution. Les modèles non humains sont donc une source irremplaçable d'informations. Ces informations ont cependant tout intérêt à être confirmées dans un contexte humain. En effet, la divergence évolutive entre les modèles et l'Homme peut être à l'origine de variations importantes dans le contexte de la maladie. C'est le cas du nombre de répétitions CAG : en moyenne de 18 dans un allèle normal humain et de huit dans un allèle normal de souris.

### b) La variabilité intraspécifique

La variabilité intrinsèque des modèles, quels qu'ils soient, est une source de variabilité qui doit être prise en compte dans tout effort de modélisation ou thérapeutique. Au-delà des nombreuses études faites sur les gènes modificateurs liés à la MH, il faut savoir qu'il existe chez un individu normal entre 30 et 50 délétions hétérozygotes euchromatiques portant sur plus de cinq kilobases chacune (Conrad, Andrews et al. 2006; Conrad, Jakobsson et al. 2006). Il faut donc noter que les échantillons de patients, si précieux soient-ils, ne sont pas une panacée puisqu'il existe une variabilité inter-individuelle importante. En effet, la majorité des tissus correspondent à des stades avancés de la maladie. La neurodégénérescence touche dans les premières étapes de la maladie les neurones moyens épineux du striatum (MSNs) (Vonsattel, Myers et al. 1985) puis se généralise secondairement au néocortex (Rosas, Koroshetz et al. 2003). Les échantillons de patients peuvent donc refléter des mécanismes pathologiques avancés (tels que les effets tissulaires de la mort neuronale), qui ne sont pas nécessairement cohérents avec des phases plus précoces. L'accès à des stades plus précoces n'a lieu qu'en cas de mort accidentelle, non directement liée à la maladie du patient. En conséquence, les échantillons disponibles sont très biaisés vers des tissus très altérés. Leur comparaison avec des échantillons post-mortem de personnes non atteintes n'est pas évidente. La simple dissection des tissus est une source probable de variation, étant donné l'impact structurel de la neurodégénérescence et la variabilité inter-patient (Bakay, Chen et al. 2002). Ainsi toute approche de modélisation pathologique se doit de s'appuyer sur plusieurs modèles indépendants de façon à relativiser l'influence des variations interindividuelles sur les expériences réalisées. De plus comme vu précédemment, l'amplification somatique des CAG fait que, même à l'échelle du tissu d'un patient, les cellules ne sont pas équivalentes pour le déterminant principal de la maladie, à savoir le nombre de répétitions CAG. Dans le cadre d'une étude transcriptomique l'homogénéité doit être la plus grande

possible pour que les variations soient détectables de façon robuste, et ce raisonnement s'étend bien sûr partiellement à toute autre technique étudiant des populations de cellules. Paradoxalement les patients eux même ne sont pas nécessairement le cadre idéal pour l'étude des différents mécanismes de la maladie. Même si une méthode non invasive est disponible, la variabilité au sein même des patients (expansion somatique, niveau variable de neurodégénérescence) limite les conclusions qui peuvent être tirées.

### **c) La stœchiométrie allélique**

La MH est une maladie autosomale dominante rare donc la plupart des patients sont hétérozygotes. Néanmoins, les rares patients homozygotes montrent une aggravation du phénotype. Il semble donc probable que le niveau d'expression de la mut-HTT ou l'équilibre entre allèle mutant et sauvage jouent un rôle dans les mécanismes moléculaires de la MH. Les modèles transgéniques simples ne permettent pas d'obtenir une expression de la HTT respectant cette stœchiométrie et l'analyse des données obtenues à l'aide de ceux-ci doit être faite en considérant le déséquilibre d'expression. Les modèles de Knock-in ne présentent pas ce problème et permettent d'ailleurs d'analyser l'impact du statut homozygote ou hétérozygote sur la MH.

### **d) Instabilité génétique**

La mitose est très efficacement contrôlée et malgré des taux d'erreurs natifs faibles (60 000 erreurs par mitose, sur 3 500 000 000 paires de base), des systèmes de réparation extrêmement efficaces amènent l'ordre de grandeur des taux de mutation à 1 par mitose (Korona, Lecompte et al. 2011). Néanmoins, la culture des cellules *in vitro* est sujette à l'accumulation d'erreurs, les taux de mutations ponctuelles, si conservateurs soient-ils ne reflètent pas la stabilité globale de l'information génétique, sujette à des remaniements à plus grande échelle, pour lesquels l'évaluation des taux de mutation est plus délicat. Par ailleurs, la culture n'est pas soumise au contrôle constant effectué dans le corps par le système immunitaire et les systèmes de contrôle n'ont pas évolué dans ce contexte. Les taux d'erreurs sont bas, mais la culture concerne des populations importantes de cellules : en conséquence, la culture de cellules souches embryonnaires sur 20 passages, à raison d'au moins trois doublements par passage, donne le calcul suivant pour une population d'un million de cellules en supposant le taux d'une erreur par mitose : chaque paire de bases a 2% de chance d'avoir été mutée au moins une fois dans la population. Croisé avec le raisonnement selon lequel rien n'empêche en culture un avantage de prolifération d'être sélectionné au cours du temps, il paraît évident qu'un contrôle des caractéristiques génomiques des cultures de cellules est nécessaire pour éviter de travailler sur des artéfacts. Nous verrons que dans nos mains, les modèles cellulaires sont sujets à une culture sur une longue durée qui peut être corrélée à l'apparition d'altérations chromosomiques non aléatoires.



#### **e) Une précaution simple**

Pour s'affranchir des risques inhérents à la modélisation, la stratégie la plus simple est de chercher à confirmer les résultats à l'aide d'outils moléculaires comme le gain et la perte de fonction, à l'aide de réplicats biologiques indépendants (lignées indépendantes dans le cas de la culture cellulaire), et de façon plus puissante encore par l'utilisation de modèles alternatifs tels que les échantillons de malades.

## II. Les hESC : un outil au service de la médecine

### A. Les cellules souches

La notion de cellule souche (CS) est une notion qui remonte au moins à 1883 (Rey 2003). La vision moderne de la cellule souche est simple, elle repose sur deux qualités : premièrement : la capacité d'auto-renouvellement, c'est-à-dire que chaque mitose génère au moins une cellule ayant les mêmes caractéristiques que la cellule mère (le cycle peut cependant être associé à une phase de quiescence), deuxièmement : la capacité de donner naissance via le processus de différenciation à un phénotype cellulaire dit « différencié » (Kieślinski & Anderson : *The Stemness in Stem Cells*, 2003). Cette notion est au cœur du développement au sens large qui génère un organisme pluricellulaire organisé à partir d'une seule cellule. Chez l'adulte les cellules souches participent à l'homéostasie cellulaire. Leur perte, même partielle, peut avoir des conséquences désastreuses.

#### 1) Un concept, des réalités

##### a) La variété des cellules souches

Il existe différents types cellulaires qui rentrent dans le cadre de cette définition. Les cellules souches peuvent être classées selon leur potentiel de différenciation en trois catégories, qui correspondent à trois étapes développementales (Figure 18). Après la fécondation, et jusqu'au stade morula (16 cellules, trois jours après fécondation), les cellules de l'organisme ont la capacité de se différencier dans tous les types cellulaires embryonnaires et extra-embryonnaires, et sont donc totipotentes. Au stade blastocyste (32 cellules, quatre jours après fécondation), l'embryon n'est plus homogène, et seule la masse cellulaire interne formera l'embryon *sensus stricto* (le trophoblaste formera les annexes extra-embryonnaires). Les cellules qui la composent sont pluripotentes, c'est-à-dire capable de donner tous les tissus embryonnaires somatiques et germinaux. Les tissus extra-embryonnaires sont issus du trophoblaste (cellules en jaune, Figure 18). Au cours de la gastrulation, les cellules de la masse interne se différencient vers l'un des trois feuillets embryonnaires (ectoderme, mésoderme et endoderme) ou participent à la lignée germinale. Les cellules capables de donner plus de quatre types cellulaires différents sont alors qualifiées de multipotentes. Il existe des distinctions de rang inférieur : tripotence (cellules souches chondro-ostéogéniques : (Owen and Friedenstein 1988 ; Caplan, Elyaderani et al. 1997; Prockop 1997 ), bipotence (cellules souches du bulbe pileux : (Ohyama, Vogel et al. 2007)) et unipotence (cellules de la crypte intestinale (Barker, van de Wetering et al. 2008)). De telles cellules souches sont présentes chez les mammifères adultes au sein des différents tissus. Par exemple, les cellules souches neurales (NSC) peuvent être dérivées chez la souris à l'âge adulte à partir de la zone péri-ventriculaire adulte (Reynolds and Weiss 1992) et l'humain (Kukekov, Laywell et al. 1999 ; Sanai, Tramontin et al. 2004). *In vivo*, Les cellules souches sont dépendantes de signaux particuliers pour le maintien de leurs caractéristiques. Des signaux maintenant les cellules souches sont fournis par ce que l'on appelle la niche, un environnement particulier souvent réalisé par une unité anatomique (comme la zone sous ventriculaire dans le cas des NSC). Elles sont fonctionnellement instables puisqu'elles sont capables de différenciation. *In vitro*, les NSC sont capables de se renouveler en présence des cytokines EGF et/ou FGF2. En l'absence de ces

cytokines, elles sont capables de se différencier dans les lignages neuronaux et gliaux (Ma, Bonaguidi et al. 2009). Ces caractéristiques très intéressantes pour l'étude de la MH.

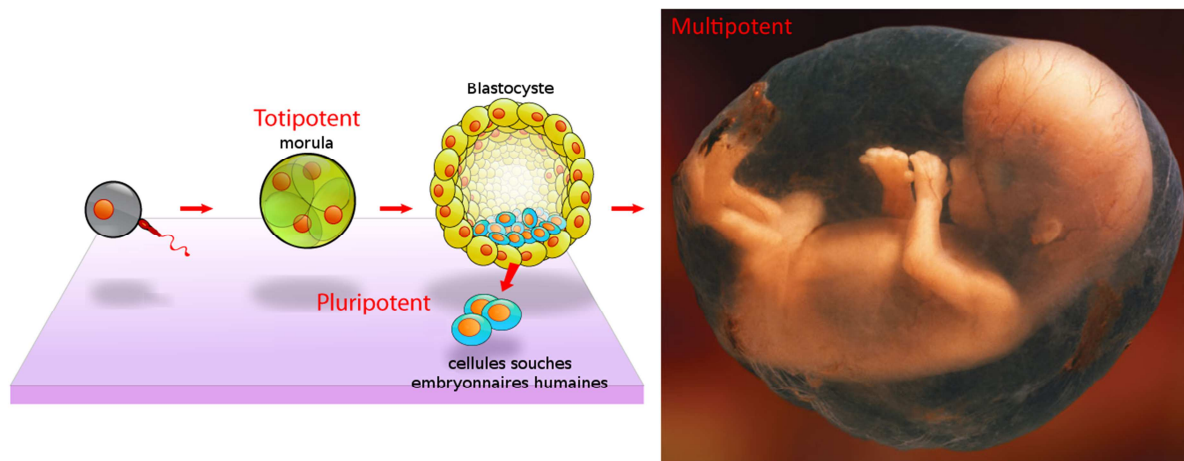


Figure 18 : Capacité de différenciation des cellules souches au cours du développement de l'Homme

### b) Les cellules souches pluripotentes

Le concept de pluripotence est né de l'observation de tumeurs malignes des gamètes. Les tératocarcinomes reproduisent des structures tissulaires appartenant aux trois feuillets embryonnaires malgré une origine cellulaire unique. Les cellules indifférenciées à l'origine du développement des tératocarcinomes chez la souris ont été identifiées il y a plus de 45 ans (Kleinsmith and Pierce 1964) et rapidement isolées et cultivées (Pierce, Stevens et al. 1967). Ces cellules carcinomales embryonnaires peuvent même participer à l'ontogénèse murine (à l'exception des gamètes) et ont la particularité de perdre leur caractère malin au cours de la différenciation (Martin, Cooperman et al. 1980). Il existe aujourd'hui deux types de cellules souches humaines pluripotentes : les cellules souches embryonnaires (hES) issues de la masse interne du blastocyste et les cellules induites à la pluripotence (iPS) obtenue à partir de cellules différenciées. En 1981, la dérivation de lignées de cellules souches à partir de la masse interne du blastocyste de souris a étendu le concept de pluripotence à une entité physiologique manipulable en laboratoire (Evans and Kaufman 1981 ; Martin 1981). Il faudra encore 17 ans pour que l'équipe de J. Thomson réussisse à isoler et maintenir en culture leur équivalent humain, les hESC (Thomson, Itskovitz-Eldor et al. 1998). Le processus d'isolation de lignée de hESC est aujourd'hui bien maîtrisé et réalisé avec des embryons de 5,5 à 7,5 jours post-fécondation non implantés lors de fécondations *in vitro*. Dans le cas de certaines maladies génétiques graves pour lesquelles il n'existe pas de traitement, le diagnostic préimplantatoire est autorisé par la loi de bioéthique. La MH fait partie de ces exceptions. Les embryons porteurs de la MH ne sont pas implantés et sont généralement détruits. Alternativement à leur destruction il est possible dans le cadre d'un don à la science d'utiliser ces embryons afin de dériver des lignées hESC porteuses de la mutation causale de la maladie. Ces lignées sont un outil précieux pour la modélisation pathologique de la MH. Il est aujourd'hui possible d'étendre cette stratégie aux maladies pour lesquelles il n'y a pas de possibilité de diagnostic préimplantatoire. Les lignées d'iPS ont pu être établies chez la souris (Takahashi and Yamanaka 2006) puis chez l'Homme (Takahashi, Tanabe et al. 2007) grâce à l'exploitation des connaissances obtenues à l'aide des cellules souches embryonnaires, notamment l'identification des gènes « maîtres » de l'état pluripotent.

## 2) Les cellules souches embryonnaires humaines

Les cellules souches embryonnaires humaines correspondent à un type cellulaire présent de façon très transitoire au sein de l'embryon humain. Les divisions complètes et symétriques du zygote donnent naissance à la morula en quatre à cinq jours. Les cellules de la morula précoce, appelées blastomères sont alors toutes équivalentes en taille et en capacité de différenciation. La structure en forme de petite mûre subit une compaction à l'issue de laquelle les blastomères externes et les blastomères internes sont déterminés et perdent leur totipotence. Il y a réorganisation en blastocyste, stade d'implantation dans la muqueuse utérine. L'embryon se creuse d'une cavité, le blastocœle et les blastomères externes forment le trophoblaste, à l'origine des annexes extra-embryonnaires. Les blastomères internes forment une petite masse de cellules appelée la masse cellulaire interne (MCI) qui donnera l'ensemble des tissus du corps et qui peut être mise en culture entre 5,5 jours et 7,5 jours post-fécondation. Le processus qui consiste à isoler les cellules souches embryonnaires à partir de la MCI afin d'établir une lignée cellulaire stable est appelé dérivation. Ce processus a été décrit simultanément pour la première fois chez la souris en 1981 par deux équipes indépendantes, l'une britannique dirigée par Sir Martin John Evans (Prix Nobel de Médecine et de Physiologie en 2007) et Matthew H. Kaufman à l'Université de Cambridge et l'autre américaine dirigée par Gail R. Martin à l'Université de San Francisco. Ce n'est que 14 ans plus tard, que la première lignée de cellules souches embryonnaires de primate (la lignée R278.5) fut établie par le groupe de James A. Thomson, à partir d'un blastocyste mâle de singe rhésus, au sein du Genome Center of Wisconsin (Thomson, Kalishman et al. 1995). Les cellules souches embryonnaires de primate se sont alors révélées différentes des cellules souches embryonnaires de souris et semblables aux cellules souches issues de carcinomes embryonnaires humains. En 1998, soit trois ans plus tard, le même groupe américain (Thomson, Itskovitz-Eldor et al. 1998), a reporté la dérivation de cinq lignées de hESC des deux sexes (trois mâles et deux femelles) à partir de quatorze MCI de blastocystes humains. La lignée H9 fait partie de ces lignées et a été utilisée pour mes travaux. Le diagnostic préimplantatoire offre également la possibilité d'identifier à partir des blastomères, au stade morula, les embryons porteurs d'une maladie génétique et de dériver en utilisant la technique décrite précédemment des lignées de hESC porteuses de mutations génétiques. Cette opportunité scientifique m'a permis de travailler sur cinq lignées normales indépendantes et six lignées porteuses de la mutation causale de la MH, l'exemple de la lignée Huez-MH est présenté Figure 19.

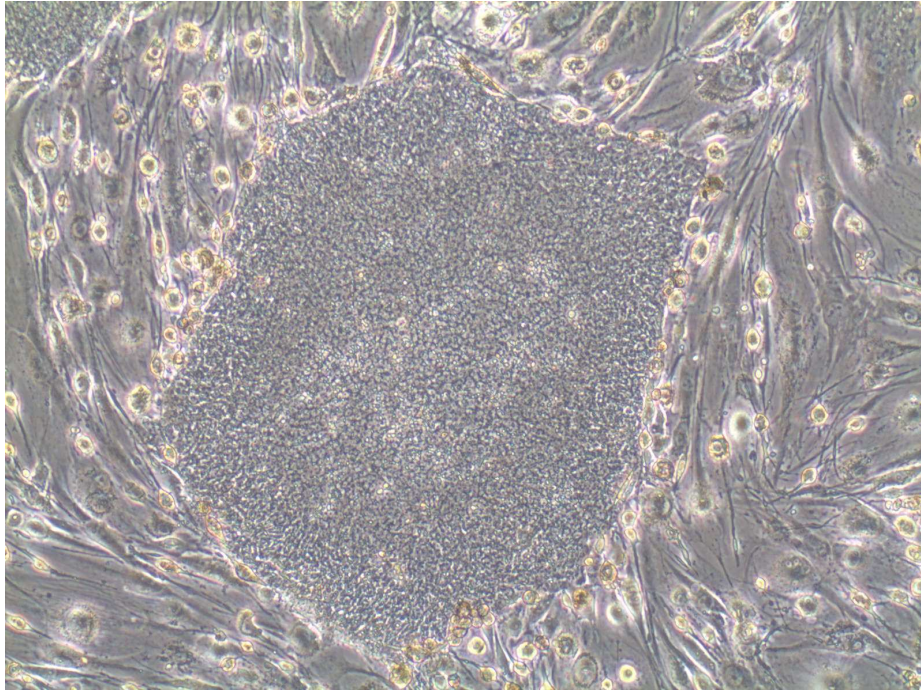


Figure 19 : Lignée hESC porteuse de la mutation causale de la MH au stade indifférencié (Huez-MH au centre) sur tapis de cellules stromales nourricières (STO en périphérie), largeur totale de l'image 0,7 mm

### 3) Cadre légal et éthique

L'utilisation de l'embryon humain et ses dérivés comme ressource biologique pour la recherche pose des questions d'ordre éthique. L'utilisation des hESC est controversée car l'isolation d'une lignée de hESC telle qu'elle est couramment pratiquée, conduit à la destruction d'un embryon humain. Par ailleurs, les hESC sont potentiellement capables de participer au développement d'un embryon humain. La recherche sur les hESC est donc encadrée par la loi de bioéthique. Les dérives potentielles concernant le clonage humain, reproductif ou régénératif, justifient en effet un encadrement légal particulier à ce type de recherches. En France, la question du statut juridique de l'embryon humain a régulièrement été posée depuis la loi du 17 janvier 1975 relative à l'interruption volontaire de grossesse. La loi du 29 juillet 1994 a interdit « les expérimentations sur l'embryon » pour empêcher son instrumentalisation, seules les « études » ne lui portant pas atteinte sont autorisées. Les perspectives thérapeutiques offertes par les hESC ont relancé le débat en 2004. La recherche sur l'embryon est devenue possible par dérogation à un interdit légal. En effet, les autorisations de recherche sur l'embryon et les hESC ne sont données qu'à titre dérogatoire. Jusqu'à très récemment, cette dérogation n'était valable que cinq ans. Depuis la révision de la loi de bioéthique le 15 février 2011, cette limitation a été levée. Pour autant, les recherches « doivent cumulativement être susceptibles de permettre des progrès thérapeutiques majeurs (article R. 2151-1) et de ne pas pouvoir être poursuivies par une méthode alternative d'efficacité comparable, en l'état des connaissances scientifiques ». Les protocoles de recherche doivent donc avoir été autorisés par l'Agence de la Biomédecine. Pour cela, cet établissement public national de l'État créé par la loi de bioéthique de 2004, se fonde sur la pertinence scientifique du projet de recherche, ses conditions de mise en œuvre au regard des principes éthiques et son intérêt pour la santé publique. Toutefois, la décision finale d'autorisation appartient au ministre de la Santé et de la Recherche qui peut interdire ou suspendre un

protocole après l'avis du conseil d'orientation. Les recherches ne peuvent être menées qu'à partir d'embryons conçus *in vitro* dans le cadre d'une assistance médicale à la procréation et qui ne fait plus l'objet d'un projet parental. De plus, il doit y avoir un consentement écrit préalable des parents qui doit être confirmé à l'issue d'un délai de réflexion de trois mois. Enfin, les embryons sur lesquels une recherche a été conduite ne peuvent pas être transférés à des fins de gestations. C'est dans ces conditions que l'Agence de la Biomédecine a autorisé plusieurs équipes de recherche françaises à dériver de nouvelles lignées de hESC. La première fut attribuée au Dr M. Peschanski et au Pr S. Viville le 19 juin 2006, pour la dérivation et l'amplification de lignées de hESC porteuses de mutations à l'origine de maladies monogéniques. Mon projet de recherche a été audité et approuvé par l'Inserm au cours de l'année 2006 (création de l'unité mixte de recherche Inserm/UEVE 861 coordonnée par Marc Peschanski le 01/01/2007). Ce travail a été autorisé par l'Agence de la Biomédecine en 2006 (Journal Officiel du 24/01/2006, numéro d'agrément RECR0500229A) et cette autorisation a été renouvelée en 2010 (Journal Officiel du 11/05/2010 numéro d'agrément SASB1020104S).

#### **4) Les Mécanismes de la pluripotence, comprendre et copier**

Le corps humain est composé de deux lignages cellulaires très différents dans leur comportement par rapport à notre cycle de vie. Le corps tel qu'il nous vient à l'esprit constitue le lignage somatique (du grec « σῶμα » soma : le corps) et est constitué de cellules qui ne participeront pas à la formation de la génération suivante. Le lignage des cellules reproductrices qui donnent naissance aux gamètes constitue le germen (du latin *germinis* : la graine) qui ne participe pas au développement du corps de l'individu, mais donnera après fécondation le soma et le germen de la génération suivante. En situation physiologique, seule la lignée germinale est pérenne au cours des générations.

Néanmoins, le cloisonnement entre germen et soma n'est pas absolu. Il est possible de forcer une cellule somatique à se comporter comme une cellule germinale par divers moyens regroupés sous le terme de reprogrammation vers la pluripotence.

##### **a) La découverte de la reprogrammation**

Le transfert d'un noyau de cellule somatique dans un ovocyte énucléé reprogramme le noyau qui se comporte alors comme un zygote, qui s'engage dans un programme développemental en progressant vers le stade blastocyste (Prather and First 1990). Il existe donc un déterminant dans le cytoplasme de l'ovocyte qui est capable de forcer un noyau dont le contexte épigénétique est défini pour un phénotype somatique vers le programme du zygote. En 2005, l'équipe de Kevin Eggan de l'université d'Harvard a montré que cette capacité n'était pas spécifique du cytoplasme du zygote et que la fusion avec des hESC avait les mêmes propriétés (Cowan, Atienza et al. 2005). Cette expérience montrait que des facteurs contenus dans les cellules souches embryonnaires non seulement maintiennent l'état d'indifférenciation, mais surtout sont capables de l'induire à partir de cellules différenciées.

## **b) Un changement de paradigme**

Dans son éditorial de « Science » du 19 décembre 2008, Bruce Alberts présentait la sélection des dix découvertes scientifiques majeures récentes. La reprogrammation de cellules adultes spécialisées en cellules pluripotentes (hiPS, human Induced Pluripotent Stem cells) ayant des potentialités très proches de celles des cellules ES était classée en tête. Pour la première fois, des cellules embryonnaires étaient produites en laboratoire en l'absence d'embryons ou d'ovocytes. Tout avait commencé deux ans plus tôt, le 25 août 2006, par une publication dans la revue « Cell » de chercheurs de l'Université de Kyoto (Takahashi and Yamanaka 2006). La reprogrammation est obtenue par l'infection de fibroblastes murins par des rétrovirus permettant la surexpression de quatre gènes : Oct4, Sox2, Klf4 et c-Myc qui codent pour des facteurs de transcription choisis parmi une liste de 24 gènes connus pour jouer un rôle dans la pluripotence des cellules souches embryonnaires. Ce principe fut ensuite rapidement adapté à l'Homme par la même équipe en transduisant des fibroblastes de derme humain avec la même combinaison de gènes (Takahashi, Tanabe et al. 2007). Dans le même temps, l'équipe américaine de James A. Thomson a réussi également à générer des cellules hiPS en utilisant une combinaison de gènes légèrement différente : NANOG, OCT4, SOX2 et LIN28 (Yu, Vodyanik et al. 2007). Dans tous les cas, le rendement de ces techniques est inférieur à 1% mais cela est suffisant pour obtenir plusieurs clones de cellules hiPS à partir de plusieurs milliers de fibroblastes. Les fibroblastes reprogrammés en cellules hiPS présentent un phénotype semblable aux cellules hESC en termes de morphologie, prolifération et expression des marqueurs de pluripotence. Les premières études visant à comparer l'expression génique et épigénétique des cellules souches embryonnaires et hiPS à l'échelle du génome entier, avaient conclu à des profils identiques (Maherali, Sridharan et al. 2007 ; Wernig, Meissner et al. 2007 ; Mikkelsen, Hanna et al. 2008 ; Amabile and Meissner 2009), mais cette notion est actuellement discutée (Chin, Mason et al. 2009 ; Stadtfeld and Hochedlinger 2010 ; Ohi, Qin et al. 2011). Les perspectives ouvertes par l'utilisation de ces cellules notamment pour la thérapie cellulaire motivent une recherche très active sur ce sujet et de nouvelles stratégies pour induire la pluripotence sont actuellement testées (O'Malley, Woltjen et al. 2009 ; Ban, Nishishita et al. 2011). Très schématiquement, on distingue plusieurs méthodes utilisant : des constructions lentivirales excisables (système cre-LoxP fondé sur la recombinaison, le système PiggyBac fondé sur la transposition) ou non intégratives (Ban, Nishishita et al. 2011), la transfection plasmidique malgré une efficacité très faible (Okita, Nakagawa et al. 2008), des ARN modifiés (Warren, Manos et al. 2010). Par ailleurs, les petites molécules pourraient également jouer un rôle pour aider la reprogrammation et permettraient de s'affranchir de l'utilisation des oncogènes KLF4 et cMYC. Parmi elles, l'acide valproïque, un modulateur bien connu de l'état de condensation de la chromatine, permet de reprogrammer un fibroblaste humain avec uniquement OCT4 et SOX2 (Huangfu, Osafune et al. 2008) ; d'autres petites molécules ciblant les voies de signalisation telles que des inhibiteurs de la voie de la GSK3 (Silva, Barrandon et al. 2008), sont utilisées. En résumé, la technologie de reprogrammation est encore immature et le choix de la meilleure approche n'est pas encore fait.

## 5) Un outil versatile

Les cellules souches pluripotentes offrent un cadre exceptionnel pour mieux comprendre les mécanismes cellulaires impliqués dans les processus développementaux et pathologiques humains. Elles réalisent en effet le cadre idéal pour décortiquer les interactions entre la cellule et son environnement cellulaire et acellulaire, en donnant théoriquement accès à tous les phénotypes pouvant jouer un rôle dans ces processus. Elles offrent par ailleurs un accès exhaustif aux techniques de la biologie cellulaire et moléculaire moderne, et sont théoriquement accessibles par reprogrammation chez tous les vertébrés. Par ailleurs, la possibilité d'amplification en culture et les opportunités croissantes de purification de population cellulaires sont favorables à des études à l'échelle du génome, du transcriptome ou du protéome. Les coûts de plus en plus accessibles de ce type d'approches devraient offrir un outil très puissant à de nombreux domaines de la biologie dans les années à venir.

### a) La modélisation pathologique

La modélisation des maladies faisant intervenir des tissus difficilement accessibles chez le patient devrait profiter pleinement des nouvelles opportunités offertes par les cellules souches pluripotentes. Il faut néanmoins bien comprendre que la reprogrammation en cellules souches induites est un champ de recherche encore jeune et que la maturation des technologies va encore se poursuivre. La course à l'établissement des modèles pluripotents des maladies humaines est déjà bien entamée comme le montre le Tableau 5. L'étude de nombre de maladies humaines, en particulier monogéniques, est devenue accessible de cette façon que ce soit grâce aux diagnostics préimplantatoires (Sermon, Simon et al. 2009) à la modification des hESC (Song, Chung et al. 2010) la dérivation de lignées d'hiPS (Unternaehrer and Daley 2011). Leur possible utilisation dans le cadre de stratégies à haut débit notamment est au cœur de leur succès. En conséquence, l'utilisation des cellules pluripotentes humaines dans le cadre de stratégies à haut débit est un phénomène en pleine expansion. La plupart de ces approches s'appuient sur une stratégie de criblage à haut débit de molécules thérapeutiques potentielles à l'aide de marqueurs biologiques. Les marqueurs biologiques ou biomarqueurs sont définis comme «une caractéristique cellulaire, biochimique ou moléculaire qui peut être mesurée objectivement et évaluée en tant qu'indicateur d'un processus cellulaire, normal ou pathologique ou comme réponse à une intervention pharmacologique » (Biomarkers Definition Working group 2001). L'identification de tels biomarqueurs dans la MH suscite aujourd'hui un grand intérêt, car beaucoup de molécules potentiellement thérapeutiques ont été identifiées dans différents modèles et sont sur le point d'entrer en phase clinique. Il existe un réel besoin d'outils de mesure objectifs de l'effet des thérapies sur l'évolution de la maladie (Beal and Ferrante 2004).

Le principal objectif de ces approches pharmacologiques est de bloquer ou du moins de ralentir les processus pathologiques en amont de la neurodégénérescence. Une approche complémentaire est donc évidemment nécessaire pour les patients symptomatiques, chez qui la perte neuronale est déjà enclenchée.



Tableau 5 : modélisation pathologique à l'aide d'hiPS (Maury, Gauthier et al. 2011)

Maladie	Phénotype/mutation	référence
Déficit immunitaire combiné sévère par déficit en adénosine désaminase	Non vérifié	Park IH, Arora N 2008
Sd de Shwachman-Bodian-Diamond	Non vérifié	Park IH, Arora N 2008
Maladie de Gaucher type III	Non vérifié	Park IH, Arora N 2008
Maladie de Duchenne	Absence de dystrophine dans des tératomes dérivés d'hiPS	Park IH, Arora N 2008 Kazuki Y, Hiratsuka M 2009
Dystrophie musculaire de Becker	Non vérifié	Park IH, Arora N 2008
Parkinson	Non vérifié	Park IH, Arora N 2008 Soldner F, Hockemeyer D 2009, Soldner F, Laganière J 2011
Huntington	Non vérifié	Park IH, Arora N 2008
Diabète de type 1	Inconnu	Park IH, Arora N 2008 Maehr R, Chen S 2009
Sd de Down - trisomie 21	Densité microvasculaire plus faible	Park IH, Arora N 2008 Baek KH, Zaslavsky A 2009
Sd de Lesch-Nyhan	Non vérifié	Park IH, Arora N 2008
Amyotrophie spinale infantile	Diminution de SMN (survival motor neuron) et défaut d'épissage de l'exon 7. Le nombre et la taille des motoneurons diminuent au cours de la culture et de la maturation	Ebert AD, Yu J 2009
Dysautonomie infantile	Défaut d'épissage alternatif du gène <i>IKBKAP</i> ( <i>inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase complex-associated protein</i> ). Atteinte de la différenciation et de la migration neuronales	Lee G, Papapetrou EP 2009
Sclérose latérale amyotrophique	Inconnu	Dimos JT, Rodolfa KT 2008
Syndrome de Rett	Mutation du gène <i>MeCP2</i> ( <i>methyl-CpG-binding protein 2</i> ), défauts (morphologiques et électrophysiologiques) des cellules neurales	Hotta A, Cheung AY 2009, Marchetto MC, Carromeu C 2010, Cheung AY, Horvath LM 2011
β-thalassémie	Non vérifié	Ye L, Chang JC 2009, Wang Y, Jiang Y 2009
Hutchinson–Gilford-progeria	Mutation du gène <i>LMNA</i> (codant les lamines de types A et C) Dans les cellules du lignage mésodermique issues de ces hiPS, présence de progérine et LMNA, augmentation des dommages de l'ADN et défaut morphologique des noyaux, apparition du phénotype sénescence dans des cellules du muscle lisse	Zhang J, Lian Q 2010, Liu GH, Barkho BZ 2011
Syndrome du QT long	Mutation du gène <i>KCNQ1</i> (code pour un canal potassium voltage dépendant, sous-famille Q) : défaut de conduction dans les cardiomyocytes dérivés d'hiPS Mutation du gène <i>KCNH2</i> (code pour un canal potassium voltage dépendant, sous-famille H) : défaut de conduction des cardiomyocytes dérivés d'hiPS. Potentiel d'action prolongé Mutation du canal calcium de type L Cav1.2 : contraction irrégulière des cardiomyocytes dérivés d'hiPS. Influx excessif de calcium et potentiel d'action prolongé	Moretti A, Bellin M 2010, Itzhaki I, Maizels L 2011, Matsa E, Rajamohan D 2011, Yazawa M, Hsueh B 2011

## **b) La thérapie substitutive**

La transplantation de cellules neurales semble être le seul espoir de traitement pour les patients à un stade avancé de la maladie. Celle-ci a été l'objet d'essais cliniques pilotes en France, aux Etats Unis et au Royaume Uni (Dunnett and Rosser 2004 ; Dunnett and Rosser 2007). Les premiers essais cliniques fondés sur la transplantation de tissus striataux fœtaux chez des patients atteints de la MH ont commencé dès 1990 (Dunnett and Rosser 2004). En 2000, les allogreffes striatales fœtales ont montré leur innocuité, des améliorations cognitives motrices et fonctionnelles ont même été observées dans trois des cinq patients (Bachoud-Levi, Remy et al. 2000). Cette étude de suivi à long terme a démontré que la transplantation neuronale dans la MH permettait une stabilisation transitoire de deux ans, mais pas une guérison définitive de la maladie (Bachoud-Levi, Gaura et al. 2006). Néanmoins, l'utilisation à terme de cellules pluripotentes humaines comme ressource de base pour ce type de thérapie permet d'espérer une standardisation et une optimisation des protocoles. Il s'agit d'éléments importants pour la seule thérapie envisagée à l'heure actuelle pour les patients symptomatiques. En conséquence, les groupes européens dirigés par Peschanski et Bachoud-Lévi mènent une étude de phase II avec 60 patients. L'amélioration de la procédure chirurgicale et l'accès aux cellules destinées à la transplantation sont désormais les facteurs limitants. En effet, même sans considérer les problèmes éthiques soulevés, la disponibilité de cellules issues de fœtus est limitée et leur application est lourde. Les cellules souches pluripotentes humaines et leurs dérivés neuraux sont une source « renouvelable » de neurones fonctionnels et transplantables. Ils constituent ainsi une alternative sérieuse aux greffons issus de Fœtus. Un des challenges actuels est d'établir le protocole de différenciation optimal pour la préparation de greffons issus de hESCs. Une partie du chemin nécessaire à l'obtention à partir d'hESC d'une population de cellules capables de remplacer les greffons fœtaux a déjà été réalisée, montrant une capacité de différenciation en neurones post-mitotiques exprimant des marqueurs striataux *in vivo* dans un modèle de rat excitotoxique (Aubry, Bugi et al. 2008). Les essais précliniques dans des modèles de la MH restent cependant une condition préalable fondamentale avant d'envisager des approches de remplacement cellulaire utilisant des hESC et leurs descendances chez les patients atteints de la MH. Toutefois, il convient également de considérer des modèles de gros animaux comme les singes ou les « mini porcs » qui permettent de tester de façon plus appropriée la capacité de prise de la greffe de cellules chez des espèces qui sont immunologiquement plus semblables à l'Homme. Le risque que les greffons issus de lignées de cellules souches pleinement aptes à générer des neurones du striatum puissent être moins efficaces une fois transplantés en raison d'un manque de soutien du BDNF cortical ne doit pas être sous-estimé. En effet le cortex des malades n'apporte vraisemblablement plus assez de BDNF via les projections cortico-striatales, ce qui affecte le greffon au même titre que le striatum. Une étude, qui comportait trois sujets, a montré une survie réduite du greffon et à long terme une dégénérescence neuronale rappelant celles des neurones malades, même dans le domaine de l'implant (Cicchetti, Saporta et al. 2009). Bachoud-Lévi, l'investigatrice principale de l'étude MIG-HD, a noté que les cellules des ébauches striatales fœtales greffées dans le striatum des trois patients inclus dans l'étude se connectent au cerveau hôte humain, de façon semblable aux résultats rapportés chez les animaux (Bachoud-Levi 2009). Des observations récentes suggèrent que, en plus de thérapies basées sur le remplacement des cellules, des stratégies qui combinent le recrutement des cellules souches

endogènes et la sécrétion de facteurs de croissance doivent être considérées comme thérapeutiquement utiles. La neurogénèse stimulée par un traitement BDNF / Noggin peut représenter un moyen de remplacer les neurones striataux perdus et confère un bénéfice thérapeutique chez les souris modèles de la MH (Cho, Benraiss et al. 2007). La recherche de protocoles optimaux de différenciation, l'analyse de la qualité et la sécurisation des greffons sont au cœur des activités de l'équipe dans laquelle j'ai effectué ma thèse.

## **B. La différenciation neurale**

Les cellules souches pluripotentes (hESC et hiPS) donnent théoriquement accès à la différenciation dirigée vers tout type cellulaire de l'organisme adulte. Pour atteindre cet objectif, il faut maîtriser les étapes conduisant les hESC vers la population cellulaire d'intérêt. Les travaux de la biologie du développement ont posé depuis plus d'un siècle les bases de la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires du développement embryonnaire. Au cours de ce développement, les cellules de l'épiblaste sont dirigées vers les trois feuillets embryonnaires au cours de la gastrulation. Une fois cette identité acquise, de nombreuses étapes développementales génèrent plus de 200 types cellulaires composant l'organisme humain. C'est en essayant de récapituler les séquences de signaux découverts par l'embryologie qu'un effort de recherche international permet de reproduire une part croissante de ces séquences de différenciation. Il est ainsi possible de reproduire *in vitro* les étapes de la neurogénèse embryonnaire à partir de hESC. Avant d'explicitier ce processus expérimental permettant l'obtention de précurseurs neuraux et de leurs différents dérivés à partir de cellules souches embryonnaires hESC, il est donc pertinent de rappeler les étapes successives de l'élaboration du SNC, et plus particulièrement du striatum.

### **1) L'induction neurale**

Les protocoles d'induction neurale des cellules hPSC sont multiples. Ils reposent soit sur la formation de corps embryoïdes, soit sur la culture des cellules souches embryonnaires sur une couche de cellules stromales nourricières, ou bien sur la différenciation spontanée des cellules ES. Ces protocoles reproduisent ce qui a été fait chez la souris, et aboutissent à la formation de précurseurs neuraux. Ceux-ci se présentent sous forme de neurosphères en suspension ou en rosettes neurales adhérentes. Ces précurseurs sont capables de se différencier aussi bien en neurones fonctionnels qu'en cellules gliales (Carpenter, Inokuma et al. 2001 ; Reubinoff, Itsykson et al. 2001). Le terme de neurosphère désigne initialement des agrégats multicellulaires obtenus à partir de cellules souches neurales (adultes ou fœtales) cultivées *in vitro* en présence des facteurs mitogènes EGF et FGF2 (Reynolds and Brien 1992). Les rosettes neurales sont quant à elles formées par des cellules neuroépithéliales (précurseurs neuraux) polarisées, et qui s'organisent en structures circulaires. Elles sont caractérisées par l'expression de marqueurs du neuroectoderme tels que Nestine, Sox1, Pax6 et NCAM. Cette organisation rappelle la structure du tube neural. Cependant, l'analogie est trompeuse car n'exprimant pas de marqueurs de régionalisation dorso-ventrale, elles sont vraisemblablement

plus précoces. Elle pourraient ainsi représenter un équivalent *in vitro* de la plaque neurale comme l'observation de rosettes dans des cultures primaires de plaques neurales de souris le suggère (Elkabetz, Panagiotakos et al. 2008). L'induction neurale des hESC est explorée depuis dix ans (Carpenter, Inokuma et al. 2001 ; Reubinoff, Itsykson et al. 2001; Zhang, Wernig et al. 2001 ). La formation spontanée à haute densité de corps embryoïdes par les cellules ES permet d'obtenir des précurseurs neuraux (Carpenter, Inokuma et al. 2001 ; Zhang, Wernig et al. 2001). Selon leur taille, les corps embryoïdes récapitulent un ou plusieurs des trois feuillets embryonnaires. L'ectoderme est toujours représenté, surtout pour des corps embryoïdes de petite taille. Une fois plantés sur un support adhérent en présence de mitogènes tels que le FGF2, ces corps embryoïdes génèrent des précurseurs neuraux, organisés en rosettes, exprimant des marqueurs du neuroectoderme tels que la Nestine, NCAM, ou encore Musashi (Zhang, Wernig et al. 2001). La formation des corps embryoïdes n'est pas nécessaire à l'apparition des précurseurs neuraux qui peuvent être obtenus en conditions adhérentes (Reubinoff, Itsykson et al. 2001). Le maintien des cellules hESC en culture sur cellules nourricières (MEF), sans repiquage ni changement de leur milieu pendant plusieurs semaines, conduit à l'apparition de zones présentant une morphologie caractéristique des rosettes. Ces zones sont caractérisées par l'expression des marqueurs du neuroectoderme Nestine et Pax6 puis par celle du marqueur NCAM. Les cellules NCAM+ peuvent être isolées mécaniquement, mises en suspension et cultivées sous forme de neurosphères en présence des facteurs de croissance EGF et FGF2, tel que décrit pour les NSC fœtales ou adultes. Cependant, ces conditions génèrent des populations cellulaires mixtes, contenant des dérivés ectodermiques mais aussi mésodermiques voire endodermiques. En s'appuyant sur les travaux réalisés avec les cellules souches embryonnaires de souris (mES), différentes stratégies ont alors été envisagées. Au début des années 2000, un nouveau protocole, fondé sur la co-culture des cellules souches embryonnaires avec des cellules stromales de moelle osseuse (PA6, MS5 ou S17) est décrit pour les cellules souches embryonnaires de souris (Kawasaki, Mizuseki et al. 2000 ; Barberi, Klivenyi et al. 2003). Cette technique, aussi dénommée SDIA (Stromal cell-Derived Inducing Activity), permet, chez la souris, une induction neurale rapide et efficace sans expression de marqueurs du mésoderme (Kawasaki, Mizuseki et al. 2000). Même si les signaux produits par les cellules stromales permettant ce processus ne sont pas encore identifiés, l'idée d'utiliser des cellules nourricières dérivées du mésoderme est fondée sur l'observation que ce dernier produit *in vivo* des signaux, tels que des antagonistes des BMP, importants pour l'induction neurale de l'ectoderme (Cohen, Itsykson et al. 2007). La transposition de ce protocole aux cellules souches embryonnaires humaines permet, après culture de celles-ci sur les cellules stromales MS5, de produire un grand nombre des cellules neuroépithéliales organisées en rosettes neurales (Perrier, Tabar et al. 2004 ; Tabar, Panagiotakos et al. 2005 ; Lee, Shamy et al. 2007 ; Hong, Kang et al. 2008). Après environ quatre semaines de co-culture en milieu sans sérum, plus de 90% des cellules neuroépithéliales ainsi obtenues expriment les marqueurs du neuroectoderme Nestine, Sox1 et Pax6, sans maintien des marqueurs d'indifférenciation Oct-4 et Nanog. Il n'y a par ailleurs pas d'expression de marqueurs méso- ou endodermiques. Néanmoins, l'utilisation de lignées de cellules stromales induit une variation de l'induction en fonction de leur qualité (nombre de passages cellulaires depuis l'établissement de la lignée, qualité de la préparation). Il est heureusement possible de s'affranchir des cellules stromales. En particulier un support de Laminine favorise l'induction neurale (Goetz, Scheffler

et al. 2006 ; Ma, Tavakoli et al. 2008). Très peu de facteurs de croissance sont actuellement utilisés pour améliorer l'induction neurale. L'inhibition de la formation du neuroectoderme par des signaux BMP *in vivo* (Sasai and De Robertis 1997 ; Munoz-Sanjuan and Brivanlou 2002), a conduit certaines équipes à tester *in vitro* l'action d'antagonistes de cette voie tels que Noggin. Des travaux ont ainsi démontré que l'induction neurale des cellules hESC, basée sur la formation de corps embryoïdes ou sur la co-culture avec des cellules nourricières, était améliorée en présence de Noggin (Itsykson, Ilouz et al. 2005 ; Sonntag, Pruszak et al. 2007). Le milieu de culture joue également un rôle essentiel dans l'induction neurale. En effet, l'utilisation de milieu supplémenté avec du sérum, tel que décrit dans les premières expériences chez la souris (Bain, Kitchens et al. 1995), ne permet pas une bonne induction neurale. Une explication serait que le sérum peut contenir des BMP, qui possèdent un rôle inhibiteur de la voie neurale (Tropepe, Hitoshi et al. 2001) voir Figure 20. Les protocoles d'induction neurale des cellules hESC ont donc rapidement convergé vers l'utilisation de milieu minimum dépourvu de sérum tel que le milieu N2. Initialement élaboré pour les cultures primaires de neurones et utilisé par la suite pour la différenciation neuronale des cellules mES (Ying and Smith 2003), ce milieu est basé sur l'association de cinq molécules : la transferrine, l'insuline, la putrescine, la progestérone et le sélénium (Suter and Krause 2008). La transferrine et l'insuline sont essentielles pour la prolifération des précurseurs neuronaux. La transferrine, la putrescine, et la progestérone ont une activité neuroprotectrice. Le sélénium protège de l'excitotoxicité et promeut la survie neuronale. Enfin, la putrescine joue également un rôle dans la croissance axonale. Certains protocoles utilisent un autre complément, le B27, plus complexe que le N2. Le B27 contient plus d'une vingtaine de composés parmi lesquels, des vitamines, des hormones, des acides gras, des antioxydants et des facteurs de croissance. La composition exacte de ce complément n'est pas révélée par son fabricant (Suter and Krause 2008). Il a été possible de définir des conditions permettant une induction neurale à partir des hESC, aussi efficace et plus rapide que sur cellules MS5, mais sans avoir recours à des cellules nourricières. En conditions adhérentes, à l'aide de deux inhibiteurs des voies SMAD : Noggin et SB431542, il est possible d'isoler des rosettes quasi-pures à partir d'hES (résultats non publiés de l'équipe ; (Chambers, Fasano et al. 2009)). La modélisation pathologique de la MH requiert dans l'idéal l'obtention de cellules striatales, de façon à se placer dans les conditions optimales pour comprendre les mécanismes de la neurodégénérescence des MSNs.

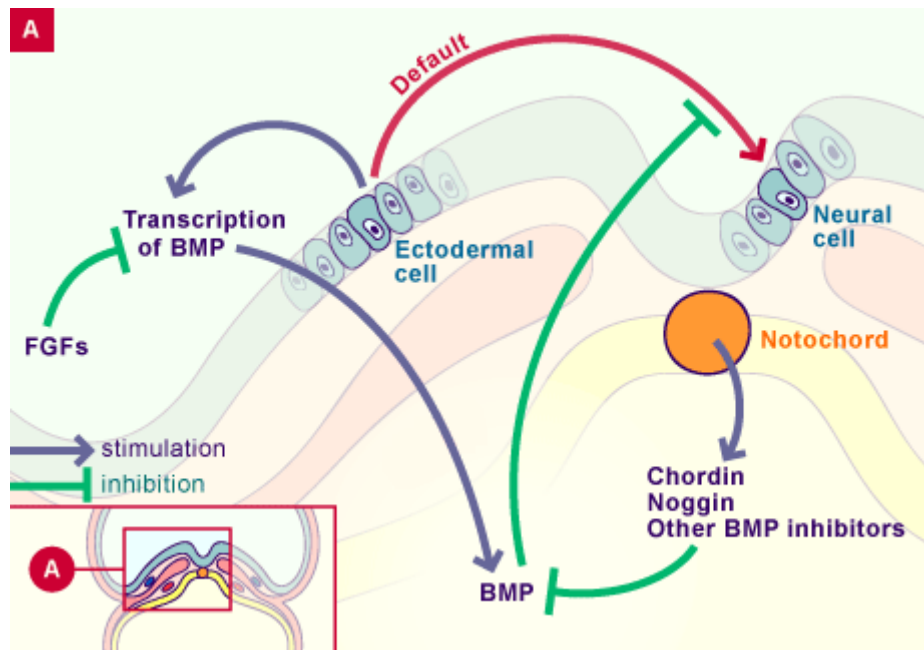


Figure 20 : Mécanismes de l'induction du neuroectoderme (modifié de <http://www.embryology.ch>)

## 2) Obtenir des cellules neurales striatales à partir de hESC.

L'un des défis majeurs de l'exploitation de la pluripotence des cellules hESC est d'orienter leur destin cellulaire vers un phénotype précis. Les premiers travaux d'induction neurale des cellules hESC, décrits précédemment, ont démontré la capacité des précurseurs neurales à se différencier aussi bien en neurones fonctionnels qu'en cellules gliales (Carpenter, Inokuma et al. 2001 ; Reubinoff, Itsykson et al. 2001; Zhang, Wernig et al. 2001 ). Pour étudier la MH une différenciation dirigée vers les neurones striataux permettrait d'obtenir un phénotype très intéressant pour comprendre la spécificité de la neurodégénérescence de la maladie. Le développement du système nerveux, est contrôlé par l'interaction des précurseurs neurales avec des morphogènes selon une séquence antéropostérieure et spatio-temporelle bien précise. En s'appuyant notamment sur les données de l'embryologie, des études ont donc cherché à déterminer quelles molécules permettaient d'orienter la spécification des précurseurs neurales vers un sous-type neuronal précis ou vers une population gliale donnée. Un protocole publié en 2003 par Barberi et ses collaborateurs démontre la possibilité de contrôler le destin de précurseurs neurales, obtenus par culture de cellules mES sur une couche de cellules stromales (PA6, MS5 ou S17) (Barberi, Klivenyi et al. 2003). Ces précurseurs neurales, une fois cultivés selon une séquence temporelle spécifique de milieu et de facteurs de croissance, dont l'objectif est de mimer certains signaux du développement neural *in vivo*, peuvent se différencier en divers sous-types de neurones et en cellules gliales. Ainsi, dans des cultures de précurseurs neurales exposés aux molécules suivantes : FGF8, FGF2, et Shh, plus de 60% de neurones GABAergiques ont été observés. Un grand nombre de cellules exprimant Bf1, un facteur de transcription exprimé dans le télencéphale, a été détecté, démontrant l'identité télencéphalique des neurones GABAergiques induits. Tandis que les NSC foétales murines maintiennent à long terme ce caractère multipotent *in vitro*, les NSC foétales humaines et de rat perdent leur potentiel neurogénique au cours des passages. Il ressort de certains travaux que les progéniteurs neurales humains et de rats produisant le plus de

neurones *in vivo* et pouvant adopter un phénotype striatal (DARPP-32+) sont ceux ayant eu une période de culture *in vitro* courte, généralement inférieure à deux semaines, et ayant subi un seul voire aucun passage (Armstrong, Watts et al. 2000 ; Fricker-Gates, Lundberg et al. 2001 ; Vazey, Chen et al. 2006). En effet, les progéniteurs neuraux fœtaux ayant été cultivés pendant un temps plus long (supérieur à deux semaines et avec plusieurs passages) ont un potentiel de différenciation neuronal très limité, et adoptent pour la plupart un phénotype glial ou restent indifférenciés (Englund, Bjorklund et al. 2002 ; Jain, Armstrong et al. 2003 ; Dunnett and Rosser 2007). Néanmoins, il n'existe pas à l'heure actuelle de protocole permettant d'obtenir des précurseurs neuraux striataux homogènes et de façon reproductible.

### **3) La dérivation de NSC à partir de rosettes neurales.**

A partir des rosettes précédemment décrites, il est possible de dériver des NSC. Ces NSC peuvent être cultivées pendant de nombreux passages, sous forme de monocouches cellulaires homogènes, capables d'autorenouvellement et de différenciation neuronale et gliale (Koch, Opitz et al. 2009). Leur autorenouvellement est contrôlé *in vitro* par le Fibroblast Growth Factor 2 (FGF-2) et l'Epidermal Growth Factor (EGF) (Morrison, Kornblum et al. 1987 ; Nurcombe, Ford et al. 1993). Elles ressemblent en cela aux NSC qui peuvent être isolées des cerveaux de souris et rats adultes (Reynolds, Tetzlaff et al. 1992 ; Reynolds and Weiss 1996). Malheureusement, les neurones obtenus par différenciation terminale des NSC sont hétérogènes. Cette hétérogénéité est peu favorable aux analyses mécanistiques et aux analyses transcriptionnelles par l'intermédiaires de puces à ADN (Carson, Aigner et al. 2006). Pour les études transcriptionnelles que nous avons menées nous avons donc choisi d'utiliser en plus du stade indifférencié, le phénotype NSC et non pas des phénotypes plus différenciés.

### III. L'approche transcriptomique

#### A. Le transcriptome

##### 1) L'identification des transcrits

Le transcriptome est constitué de l'ensemble des molécules d'ARN transcrits dans une population cellulaire : ARN messagers, ribosomiques, de transfert et non-codants. L'ensemble de ces transcrits peut résulter d'une population homogène d'une ou quelques cellules, ou hétérogène comme un organisme entier. Contrairement au génome qui est un élément stable pour un même organisme, le transcriptome est sujet à de grandes variations entre types cellulaires et au cours du temps pour un même type cellulaire, en réponse aux conditions environnementales.

Le transcriptome donne une indication sur l'expression des gènes qui ne rend pas compte de tous les processus de régulation post-transcriptionnels. La plupart des analyses de profil d'expression des gènes sont en fait des analyses de profil de transcription et exploitent la technologie des puces à ADN fondée sur l'hybridation de sondes d'ADN sur les ADN codants obtenus par reverse transcription des ARN totaux. La technique du RNA-seq, de plus en plus accessible, permet l'analyse par séquençage des ARN totaux, il s'agit probablement de la prochaine technologie de référence pour l'analyse des transcrits. Le Projet du génome humain (HGP) est un projet international de recherche scientifique avec pour objectif principal de déterminer la séquence de paires de bases chimiques qui composent l'ADN et d'identifier et de cartographier les 23 000 gènes du génome humain. Le projet a débuté en 1989 et a d'abord été dirigé par Ari Patrinos directeur du Bureau des Sciences du Département de l'Énergie américain. Francis Collins a dirigé les efforts du National Human Genome Research. Une première ébauche du génome a été publiée en 2000 et une complète en 2003. La Société Celera Genomics de Craig Venter a mené un projet parallèle, officiellement lancé en 1998. Le séquençage a été effectué par une collaboration internationale incluant des universités et centres de recherche des États-Unis, du Royaume-Uni, du Japon, de la France, de l'Allemagne et de la Chine. Ce projet demeure l'un des plus grands projets internationaux de la science moderne. Le Projet du génome humain visait à l'origine à cartographier les nucléotides contenus dans un génome haploïde de référence de l'Homme comportant plus de trois milliards de paires de bases, néanmoins, certaines régions hétérochromatiques (environ 8% du génome total) demeurent non séquencées. La connaissance de la séquence a ouvert la voie à l'établissement de collections de séquences spécifiques des gènes annotés permettant l'analyse rapide des acides nucléiques humains.



## 2) La révolution des puces

La technologie des puces à ADN permet la comparaison à l'échelle du génome d'ensembles d'ADN codant issus d'échantillons plus ou moins semblables. Leur utilisation présuppose que la séquence du génome de l'organisme étudié est connue, ce qui est le cas pour l'Homme depuis 2003. L'analyse de l'expression des gènes à l'échelle du génome est un outil puissant qui permet de rechercher des changements transcriptionnels sans *a priori*, et donc potentiellement nouveaux. Le principal avantage est de conjuguer une analyse à grande échelle et une identification directe des gènes impliqués. Ceci ouvre la possibilité de relier entre eux les gènes candidats dans l'espoir de trouver des événements transcriptionnels cohérents (Subramanian, Tamayo et al. 2005). Cette approche est en particulier utilisée pour l'étude des phénomènes de différenciation cellulaire et de carcinogénèse. Elle a fait ses preuves en participant au processus de sélection des gènes qui a conduit à la révolution de la reprogrammation cellulaire. Cette technologie est née au début des années 1990, suite aux avancées de la miniaturisation, de la synthèse et de l'hybridation d'oligomères nucléotidiques (Chetverin and Kramer 1994 ; Ramsay 1998 ; Schena, Heller et al. 1998). Les puces à ADN sont une technologie de multiplexage qui donne accès à l'interrogation de milliers de séquence de façon simultanée, grâce à la répartition de milliers de séquences oligonucléotidiques ciblant un gène : une « sonde » sur une petite surface. La quantification des cDNA est réalisée par hybridation sur les sondes dans des conditions de sélectivité optimales puis par révélation des séquences hybridées, souvent fondée par fluorescence. La première utilisation de ce type d'approche remonte aux années 80 avec une taille croissante du nombre gènes interrogés, passant de 378 à 23 000 grâce aux efforts de miniaturisation des dépôts de sondes (Augenlicht and Kobrin 1982 ; Augenlicht, Wahrman et al. 1987 ; Augenlicht, Taylor et al. 1991). La première utilisation de puces miniaturisées à proprement parler remonte au milieu des années 90 (Schena, Shalon et al. 1995), et la première puce couvrant un génome complet eucaryote (celui de la levure) a été publié deux ans plus tard (Lashkari, DeRisi et al. 1997).

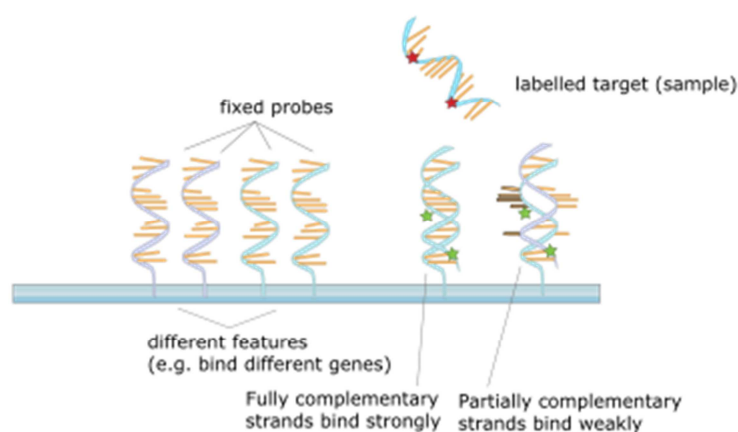


Figure 21 : Principe de détection des sondes de puces à ADN

Le principe de base de la puce à ADN est d'exploiter la reconnaissance complémentaire de deux brins d'ADN, dans les conditions adéquates. Il est possible de ne conserver que les homologues les plus fortes et identifier ainsi par fluorescence les séquences hybridées (voir Figure 21 : Principe de détection des sondes de puces à ADN). La quantité de signal fluorescent est dépendante de la quantité de d'ADN codant dans l'échantillon. Par le biais d'une référence commune, il est ainsi possible de comparer l'expression des gènes au sein d'une grande quantité d'échantillons. L'utilisation de puces à ADN demande de respecter certaines conditions pour pouvoir fournir des résultats ayant un sens biologique et statistique. La plus importante est le nombre de réplicats biologiques et techniques, qui doit être suffisant pour s'assurer d'une homogénéité des résultats. De plus l'homogénéité des échantillons biologiques à la base de la stratégie (idéalement composés d'un seul type cellulaire) doit être la plus grande possible pour autoriser la détection de variations fines de l'expression des gènes. Faire le lien entre une sonde et le gène qu'elle est censée détecter n'est pas trivial, en effet comme tout processus semi-automatisé des erreurs d'annotation de séquence sont possibles. De plus, les homologues de séquences peuvent conduire à des hybridations non spécifiques. La transcription inverse des ARN est aussi une source d'erreur car elle induit un biais d'amplification dépendant de la séquence et de la conformation des ARN messagers retro-transcrits. Il faut garder à l'esprit que le transcriptome ne reflète pas directement la quantité de protéines finalement exprimées dans la cellule ou protéome. Des changements relativement faibles de niveaux de transcrits peuvent se traduire par de fortes variations de la quantité des protéines correspondantes dans la cellule, et l'inverse est aussi possible. Par ailleurs, le protéome lui-même ne constitue pas une panacée, étant donné les niveaux de régulation post-traductionnels qui exercent un contrôle important sur la fonction des gènes.

# RESULTATS



## **Objectifs et stratégie générale des recherches**

La maladie de Huntington (MH) est une maladie neurodégénérative progressive causée par une expansion CAG dans le gène codant la Huntingtine (HTT). Elle se traduit par une dégénérescence primaire des neurones GABAergiques moyens épineux (MSN) du striatum suivie secondairement par une atteinte cérébrale globale. Il n'existe encore pas de réel traitement et la mort survient inéluctablement 15 à 20 ans après la déclaration des symptômes, qui a lieu le plus fréquemment après 35 ans. Des perturbations transcriptionnelles sont détectables en amont de la déclaration des symptômes.

Dans le but d'améliorer la compréhension des mécanismes moléculaires de la maladie de Huntington (MH), nous avons utilisé un nouveau modèle de la maladie : les cellules souches pluripotentes humaines (hPSC) normales et porteuses de la mutation causale de la MH. Nous avons choisi une approche quantitative, globale et faiblement biaisée : l'analyse transcriptomique comparative à l'aide de puces à ADN codants. J'ai utilisé plusieurs lignées de hESC, porteuses ou non de la mutation MH, isolées juste avant et au cours de ma thèse, pour caractériser des atteintes transcriptomiques précoces de la MH. Nous avons choisi deux phénotypes pour établir notre comparaison transcriptomique : les hPSC et les cellules souches neurales (NSC). Ces deux phénotypes présentent l'avantage d'être auto-renouvelables et homogènes, deux qualités clés pour la comparaison pertinente de multiples lignées cellulaires. J'ai dérivé des populations neurales homogènes de NSC à partir de hPSC normales et porteuses de la mutation causale de la maladie de Huntington. Ces mutations sont équivalentes à celles portées par les patients déclenchant la maladie à l'âge adulte (forme classique de la mutation : 37 à 55 CAG) mais aussi aux mutations associées à la forme juvénile de la maladie (55 CAG et plus). Les hPSC ont été sélectionnés comme modèle cellulaire parce qu'ils sont versatiles et pertinents : versatiles car capables de différenciations cellulaires variées, modifiables génétiquement, et largement amplifiables ; pertinents car on ne peut être plus proche du contexte génomique des patients. Nous avons fait le pari que ce modèle permettrait de découvrir de nouveaux mécanismes liés à la mutation du gène *HTT* et pour lesquels la pertinence vis-à-vis de la pathologie serait maximale. L'utilisation de l'approche transcriptomique est justifiée par notre volonté de rechercher des nouveaux acteurs de la pathologie au stade précoce, dans le cadre d'une maladie pour laquelle la composante transcriptionnelle est à la fois bien documentée aux stades tardifs et connues pour précéder l'apparition des symptômes.

Notre hypothèse de travail était que l'étude de ce nouveau modèle représente un complément pertinent à la grande richesse de modèles animaux et cellulaires ayant contribué à l'ensemble de la connaissance actuelle de la maladie.

## **Résumé des résultats**

Au cours de ma thèse, j'ai principalement travaillé avec six lignées de hESC porteuses de la mutation causale de la MH (hESC-MH) et cinq lignées contrôles. Afin d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans les mécanismes pathologiques précoces de la MH, nous avons choisi une approche transcriptomique différentielle focalisée sur l'expression des ARN messagers. Au cours de nos expériences, nous avons contrôlé l'intégrité du génome des cellules que nous utilisons, par des techniques de caryotypage classique et de caryotypage moléculaire (bandes G, hybridation génomique comparative sur chromosomes artificiels bactériens). Nous avons mis en évidence l'existence de mutations récurrentes qui apparaissent au sein des hESC et des NSC, dérivées à partir de ces dernières, lorsqu'elles sont cultivées de façon prolongée. Ces deux constatations ont fait l'objet de deux articles indépendants (voir article 2 (publié en 2008) et article 3 (en révision novembre 2011) en Annexes).

Le projet principal de ma thèse a porté sur l'utilisation des 11 lignées de cellules souches embryonnaires humaines mentionnées ci-dessus et de leurs descendances neurales. Ce travail m'a permis d'identifier un petit nombre de gènes d'intérêt dont l'expression est perturbée par la présence d'un allèle mutant du gène HTT au sein de populations de hESC ou de NSC (voir article 1). Ces biomarqueurs de la mutation n'avaient encore jamais été décrits dans le cadre de la MH, et pourraient être impliqués dans les mécanismes pathologiques précoces de la MH. En parallèle, et en collaboration avec les laboratoires du docteur Nicole Deglon et du docteur Frédéric Saudou, nous avons établi que le transport du BDNF dans les neurones issus NSC-MH était perturbé par la mutation de la MH. Fort de cette validation fonctionnelle de notre modèle, nous avons ensuite utilisé ce test pour évaluer l'impact de la perte d'expression de l'allèle mutant de la HTT. Nous avons montré que seul un petit ARN interférent (siRNA) ciblant l'allèle muté restaurait une vitesse normale de transport du BDNF dans les neurones issus de hESC-MH sans pour l'instant établir un lien direct entre cette récupération fonctionnelle et l'inactivation sélective mesurable d'un des deux allèles de la HTT. Néanmoins, ces résultats ont montré la capacité des neurones dérivés de hESC-MH à reproduire un défaut identifié au sein d'un modèle connu de la MH, renforçant la crédibilité de notre modèle.

➤ **Article 1 :**

***Transcriptomic analyses of multiple Huntington's disease-specific human embryonic stem cell lines reveal new cellular markers of the mutation***

**Maxime Feyeux**, Amanda Redfern, Fany Bourgois-Rocha, Nathalie Lefort, Peter Giles, Sophie Aubert, Caroline Bonnefond, Aurore Bugi, Nicole Deglon, Ruiz Marta, Lesley Jones, Marc Peschanski, Nicholas D Allen, Anselme L Perrier

De nouvelles perspectives pour la compréhension des mécanismes pathologiques pré-symptomatiques de la maladie de Huntington (MH) sont offertes par l'isolement de cellules pluripotentes humaines porteuses de la mutation (hPSC-MH). L'utilisation d'un tel outil apparaît légitime pour des maladies provoquant des anomalies du développement telles que la Progéria (Zhang, Lian et al. 2011), le syndrome LEOPARD (Carvajal-Vergara, Sevilla et al. 2010) ou encore la maladie de Duchenne (Park, Arora et al. 2008). Elle peut paraître moins évidente pour une maladie à déclaration tardive telle que la MH. Néanmoins, ces outils pourraient être adaptés pour déchiffrer les mécanismes pathologiques précoces qui conduisent *in fine* à la déclaration des symptômes de la maladie.

Parmi les mécanismes connus de la MH, le dérèglement de la transcription survient avant l'apparition des symptômes et est donc présumé être un facteur important, voire responsable, de la MH (pour revue : (Sugars and Rubinsztein 2003; Cha 2007)). Les études transcriptionnelles précédentes de tissus neuraux, ont été réalisées principalement sur des échantillons issus des modèles de souris et sur des échantillons issus de patients (voir Tableau 3). Ces derniers sont évidemment des échantillons post-mortem et correspondent à des stades où la neurodégénérescence est déjà avancée. L'inconvénient des modèles murins existants est l'expression, pour la majorité, d'une protéine contenant une séquence de plus de 80 glutamines répétées. De plus, il s'agit souvent d'une forme tronquée de la HTT (voir Tableau 4). Les modèles classiques se rapprochent donc plus des formes juvéniles de la maladie que de la MH classique, qui sont deux pathologies différentes.

Malgré l'amélioration des traitements symptomatiques, les modèles existants n'ont pas encore permis d'avancées thérapeutiques capables d'allonger la vie des patients (pour revue : (Zuccato, Valenza et al. 2010 ; Ross and Tabrizi 2011)). L'identification de nouveaux marqueurs moléculaires associés à la mutation, à des phases plus précoces de la maladie, pourrait aider à déchiffrer de nouvelles bases cellulaires de la pathologie, et fournir des cibles originales pour l'intervention thérapeutique pré-symptomatique. C'est pourquoi, nous avons sélectionné et mis en banque six lignées de hESC-MH et cinq lignées témoins (hESC contrôles) des deux sexes provenant de différents laboratoires (Mateizel, De Temmerman et al. 2006 ; Niclis, Trounson et al. 2009 ; Tropel, Tournois et al. 2010). Ces hESC-MH portent toutes des allèles mutants responsables chez l'Homme de déclenchement à l'âge adulte de la maladie (40 à 51 CAG). Ces cellules sont donc des modèles cellulaires génétiquement parfaits de la maladie. Toutes les lignées de hESC ont été différenciées de façon reproductible en un second phénotype homogène, les NSC, qui ont été utilisées comme second type cellulaire de comparaison transcriptionnelle. Les puces à ADNc Illumina ont généré deux listes de gènes différenciellement régulés aux stades hESC et NSC (N=4 par stade et par lignée). La

« signature transcriptomique » de la MH dans notre modèle cellulaire s'est révélée totalement divergente de celles, fondées sur des biopsies de cerveaux de patients, qui ont été publiées en 2006 (Hodges, Strand et al. 2006).

Nous nous sommes intéressés aux gènes les plus fortement régulés (deux fois plus, ou deux fois moins exprimés dans les cellules mutantes), et dont la significativité était forte (p-value < 0.00001). Ces critères ont identifié sept gènes et la dérégulation de cinq d'entre eux (>70%) a été confirmée par PCR quantitative en temps réel (QRT-PCR). Fait intéressant, alors que les deux gènes identifiés dans les hESC (ABHD12B, GALR2) ne sont pas exprimés dans les progéniteurs neuronaux, une expression différentielle significative a été confirmée à la fois dans les hESC et NSC pour les trois autres gènes (CHCHD2, TRIM4 et PKIB).

Les changements d'expressions constatés pour ces trois derniers gènes pourraient être fortement liés à l'expression et aux propriétés de la HTT. Pour explorer le lien entre l'expression de la HTT et une sélection de nos gènes candidats, nous avons mis en place une stratégie de gain et de perte de d'expression. Pour la perte d'expression de la HTT, nous avons opté pour une approche shRNA. Pour le gain de fonction, nous avons opté pour la surexpression de deux formes N-terminales tronquées de la HTT : normale (18Q), ou mutante (82Q). Ces stratégies ont amélioré ou aggravé dans les NSC la dérégulation des ARNm de certains candidats (voir Tableau 6). Nous avons ensuite confirmé une dérégulation importante voir maximale de l'expression de nos gènes candidats dans des populations neuronales MH.

**Tableau 6 : Récapitulatif des gènes candidats et de leur comportement par rapport à la mutation**

Gène	perturbé hESC	perturbé NSC	perturbé perte de fonction	perturbé gain de fonction	perturbé au stade neuronal	perturbé hiPS	perturbé hiPS-NSC	"score"
<b>PKIB</b>	<u>OUI</u>	<u>OUI</u>	<u>OUI</u>	<b>NON</b>	<u>OUI</u>	<b>NON</b>	<u>OUI</u>	<u>5</u>
<b>CHCHD2</b>	<u>OUI</u>	<u>OUI</u>	<u>OUI</u>	<u>OUI</u>	<u>OUI</u>	<b>NON</b>	<u>OUI</u>	<u>6</u>
<b>TRIM4</b>	<u>OUI</u>	<u>OUI</u>	<b>NON</b>	<u>OUI</u>	<u>OUI</u>	<u>OUI</u>	<u>OUI</u>	<u>6</u>

Légende du tableau 6 : De façon arbitraire, j'ai défini un score qui rend compte de la présence ou de l'absence d'effet de la mutation dans les différentes conditions expérimentales. Si une des techniques d'analyse révèle une différence entre le niveau d'expression d'un gène dans un contexte normal avec la condition expérimentale, le score est incrémenté de 1.



## Early transcriptional changes linked to naturally occurring Huntington's disease mutations in human embryonic stem cells

Maxime Feyeux<sup>1,2</sup>, Fany Bourgois-Rocha<sup>1,2</sup>, Amanda Redfern<sup>3</sup>, Peter Giles<sup>4</sup>, Nathalie Lefort<sup>1,2</sup>, Sophie Aubert<sup>4</sup>, Caroline Bonnefond<sup>1,2</sup>, Aurore Bugi<sup>4</sup>, Nicole Deglon<sup>5,6</sup>, Ruiz Marta<sup>5,6</sup>, Lesley Jones<sup>4</sup>, Marc Peschanski<sup>1,2\*</sup>, Nicholas D Allen<sup>3\*</sup>, Anselme L Perrier<sup>1,2\*</sup>

1. Inserm U861, I-STEM, AFM, Evry 91030 cedex France
  2. UEVE U861, I-STEM, AFM Evry 91030 cedex France
  3. School of Biosciences, Cardiff University, Cardiff, United Kingdom
  4. MRC Centre for Neuropsychiatric Genetics and Genomics, School of Medicine, Cardiff University, Cardiff, UK
  5. CECS, I-STEM, AFM Evry 91030 cedex France
  6. Commissariat à l'Energie Atomique, Institute of Biomedical Imaging (I2BM) and Molecular Imaging Research Center, France
  7. Centre National de la Recherche Scientifique URA2210, Orsay, France
- \* Corresponding authors

Co-corresponding authors:

A.L.P : [aperrier@istem.fr](mailto:aperrier@istem.fr), Tel:+33 1 69908523, Fax: +33 1 69908521  
N.D.A: [AllenND@cardiff.ac.uk](mailto:AllenND@cardiff.ac.uk), Tel:+44 (0) 29 2087 6196, Fax:  
M.P : [mpeschanski@istem.fr](mailto:mpeschanski@istem.fr), Tel:+33 1 69908520, Fax: +33 1 69908521

## ABSTRACT

Huntington's disease is characterized by a late clinical onset despite ubiquitous expression of the mutant gene at all developmental stages. How mutant huntingtin impacts on signaling pathways in the pre-symptomatic period has remained essentially unexplored in humans due to a lack of appropriate models. Using multiple human embryonic stem cell lines derived from blastocysts diagnosed as carrying the mutant *huntingtin* gene by pre-implantation genetic diagnosis, we explored early developmental changes in gene expression using differential transcriptomics, combined with gain and loss of function strategies. We demonstrated a down-regulation of the mutant HTT allele in neuronal but not undifferentiated cells and identified three genes as new biomarkers of the mutation, CHCHD2, TRIM4 and PKIB. Two are involved in mitochondrial function or protein kinase A-dependent pathway regulation which suggests that these functions are precociously impacted in Huntington's disease and may represent novel therapeutic avenues.

## INTRODUCTION

Disease-specific human pluripotent stem cell (hPSC) lines isolated from donors, either embryos or patients, that carry a causal mutation for a genetic condition, are rapidly appearing as essential tools to study pathological molecular mechanisms (for review (Han, Williams et al. 2011)). This strategy appears naturally legitimate for diseases that are known to provoke some developmental defects such as Familial Dysautonomia, Progeria, Spinal muscular atrophy, LEOPOARD syndrome. Indeed, a number of known pathological changes have successfully been replicated and deciphered using these cellular models (Ebert, Yu et al. 2009; Lee, Papapetrou et al. 2009; Carvajal-Vergara, Sevilla et al. 2010; Zhang, Lian et al. 2011). Applying a similar approach to late onset inherited diseases is conceptually less evident. Indeed for disorders, for which symptoms first manifest in adulthood, the lifespan of hPSC-derivatives compared to cells affected in adult patients is so different that even the most mature hPSC progeny may not allow end-stage pathological pathways to develop. Nonetheless, such models could be uniquely suited to decipher early pre-symptomatic events that may be responsible for later conspicuous phenotypic changes and pathology, or indeed compensatory mechanisms that succeeded in protecting most cells against the mutation from development to disease onset in adulthood.

Huntington's disease (HD) is a prototypical genetic disorder with much delayed clinical onset, despite ubiquitous expression of the mutated gene during development. This dominantly inherited neurodegenerative pathology is caused by the expansion of a CAG trinucleotide repeat in exon 1 of the Huntingtin (*HTT*) gene. This leads to an extended stretch of polyglutamine (polyQ) in the encoded huntingtin protein. HTT is essential for gastrulation and development of the nervous system (Nasir, Floresco et al. 1995). More recent work on HTT regulation of cortical neurogenesis through its role during spindle pole orientation even suggest that HD could be consider as a developmental disorder (Godin, Colombo et al. 2010). In adults, *HTT* is expressed ubiquitously although at much higher levels in the brain and testis (DiFiglia, Sapp et al. 1995). It is involved in the regulation of diverse cellular activities that are impaired in HD cells, including transcription, vesicle transport, endocytosis, apoptosis, ubiquitin-proteasome functioning or mitochondrial activity (for review (Zuccato, Valenza et al. 2010; Ross and Tabrizi 2011)). Among these functions, transcriptional dysregulation, either caused by a loss of wild type HTT function or a gain of toxic function is a major pathological feature. Indeed it occurs before the onset of symptoms, and thus is alleged to be a significant causative factor of HD ((Cha 2007), for review (Sugars and Rubinsztein 2003)). Routine access to HD brain tissues is obviously restricted to post-mortem samples for which cellular compositions vary widely and are often very different from control tissue. Mechanistic and therapeutic studies have therefore successfully relied on a wide range of genetic models in particular rodent transgenic and knock-in models (for review (Zuccato, Valenza et al. 2010)). Existing models are often not fully representative of typical HD pathology and thus may fall short of completely replicating critical aspects of the disease, in particular early pathological changes. This strongly hampers looking for preventive treatments that would aim at limiting the impact of molecular changes with deleterious effects in the long term, and at promoting compensatory mechanisms triggered by affected cells.

To study changes caused by HTT mutations during human development, we took advantage of the availability of multiple embryonic stem cell lines (hESC) derived from embryos identified as carrying a mutant-HTT allele following clinical pre-implantation genetic diagnosis (PGD) for mutant embryo exclusion following in vitro fertilization (Verlinsky, Strelchenko et al. 2005; Mateizel, De Temmerman et al. 2006; Tropel, Tournois et al. 2010; Bradley, Scott et al. 2011). Comparison of HD and control hESC lines and their neural progeny allowed us to explore early differential gene expression associated with naturally occurring human HTT mutations in the context of their native

genetic backgrounds. We have identified several genes differentially expressed between HD and control cells, using DNA microarrays, and quantitative RT-PCR as a technical validation of selected genes. A link between differential gene expression and loss or gain of HTT function was subsequently sought by manipulating HTT levels in HD and control hESC-neural derivatives. Interestingly, changes in gene expression of two of the most dysregulated genes identified was further enhanced when the HTT gene was knocked-down in HD background and reduced or unchanged in a wild type background or when mutant HTT construct was added, suggesting that the early developmental changes observed here could be due to a loss-of-function rather than a gain-of-function mechanism.

## RESULTS

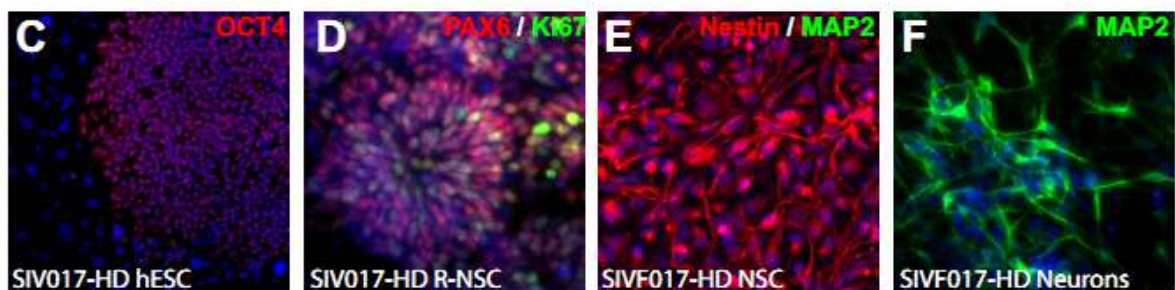
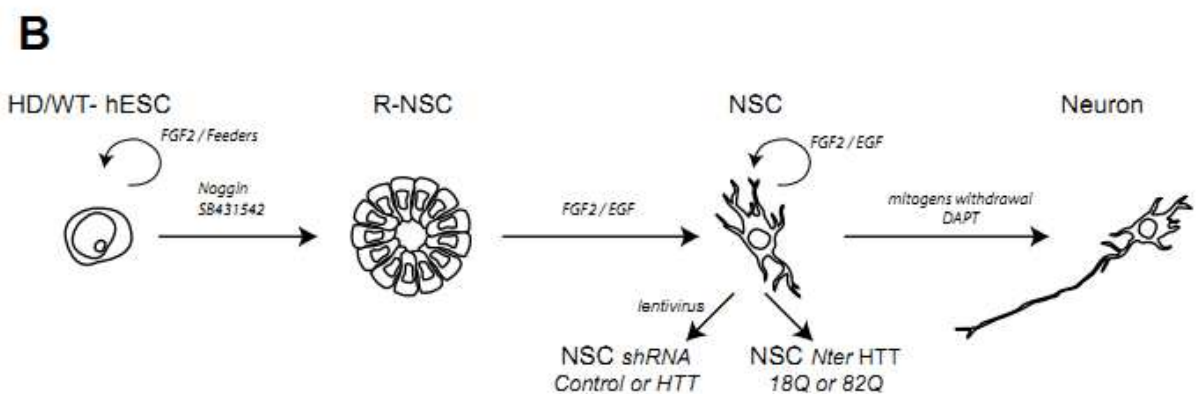
### Differential transcriptomic analyses of HD and WT hESCs and neural derivatives

Six HD and five control (WT) human embryonic stem cell lines derived in different laboratories (Verlinsky, Strelchenko et al. 2005; Mateizel, De Temmerman et al. 2006; Tropel, Tournois et al. 2010; Bradley, Scott et al. 2011) were used in this study. *HTT* mutations carried by the HD-hESCs all corresponded to mutations responsible for adult onset of HD with CAG repeats lengths ranging from 40 to 51 (Figure 1A). Rosette-Neural stem cells (R-NSCs) were differentiated (Figure 1D) and further grown in culture as Neural stem cell lines (NSCs) with FGF2 and EGF up to passage 20, with no apparent difference between the two series of hESC-lines (Figure 1B). WT and HD-ES derived neural stem cell (R-NSC and NSC) populations expressed classical markers of proliferative neural cells such as Nestin and PAX6 and Ki67 (Figure 1C-F). After plating for neural differentiation both HD- and WT-NSC populations differentiated into post-mitotic MAP2-positive neurons within 3 weeks (Figure 1G). Although no apparent qualitative differences in differentiation between the lines were observed, some variation in the rate of neuronal differentiation was seen between the hESC-derived NSC lines. Importantly, any variation observed in cell differentiation was not associated with either the presence of the mutant gene, sex, or the laboratory in which the hESC lines had been derived.

To identify genes differentially expressed between HD and WT ESC and NSCs whole genome gene expression data was obtained from independent, replicate cultures of four wild type (H9, WT4, VUB01 and SAO1) and six HD (VUB05, SI-187, Huez2.3, SIVF017, SIVF018 and SIV020) ESC and NSC lines using Illumina Human WG-6 v3 expression beadchips (GEO upload in progress). Cluster analysis indicated that multiple cultures from the same cell line gave similar gene expression profiles (Figure S1 & S2), indicating transcriptional stability. The gene expression analysis identified 163 and 66 significantly changed probe sets in ESC and NSC populations respectively ( $P < 0.001$ ) with 5 probe sets altered in common (Table S1, S2 & S3 and figure 2A). Interestingly, the most overrepresented disease category identified using Ingenuity pathways analyses system was the category of “neurological diseases” both for ESC and NSC datasets while the most overrepresented biological function were “lipid metabolism” and “gene expression” for ESC and NSC datasets. To estimate how different the transcriptomics signature of our pre-symptomatic HD model was from the signature of brain samples of end-stage HD patients we compared our data to those from HD patient brains described by Hodges and colleagues in 2006 (Hodges, Strand et al. 2006). We compared the top 200 most significantly differentially expressed genes in HD patient samples from caudate, cerebellum, BA4 and BA9 cortex to the top 200 ranked genes in the HD-hESCs or NSCs samples and identified between 1 and 9 genes (Figure 2B). The number of overlapping genes observed in these comparisons was however not significant.

**A**

Name & Genotype	Sex	CAG	
SI-187	HD	XY	51
SIVF020	HD	XX	48
SIVF018	HD	XX	46
Huez2.3	HD	XX	44
VUB05	HD	XY	44
SIVF017	HD	XY	40
SA01	WT	XY	<36
VUB01	WT	XY	<36
H9	WT	XX	<36
Hues24	WT	XY	<36
WT4	WT	XY	<36



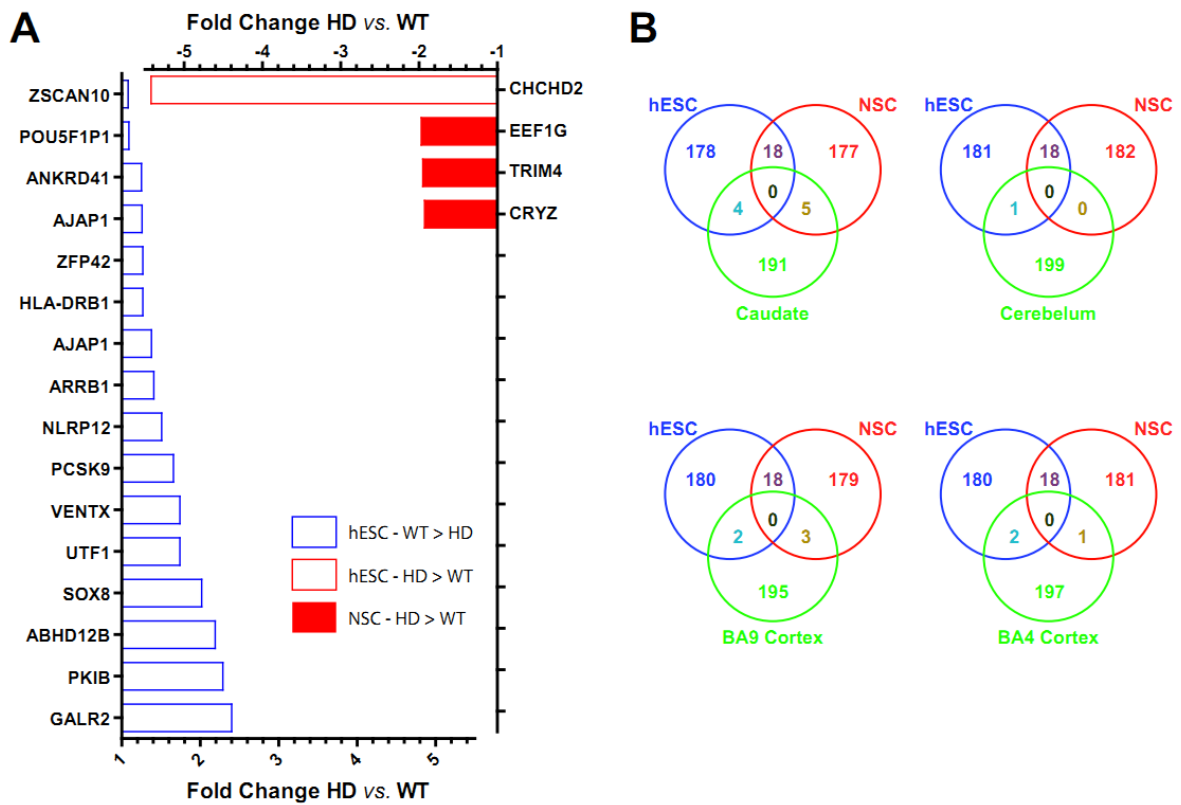
**Figure 1. Transcriptomic analysis of HD-hESCs and their neural derivative.** (A) Chart showing HD and WT hESC lines used, their gender and CAG repeat maximum number in the *HTT* gene. (B) Schema of hESC neural and neuronal differentiation and the generation of gain and loss of function lines from NSC populations. (C-F) Neural differentiation of hESCs (exemplified by line SIV017) expressing OCT4 (D, red) into rosette neural stem cells (R-NSC) expressing PAX6 (E, red) and Ki67 (E, green). R-NSC-derived proliferative neural stem cells (NSC) expressing NESTIN (F, red) and not MAP2 (F, green) differentiate upon mitogens withdrawal and DAPT addition into post-mitotic neuronal population expressing MAP2 (G, green).

## **Biomarker validation and effects of mutant *HTT* on gene expression in hESCs and their neural progeny**

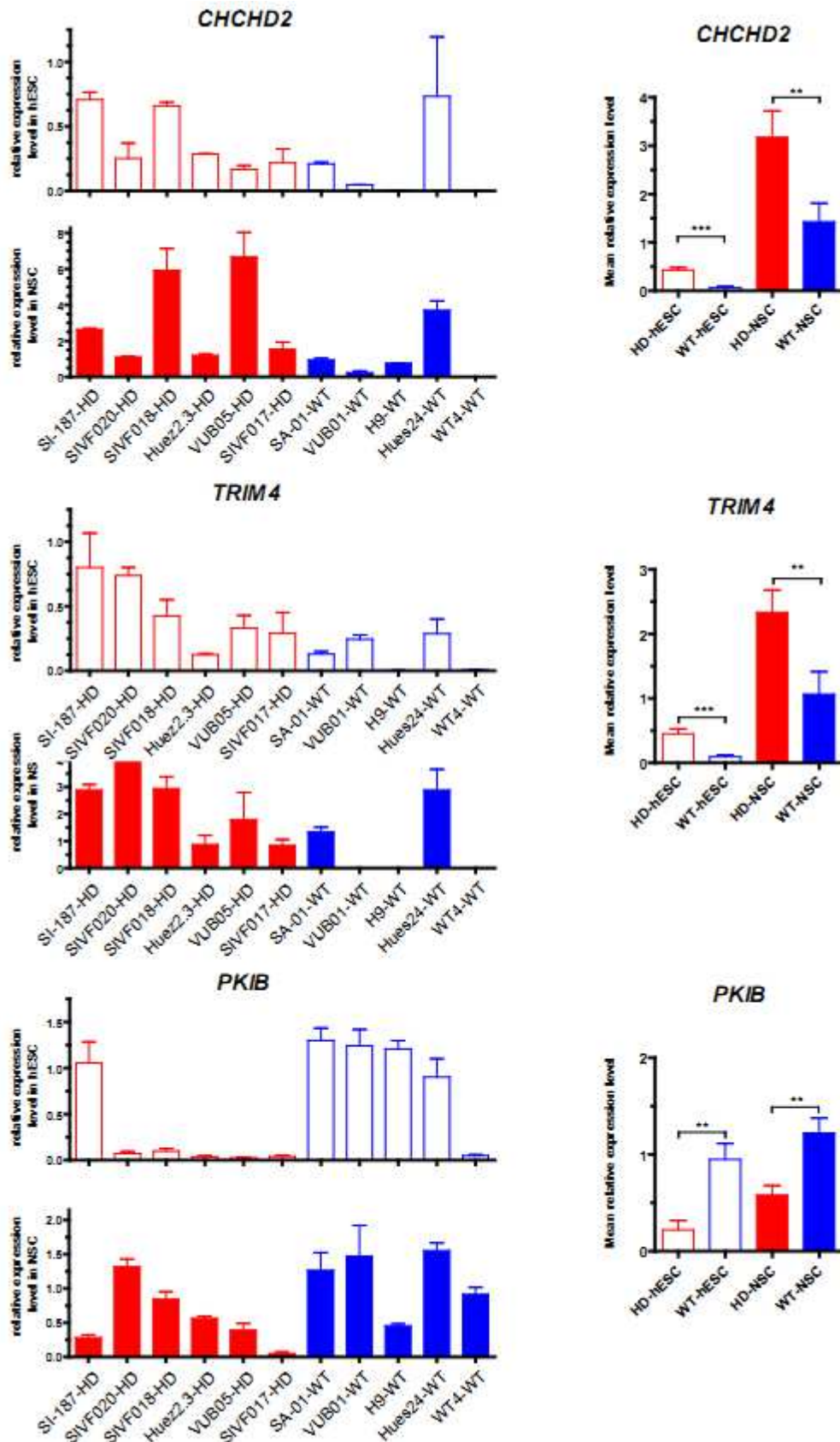
To reduce the lists of genes for biomarker validation we set a threshold significance of  $P < 0.00001$ , removed unknown and hypothetical proteins from the gene lists, and selected those genes showing an absolute fold change of  $> 2.0$  (Figure 2A). These criteria identified seven genes, CHCHD2, EEF1G, TRIM4, GALR2, PKIB, ABHD12B and SOX8 that were selected for further validation by QRT-PCR (Figure 3 and Figure S3). QRT-PCR analyses confirmed the differential expression of 5 of these 7 genes. Interestingly, while two genes identified in hESC-samples (ABHD12B, GALR2) were not expressed in neural progenitors, significant differential expression was confirmed both in hESCs and in NSCs for the three other genes (CHCHD2, TRIM4 and PKIB). Western blot analyses of protein levels of the candidate genes for which an effective antibody was available (CHCHD2, TRIM4) was performed with NSC extracts from all HD and WT lines (Figure S4). Mean protein levels confirmed mean relative mRNA level only for CHCHD2.

Expression of CHCHD2, TRIM4, PKIB was further analyzed during neuronal differentiation. Neuronal analysis was conducted using the HD-SIVF018 and the WT-SA-01 NSC lines as these showed the most comparable neuronal differentiation rates. NSCs derived from SA01 (WT) and SIVF018 (HD) lines were grown in differentiation conditions in 4 independent cultures for 7 days and 21 days, and gene expression analyzed by QRT-PCR (Figure 4A&B). Expression of the neural (SOX1) and neuronal (SNAP25, MAP2) markers increased over time during the course of differentiation, and did not significantly differ between HD and WT cells (Figure 4A). Expression of CHCHD2 and TRIM4 increased during neuronal differentiation (Fold change  $6.0 \pm 0.9$  and  $21 \pm 3$  respectively comparing hESCs to day 21 neuronal culture), whereas PKIB remained more stable. The highest fold change differences in expression between the HD-SIVF018 and WT-SA-01 derivatives for our candidate genes were always seen in neuronal cultures. For CHCHD2, the highest fold change was detected in day 21 neuronal cultures ( $n=4$ ,  $FC_{CHCHD2} = 8.4 \pm 2.1$  compared to  $5.7 \pm 2.3$  in NSC). For TRIM4 and PKIB the highest fold changes were detected in young (day 7) neuronal cultures ( $n=4$ ,  $FC_{TRIM4} = 5.1 \pm 0.8$  compared to  $2.3 \pm 0.7$  in NSCs;  $FC_{PKIB} = 25.9 \pm 4.9$  in day 7 neuronal cultures compared to  $13.2 \pm 2.4$  in hESCs).

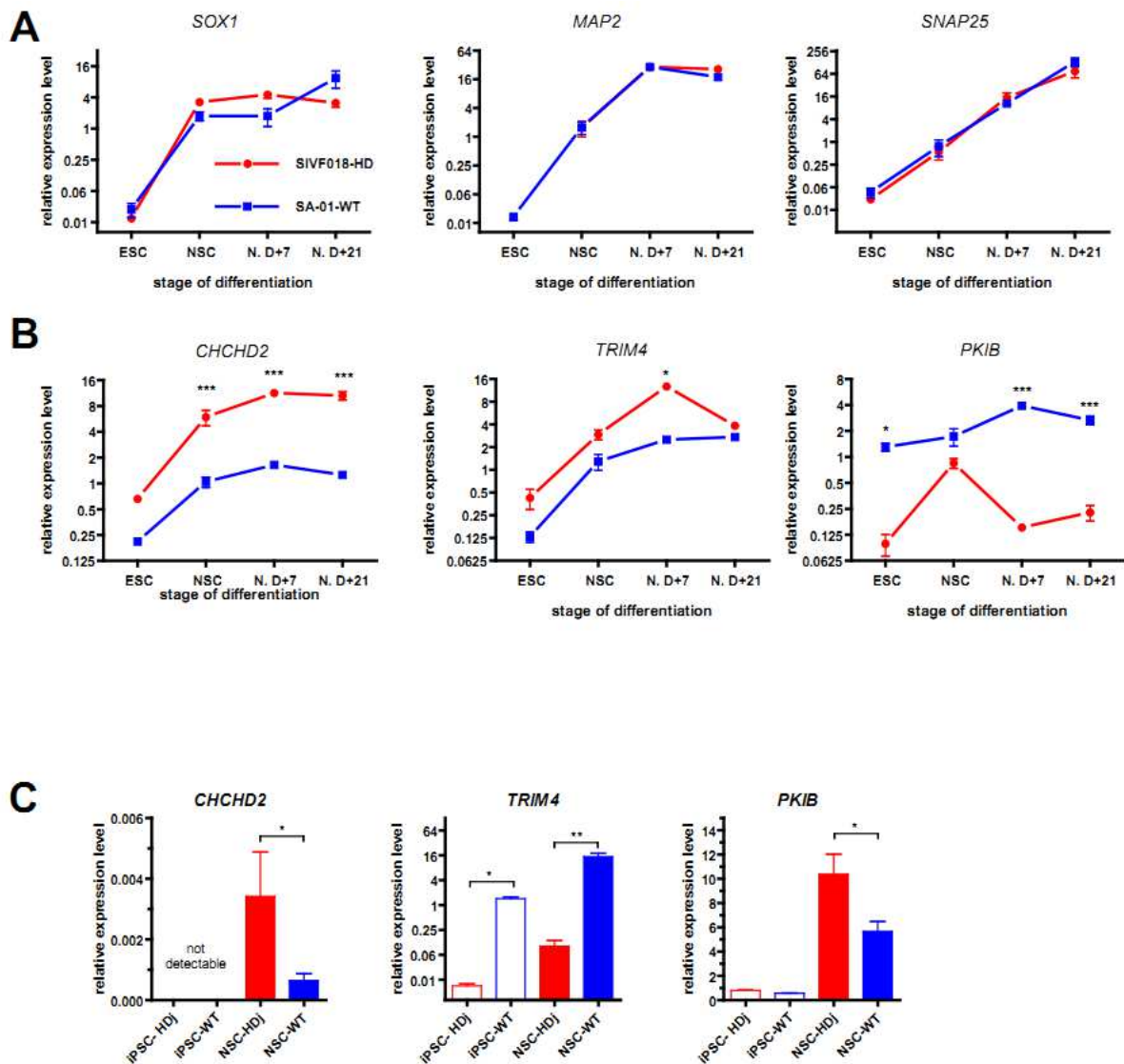
Patient-derived induced pluripotent stem cells (HD-hiPSCs) provide an alternative or complement to HD-hESCs for HD disease modelling. Unlike HD-hESC, HD-iPSCs would be of particular value to model juvenile onset HD where CAG repeat lengths exceed 60 and HD-ESCs could not be available. Since gene expression profiles in mouse ES cells have been shown to change by increasing HTT CAG length alone (Jacobsen, Gregory et al. 2011) we also analyzed gene expression in a previously characterized juvenile onset HD-hiPSC line (HDj-hiPSC clone D4) that carries a 70 CAG repeat, and a wildtype hiPSC line, WT-F5 (Park, Arora et al. 2008). HD-D4 and WT-F5 cells differentiated into NSCs and neurons similarly to the WT and HD-hESC-lines used in this study (Figure S5). HD-D4 and WT-F5 RNA from undifferentiated and NSC cultures were analyzed by QRT-PCR for the 7 candidate genes identified in HD-hESC derivatives (Figure 4C and Figure S6). CHCHD2 showed similar differential expression in HD and WT iPS-derived NSCs to that seen in the ES-derived NSCs, supporting the up-regulation of this gene as a biomarker for HD, independent of CAG repeat length. CHCHD2 protein in iPS-derived NSCs were however not detected (Figure S4). In contrast, TRIM4 and PKIB also showed differential expression between the HD and WT iPS cells, but in the opposite direction to that seen for the HD-ESCs and ESC-derived NSCs. TRIM4 protein level in WT and HDj-iPSC derived NSCs were found similar (Figure S4).



**Figure 2. Differential transcriptomic analyses of HD and WT hESC cells and neural derivatives.** (A) Fold change in expression level in hESCs (empty bar) and NSCs (filled bar) for the top 20 significantly modulated genes (Increase expression in HD cells (red bars) or decreased expression in HD cells (blue bars):  $P < 0.00001$ , Illumina WG-6). (B) Comparison of the transcriptomic signatures of HD-hESC-derivatives and HD patient brain: Venn diagrams of top 200 differentially regulated genes in HD-hESCs, HD-NSCs (VUB05, SI187, Huez2.3, and SA01, VUB01, H9, lines) and samples from caudate, cerebellum, BA4 and BA9 cortex of HD patient from Hodges et al. 2006. See also Table S1-4 and Figure S1-2.



**Figure 3. Confirmation of differential expression level in HD cells by QRT-PCR.** Relative gene expression level of two upregulated and one downregulated genes using QRT-PCR in hESCs and NSCs (n=3 per undifferentiated hESCs lines (empty bar), n=4 per NSC lines (filled bar)). Expression level in HD cells (red bars) and WT cells (blue bars) are normalized to a actin RNA. Left panel shows individual mean expression for each cell line. Right panel shows combined expression of all HD and all WT cell line. Error bars indicate  $\pm$ SEM (\*p < 0.05; \*\*p<0.01;\*\*\*p < 0.001).



**Figure 4. Expression of candidate biomarkers in neuronal cells or in other models of HD.** QRT-PCR of control (A) and candidate gene (B) expression during differentiation of SIVF018-HD (red circles) and SA001-WT (blue squares) hESCs. (A) Expression of neural *SOX1* and two neuronal markers *MAP2* and *SNAP25* in hESCs, NSCs, and in 7 and 21 day old neurons (n=3 to 5). (B) QRT-PCR analysis of mRNA levels of candidate genes in HD cells in the same samples. All QRT-PCRs are normalized to a single SA001-WT NSC sample. (C) Biomarker assessment in juvenile HD-iPSC derivatives: Relative gene expression levels of candidate genes measured using QRT-PCR in hiPSCs and NSCs (n=4 of juvenile HD-hiPSC and WT-hiPSC derivatives (clone D4 and F5) (empty bar), n=4 per NSC lines derived from these hiPSC (filled bar)). Expression levels in HD cells (red bars) and WT cells (blue bars) are normalized to the same reference RNA used in figure 1&3.

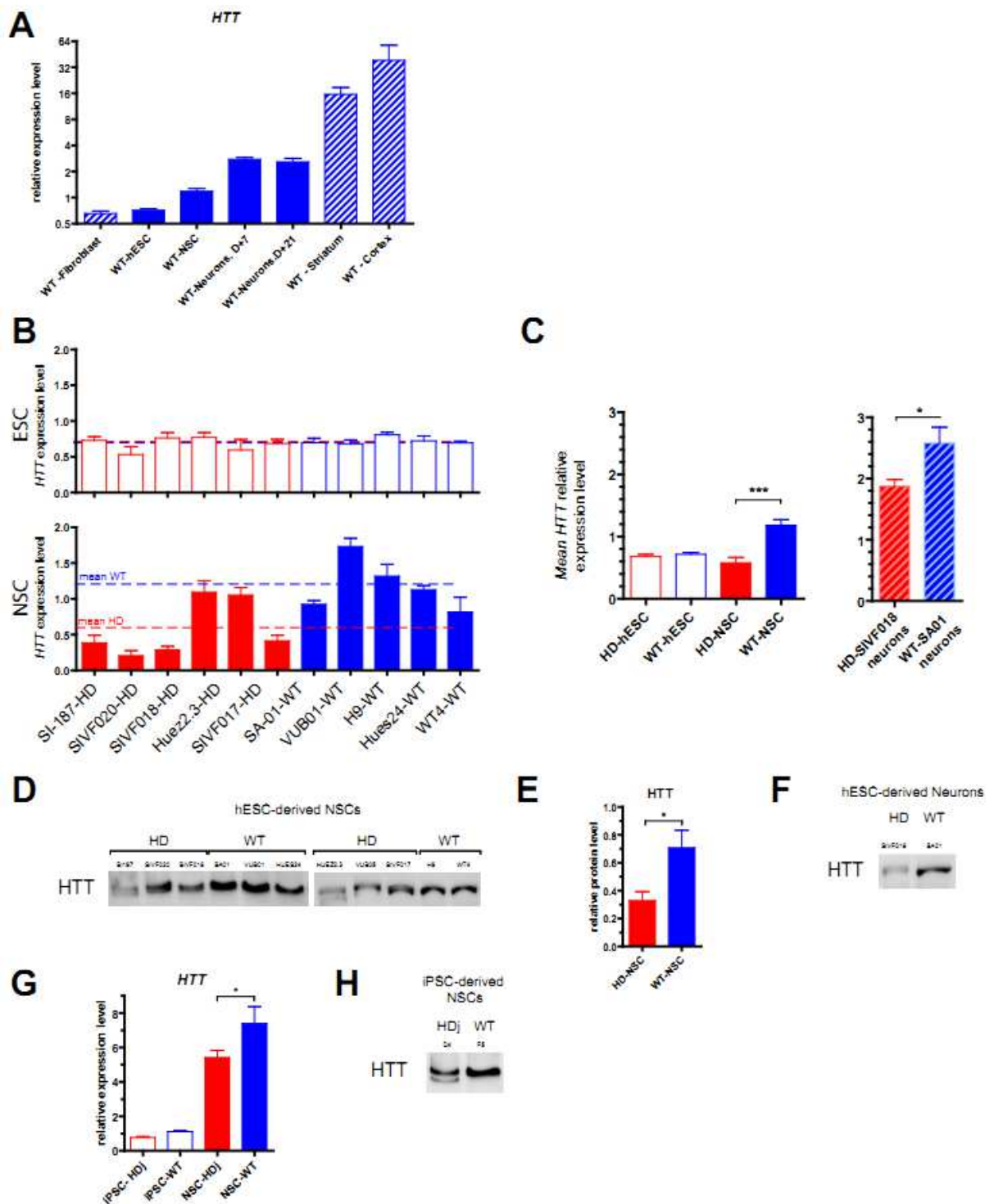


### Manipulating gain and loss of *HTT* expression in hESC-derived neural stem cells modulates candidate gene expression.

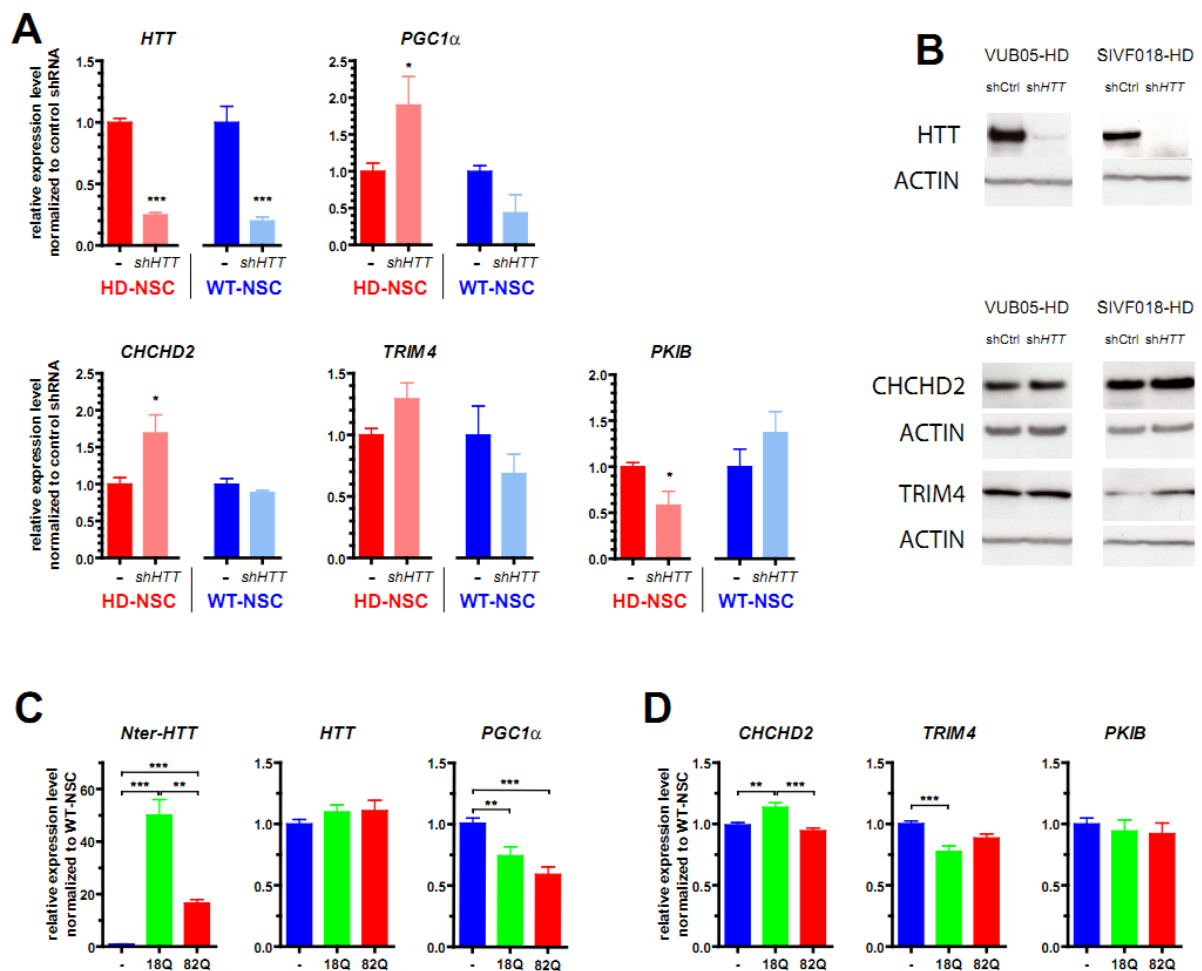
Changes in biomarker gene expression could be strongly correlated to changes in *HTT* gene expression or function. To investigate the possible association between changes in *CHCHD2*, *TRIM4*, *PKIB* gene expression and *HTT* expression we first determined *HTT* mRNA in all WT-hESC and their neural and neuronal derivatives and compared these to the levels of *HTT* expression in control human samples. Levels of *HTT* mRNA determined by QRT-PCR were low in undifferentiated hESCs, comparable to those found in WT-human fibroblasts (Figure 5A). *HTT* mRNA levels increased with neural and neuronal differentiation, with neurons exhibiting  $2.8 \pm 0.3$  fold higher levels than progenitor cells (NSCs) derived from the same hESC line (n=4, SA01-WT line). Human WT-striatum and WT-cortex samples contained higher levels, respectively  $16 \pm 3$  and  $39 \pm 19$  fold higher than NSCs (n=3). Systematic measurements of *HTT* mRNA and protein levels in WT and HD undifferentiated hESCs, NSCs and available neuronal populations were made by QRT-PCR and Western blotting. Surprisingly, notwithstanding inter-line variability, *HTT* expression was always found to be significantly higher in WT-NSCs as compared to HD-NSCs, despite comparable levels at the undifferentiated stage (Figure 5B). This difference was also observed in post-mitotic neuronal populations generated from HD-SIVF018 and WT-SA01 NSCs (Figure 5C). Western blot data paralleled mRNA data, showing significantly lower protein levels in HD-NSCs and neurons as compared to WT-NSCs and neurons (Figure 5D and 5F). The differential *HTT* expression seen between HD and WT NSCs also extended to the iPS-derived NSCs, such that D4-HDj iPS derived NSCs expressed significantly less *HTT* than F5-WT iPS-derived NSCs. Lower *HTT* protein levels in HDj-NSC were also detected on western blots (Figure 5G&H).

To determine whether changes in *HTT* expression would affect *CHCHD2*, *TRIM4* and *PKIB* we next engineered HD and WT neural progenitors with a small interfering RNA lentiviral vector targeting *HTT* mRNA to produce stable loss of function NSC lines. Similarly, WT-NSCs were engineered to produce stable gain of mutant *HTT* function lines using lentiviral vectors to transduce cells with an N-terminal, 171 amino acid fragment, of human *HTT* containing either 18Q or 82Q repeats. Three HD-NSC lines derived from VUB05, Huez2.3 and SIVF018 hESCs and one WT-NSC line derived from SA01 hESCs were transduced with a control *shRNA* or a human *HTT*-targeting *shRNA* lentiviral vectors (N=4 independent cultures per lines). QRT-PCR analyses of these cultures showed that *HTT* targeting *shRNAs* decreased *HTT* mRNA levels by more than 75% compared with control samples (Figure 6A). This knock-down of *HTT* expression resulted in a strong reduction in cellular protein levels as shown for two HD-NSCs lines (VUB05 and SIVF018) by western blot analyses (Figure 6B). The expression levels of *CHCHD2*, *TRIM4* and *PKIB*, together with the known *HTT* target *PGC1 $\alpha$*  (*PPARGC1A*), were quantified by QRT-PCR in *HTT* knock-down NSCs (3 HD-lines, 1 WT-lines, n=4 samples for each, one of two distinct shHTT used). *PGC1 $\alpha$*  a transcriptional coactivator involved in energy metabolism (Puigserver and Spiegelman 2003) is transcriptionally repressed in HD (Cui, Jeong et al. 2006). The knockdown of *HTT* caused a significant increase in *PGC1 $\alpha$*  expression in the HD NSCs but not the WT NSCs. Interestingly, the expression of *CHCHD2* and *PKIB* were affected by knocking down the *HTT* gene, but again only in the HD cell lines, i.e. in the context of mutant *HTT*. In each case, *HTT* knock down exaggerated the differential expression previously seen between HD-NSCs and WT-NSCs (Figures 6A). Western blot analyses of shHTT-treated neural derivatives from the mutant VUB05 and SIVF018 lines, using distinct *shRNAs*, confirmed the *HTT*-dependent modulation of *CHCHD2* protein levels predicted from the Q-RT-PCR data (Figure 6B). These results are consistent with *CHCHD2* and *PKIB* expression being sensitive to mutant but not WT *HTT* expression levels.

The effects of overexpressing N-terminal control (18Q) and mutant (82Q) *HTT* transgenes was also investigated by transducing three WT-NSC cultures derived from the SA01, Hues24 and H9 hESC lines with previously characterized lentiviral vectors (de Almeida, Ross et al. 2002) (n=4 independent cultures for each line). The combined transgenic overexpression of the N-terminal part of *HTT* and the endogenous expression of *HTT* was measured by QRT-PCR analyses of these cultures (Figure 5C). As previously reported, the 82Q fragment, although expressed at a significantly lower level than the 18Q-fragment, caused a significant reduction in *PGC1 $\alpha$*  expression (Figure 6C) (de Almeida, Ross et al. 2002; Chaturvedi, Adihetty et al. 2009; Chaturvedi, Calingasan et al. 2010). Endogenous *HTT* mRNA levels were however not affected by the 18Q or 82Q transgene expression (Figure 6C). Compared to the impact of *HTT* knock-down, overexpression of the 18Q or 82Q N-terminal fragments caused no (*PKIB*) or limited yet significant change in gene expression (Figure 6D) that were however not detectable by western blot analyses (figure S7).



**Figure 5. Comparative HTT expression levels in HD and WT-hESC neural derivatives.** (A) Relative HTT expression levels in WT-hESC derivatives and human tissue; QRT-PCR analyses showing HTT relative expression level in human fibroblasts (n=3), WT-hESC (n=3, 5 lines), WT-NSCs (n=4, 5 lines), WT-NSC-derived neurons after 7 days (WT-N. D+7) and 21 days (WT-N. D+21) (n=4, 1 line), human adult striatum and cortex (n=3). (B) Basal *HTT* expression levels in all hESC lines (QRT-PCR, n=3 (ES) or 4 (NSC)). Dashed-lines indicate mean *HTT* expression level in all HD (red) or WT (blue) lines. (C) Mean *HTT* expression level normalize to actin RNA during neuronal differentiation of HD (red) and WT(blue) hESC-lines using QRT-PCR (all lines analyzed, n=3 per line for ES stage (empty bar), n=4 per line for NSC stage (filled bar) and n=4 for HD-SVIF018 and WT-SA01 line only at neuronal stage (striped bar). Protein extracts analyzed by immunoblotting of wild type and mutant *HTT* proteins in NSCs (D) and neurons derived from SA-01 and SIVF018 line (F). The graph in (E) represents the quantitative assessment of the optical density of *HTT* protein level in HD-NSCs (red bar, n=6) and WT-NSCs (blue bar, n=5). Differential *HTT* expression (G and protein level (H) in juvenile HD-iPSCs and NSCs compared to wild type control cells of the same stage.



**Figure 6. Loss and gain of HTT function in NSCs derived from WT and HD-hESCs.** (A&B) Loss of function HD and WT-NSCs: Relative expression levels of control (*PGC1 $\alpha$* ) and selected dysregulated genes (red and blue bars for HD and WT-NSCs) were normalized to control shRNA (light red and blue for HD and WT-NSCs) of the same NSC line (n=4 per condition for one NSC line derived from WT-SA01 and HD-SIVF018, -VUB05 and -Huez2.3). Quantification of HTT knock-down induced by small hairpin RNA (shRNA) for *HTT* using QRT-PCR and selected candidate genes by QRT-PCR (A) and Western-Blot (B) on HD-VUB05 and HD-SIVF018 derived NSCs (ACTIN is included as a loading control). Mutant HTT overexpression in NSCs derived from WT-hESCs: Relative expression level of control (C) and selected candidate gene (D) in transgenic *Nter-HTT* 18Q WT-NSCs (green bars) and transgenic *Nter-HTT* 82Q WT-NSCs (red bars) were normalized to control WT-NSC (blue bars) of the same NSC line (n=4 to 5 per condition for WT-SA01, -Hues24 and -H9 lines). Error bars indicate  $\pm$ SEM (\*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001).

## DISCUSSION

This study has used *bona fide* human HD embryonic stem cell lines to identify novel disease biomarkers. The PGD-hESC lines provided a unique resource of unmodified human PSCs that carry naturally occurring HD mutations. Such models can be used to identify developmental and presymptomatic phenotypes that might influence disease onset and progression at later stages. Importantly, PGD-derived ES cells provide models in which mutant gene expression and phenotypes manifest within natural genetic backgrounds of HD patients. Since in more than 90% of adult patients, CAG repeat numbers usually range between 38 and 60 (Wexler, Lorimer et al. 2004) the CAG repeat length range of 40 to 51 in the cell lines used here represents a range that affects the majority HD population with adult onset disease. This contrasts with the majority of HD genetic models where transcriptional dysregulation has been extensively analyzed in which CAG repeats range from 82 to 150 and represent rarer juvenile onset forms of the disease (Animal models: (Luthi-Carter, Strand et al. 2000; Chan, Luthi-Carter et al. 2002; Luthi-Carter, Hanson et al. 2002; Luthi-Carter, Strand et al. 2002; Ferrante, Kubilus et al. 2003; Benn, Landles et al. 2005; Morton, Hunt et al. 2005; Crocker, Costain et al. 2006; Desplats, Kass et al. 2006), Cellular models: (Wyttenbach, Swartz et al. 2001; Kita, Carmichael et al. 2002; Sipione, Rigamonti et al. 2002; Sugars, Brown et al. 2004; Apostol, Illes et al. 2006)). Thus, with CAG repeats ranging from 40 to 51, the HD-hESCs used in this study constitute genetically precise cellular models of HD. One weakness of the study concerns limitations in statistical power of the transcriptomic approach due to variability in genetic background between the cell lines studied. In animal studies genetic variance can be addressed by comparing isogenic models, however genetic background effects in human studies are addressed by increasing patient numbers. While the study from Hodges and colleagues was based on 36 HD patients, here we report the analyses of 6 HD-hESC lines. Although smaller, this represents analysis of more independent clones than is typical for studies based on disease-specific human ESC and human iPSC (Eiges, Urbach et al. 2007; Ebert, Yu et al. 2009; Lee, Papapetrou et al. 2009; Carvajal-Vergara, Sevilla et al. 2010; Marteyn, Maury et al. 2011; Zhang, Lian et al. 2011). Despite these caveats, analysis of several cultures of the same lines and two cell phenotypes (N=48 HD samples in total) nevertheless identified significantly dysregulated genes.

The transcriptomic data was obtained from human WT- and HD-hESC and NSC cultures that were monitored for typical hESC and NSC properties and marker expression. Unlike previous comparisons of human control and HD disease tissues, and HD animal models, relatively few differentially expressed genes were found, and of those identified the majority showed changes in expression less than two-fold. As has been the case for previous HD transcriptomic studies, gene down regulation was more frequently observed than upregulation (Hodges, Strand et al. 2006). Interestingly, no significant overlap in differentially expressed genes was found between the hESC and NSC lists and those from human HD brain studies (Hodges, Strand et al. 2006). The study presented here and that of Hodges et al. (2006) were carried out using different platforms, which are known to give results which overlap, but are not identical, and the analytical procedures used in each case are likely to further obscure any direct comparisons (Klingmueller, Tuechler et al. 2011). However categories of genes classically dysregulated in HD such as genes encoding intracellular signaling molecules (ARRB1, PKIB) or molecules involved in cytoskeleton or synaptic components (SEPT5, are present in our ( $P < 0.00001$ ) lists (Figure 2). In previous HD transcriptomic studies differences in gene expression profiles were apparent between brains with Grade 0 and Grade 1-3 pathology (Hodges, Strand et al. 2006) and between early and later stage mouse models (Becanovic, Pouladi et al. 2010) reflecting changes in disease process and pathology. In the current study, differences identified in ESCs and NSCs most likely relate to fundamental changes associated with the common CAG alleles studied. We would expect such changes to be developmentally tolerated but nevertheless could provide a subtle basis for neurodegenerative predisposition and variable onset.

We focused on three genes, CHCHD2, PKIB, and TRIM4, together with HTT itself, that showed altered expression validated in independent samples by Q-PCR in HD cells at all stages of differentiation. Importantly, differential expression was also confirmed at the protein level. A major question in HD, concerns the consequences of CAG expansion with respect to gain or loss of function of the normal HTT protein activity. Systematic transcriptomic analysis has previously been performed using mouse ES cell models in which wildtype, HTT knockout and HTT CAG expanded cell lines in an otherwise isogenic genetic background were compared (Jacobsen, Gregory et al. 2011). In that study, the fact that very little overlap was seen between lines with increasing CAG expansions and the HTT knockout suggested that changing the CAG repeat conferred adverse functional consequences in HD in rather than loss of function. To further examine how candidate biomarkers are influenced by HTT

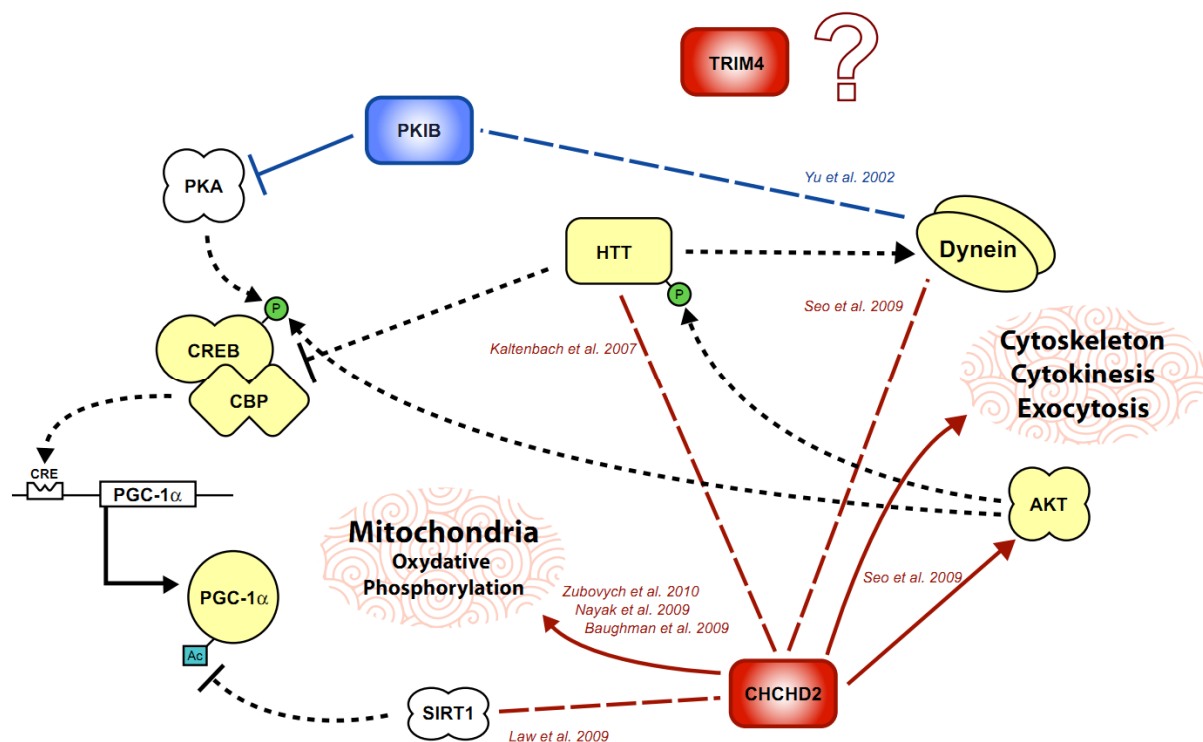
expression we analysed gene expression changes in WT and HD NSCs modified for loss of total HTT function (knockdown of both wildtype and CAG expanded alleles) by shRNA knockdown, or in wildtype cell lines that overexpressed 18Q or 82Q N-terminal HTT lentiviral transgenes (de Almeida, Ross et al. 2002). In these models, the known HTT target PGC1 $\alpha$  was appropriately regulated (Figure 6). Interestingly, we found that actual levels of normal or mutant HTT mRNA and protein were impacted by the genotype of the NSC and neuronal cultures, but not that of ESC cultures, both at mRNA and protein levels. Thus, in HD-NSCs HTT levels were reduced to around half that seen in WT-NSCs. This is consistent with the reduced expression of mutant Htt seen in Htt knock-in (HdhQ150) mouse striatum (Peter Giles and Jones 2011) and might well be a widespread effect of the expanded CAG repeat in neuronal tissue. In shRNA HTT knockdown models, a significant impact of an approximately four-fold reduction in HTT levels was visible for CHCHD2 and PKIB in HD-NSCs, but not in the WT cells. Interestingly, in HD cells the knock-down of HTT did not reduce the up-regulation (for CHCHD2, TRIM4) or down-regulation (for PKIB) as would have been expected for the hypothesis 'that HTT knockdown would rescue the HD genotype by a reducing levels of "toxic" mutant HTT protein'. Rather, HTT knockdown actually exacerbated the dysregulation of CHCHD2 and PKIB in HD cells, supporting an opposing hypothesis 'that HTT knockdown aggravates the loss of normal HTT already present in HD neural cells'. This observation may be significant for therapeutic strategies based on total HTT knockdown).

Upregulation of CHCHD2 was also confirmed in a juvenile onset hiPSC model of HD, however the expression profiles of other genes examined in the HD-iPSCs were inconsistent with changes seen in the HD-ESC/NSC lines. Discrepancies between HD-ESC and HD-iPS models could reflect allelic differences in CAG repeat number and relate to different phenotypes associated with adult and juvenile onset models. This possibility will need to be investigated using extended panels of HD-iPS cell lines that examine more directly CAG repeat length dependent regulation of gene transcription. However, differences between ES and iPS cell models could also arise from artefacts inherent in iPS technology. In this study HD-hESC were initially preferred over HD-iPSCs carrying mutations responsible for adult HD pathology because they are inherently devoid of reprogramming artifacts including epigenetic memory of parental somatic cells (Ohi, Qin et al. 2011), genomic aberrations (Hussein, Batada et al. 2011), somatic coding mutations (Gore, Li et al. 2011), and when applicable transgenes integration mutagenesis or unwanted sustained transgenes expression (Okita, Ichisaka et al. 2007). All these artifacts can complicate disease modeling and the comparison of transcriptomic profiles of HD and WT-PSCs derivatives. Interestingly, regulation of TRIM4, a gene that showed a reciprocal pattern of differential expression in HDj-iPSC derivatives, has recently been shown to be subject to epigenetic somatic memory in iPS cells (Ohi, Qin et al. 2011). This raises concerns over the use of disease-specific iPSCs over hESCs for transcriptomic approaches.

Taken together the HTT context-dependent regulation of CHCHD2, PKIB and TRIM4 expression identifies these genes as novel cellular biomarkers of HD and highlights them as being potentially involved in HTT normal or pathological pathways. Known functions and interactions of CHCHD2 and PKIB with relevance to HTT are summarized in Figure 7. CHCHD2, coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 2, had been previously identified in a screen for HTT interacting proteins (Kaltenbach, Romero et al. 2007) and has also been linked to three different functions known to be altered in HD: (1) mitochondrial activity (Damiano, Galvan et al. 2010): CHCHD2 expression disrupts oxidative phosphorylation and mitochondrial metabolism (Baughman, Nilsson et al. 2009) and is likely to interact with SIRT1 (Law, Liu et al. 2009), the enzyme responsible for deacetylation and activation of PGC-1 $\alpha$  a master regulator of mitochondrial genes and for which expression itself is already known to be negatively impacted by mutant HTT (Cui, Jeong et al. 2006). (2) AKT signaling (Colin, Regulier et al. 2005): CHCHD2 promotes cell migration in an AKT depend manner (Seo, Lee et al. 2010). (3) Cytoskeleton and membrane trafficking (Gauthier, Charrin et al. 2004): CHCHD2 is likely to interact directly with molecular motor (DNAH12: (Seo, Lee et al. 2010)). Similarly PKIB, cAMP-dependent protein kinase inhibitor beta, may participate in HTT regulated complexes since both proteins co-immunoprecipitate with DYNLL1 (PIN) a cytoplasmic dynein light chain (Yu, Yu et al. 2002). In addition PKIB inhibitory activity of PKA may impact CREB phosphorylation and thus its activity on CRE-containing promoters such as PGC-1 $\alpha$ . Overall, the properties of CHCHD2 and PKIB presented in figure 7 are consistent with playing roles in HTT regulated pathways and are therefore of interest for the understanding of early events of HD pathology. In contrast to PKIB and CHCHD2, little is known concerning the function of TRIM4 (tripartite motif family protein), besides being reported as a substrate of FGFR1 kinase activity (Kasyapa, Gu et al. 2009). Consequently whether its altered regulation in HD ESC and NSCs is consistent with a role in established HD pathways is unknown. Interestingly, TRIM4 SNPs have recently been identified to be associated with reduced serum

dehydroepiandrosterone sulphate (DHEAS) levels associated with ageing mechanisms in man (Zhai, Teumer et al. 2011) which could be relevant to HD.

In summary, the gene expression analyses presented here provide an unbiased molecular description of early HD transcriptional impairment during human development for the first. These findings demonstrate that disease-specific human pluripotent stem cells constitute a new and relevant cellular model of HD. These data also reveal novel HD-mutation related molecular differences. Further examination of the properties the three biomarkers identified may help decipher new aspect of HD pathology and/or HTT normal function related to transcription during development (Luthi-Carter, Hanson et al. 2002; Zhai, Jeong et al. 2005). The results also show the first demonstration of a down-regulation of the mutant HTT allele in neuronal but not undifferentiated cells.



**Figure 7. Functional interconnection between candidate biomarkers and key cellular of HD pathology.** Novel candidate biomarkers of HD mutation have potential implications for early developmental and or pathological pathways related to normal and mutant HTT function.

## MATERIALS AND METHODS

### Human ES cell culture

HD human ES cells lines used : SI-187 (XY, 51 CAG, passages 12-25, Stemride, Chicago(Verlinsky, Strelchenko et al. 2005)), SIVF020 HD (XX, 48 CAG , passage 15-28, Sydney IVF Stem Cells, Australia(Bradley, Scott et al. 2011)), SIVF018 (XX, 46 CAG, passage 18-30, Sydney IVF Stem Cells, Australia(Bradley, Scott et al. 2011)), Huez2.3 (XX, 44 CAG, passages 25-47, IGBMC, Stratsbourg(Tropel, Tournois et al. 2010)), VUB05 (XY, 44 CAG, passages 35-130, AZ-VUB, Belgium (Mateizel, De Temmerman et al. 2006)), SIVF017 (XY, 40 CAG, passages 18-35, Sydney IVF Stem Cells, Australia(Bradley, Scott et al. 2011)). Wild type human ES cells lines used : SA-01 (XY, passages 30-83, Cellartis AB, Sweden), VUB01 (XY, passages 80-90, AZ-VUB, Belgium) H9 (XX, passages 40-60, WiCell Research Institute), huES24 (XY, passages 35-60, Harvard University, Massachusetts), and WT4 (XY, passage 50-65, Kings College, London). Embryonic stem cell lines were maintained on a layer of mitotically inactivated murine embryonic STO fibroblasts (ATCC) for a variable number of passages. Manual dissection was routinely used to passage the cells rather than enzymatic methods. The hES cells were cultured in DMEM/F12 glutamax supplemented with 20% knockout serum replacement, 1 mM nonessential amino acids, 1% penicillin/streptomycin, 0.55 mM 2-mercaptoethanol and 5 ng/ml recombinant human FGF2 (all from Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Cultures were fed daily and passaged every 5-7 days.

### **Human ES cell neural induction and Neural Stem Cells isolation**

Neural differentiation was based on dual SMAD inhibition (Benchoua, Aubry et al. 2008; Chambers, Fasano et al. 2009). Human ES cells were manually detached from the feeder-layer, collected in differentiation medium composed of N2B27 medium supplemented with FGF2 (5ng/ml, Invitrogen, Cergy Pontoise, France) and transferred for 6 hours to low-attachment plate. Cells were then seeded on polyornithine and laminin (12 hours coating, 300 ng/cm<sup>2</sup> and 100µg/cm<sup>2</sup> respectively; Sigma, St. Louis, Missouri, USA) coated tissue culture plates. Differentiation medium was changed after 24h then every other day. Human recombinant Noggin (300 ng/ml, Peprotech, London, UK) and SB431542 (20µM, Tocris Biosciences, Ellisville, Missouri, USA) were added from day 0 and on for every medium change until rosette neural stem cell (R-NSC) arose usually at day 8 to 10. R-NSC manually collected at day 10-12, trypsinized using 0,05% trypsin (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) and seeded at 100'000 cells per cm<sup>2</sup> in polyornithine and laminin coated tissue culture plates in N2B27 medium supplemented with FGF2 (10ng/mL), EGF (10ng/mL R&D systems, Minneapolis, USA) and BDNF (10ng/mL Peprotech, London, UK) (passage 1). Cells were maintained in the same medium and passaged every 2-3 days for no more than 25 passages.

### **Neuronal differentiation of hESC-derived NSCs**

Confluent NSC plates were pretreated during 1 day in N2B27 medium supplemented with 10µM DAPT (Sigma, St. Louis, Missouri, USA), then 6 days with N2B27 medium in absence of cytokines. Growth-arrested NSCs were then seeded at a density of 100'000 cells/cm<sup>2</sup> on polyornithine and laminin coated dishes as described above. Medium was changed every 3 days until 7 days or 21 days.

### **RNA extraction and quantitative RT-PCR**

Total RNA from cells was extracted using "RNeasy Mini Protocol" (QIAGEN, Courtaboeuf, France) with on-column DNase treatment and quantified using a NanoDrop® ND-1000A spectrophotometer. Reverse transcription was performed with SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) and random primers (Invitrogen). Gene expression was determined relative to actin by real-time PCR (QRT-PCR), performed with LC480 SYBR Green I Master mix (Roche) on LC480 or MJ systems (Roche). Expression values were calculated using the  $\Delta\Delta C_t$  method.

### **Samples and microarray analysis**

RNA integrity was assessed by capillary electrophoresis on a bioanalyzer 2100 (Agilent) using 300 ng of total RNA. All samples were very good quality RNA with 260/280 ratio  $\geq 1.8$  and a typical RNA Integrity Number (R.I.N.) of 10. Biotin-labelled cRNA was prepared from 250ng total RNA using the Illumina TotalPrep RNA Amplification Kit (Applied Biosystems) and hybridised to Illumina Human WG-6 v3 expression beadchips (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. Hybridized probes were detected with streptavidin-Cy3 (1 mg/ml, Amersham Biosciences, GE Healthcare, Uppsala, Sweden) using Illumina BeadArray Reader (Illumina Inc.) and BeadStudio software (Illumina Inc.). Subsequent image analysis, QC, normalization and expression summarization was undertaken using the beadarray package in Bioconductor/R (<http://www.bioconductor.org/>). A batch correction was applied to the resultant expression values using ComBat (Johnson et al., 2007) before the identification of differentially expressed genes using limma analysis. Data was annotated using bioconductor libraries and heatmaps generated using hierarchical clustering of log transformed, median centered data using correlation as the distance metric. Comparisons with other microarray datasets were calculated after first mapping all probe identified to an EntrezGene before the calculation of overlaps.

### **SDS Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis and Western Blotting**

Cells were first re-suspended in RIPA lysis buffer (Sigma, ref. R0278-50ML) in presence of Protease Inhibitor Cocktail (Sigma, P8340-1ML) and anti-phosphatases PhosSTOP (Roche Applied Science,). Protein concentration of whole cell extracts was determined using Pierce® BCA Protein Assay Kit (Perbio Thermo Scientific, ref. 23225) according to the manufacturer's instructions. Cellular proteins from each sample were mixed with NuPAGE® LDS Sample Buffer 4X (Invitrogen, ref. NP0007) and DTT 1M (Sigma, L), then heated at 70°C for 10 minutes. For Huntingtin: The SDS Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) was performed using NuPAGE® Novex 3-8% Tris-Acetate (Invitrogen,) and NuPAGE® Tris-Acetate SDS Running Buffer (Invitrogen, ref. LA0041) with addition of NuPAGE® Antioxidant (Invitrogen, ref. NP0005). 15 to 30 µg of total proteins were loaded per lane and HiMark™ Pre-stained Protein Standard (Invitrogen,) was loaded to determine proteins molecular weight. Proteins migration was performed during 5h at 200 Volts at 4°C for the figure 1, for figures 3 and 7 migration was performed during 45 minutes at 200 Volts at room temperature. For the other proteins: SDS-PAGE was performed using NuPAGE® Novex 4-12% Bis-Tris Gels (Invitrogen,) and

NuPAGE® MES SDS Running Buffer (Invitrogen). The proteins were detected with Novex® Sharp Pre-stained Protein Standard (Invitrogen). Proteins migration was performed during 45 minutes at 200 Volts. Proteins were transferred onto nitrocellulose membranes using the iBlot® Gel Transfer Stack (Invitrogen) and the iBlot® Dry Blotting System (Invitrogen). Membranes were blocked with 5% non-fat milk in Phosphate Buffered Saline containing 0.1% Tween 20 (PBST) for 1 hour, then incubated overnight at 4°C with primary antibodies at the appropriate dilution. After several washes with PBST, blots were incubated for 1 hour at room temperature with the appropriate horseradish Peroxidase-conjugated secondary antibody: Rabbit, Mouse or Goat. Then, membranes were washed with PBST and incubated in Amersham ECL Plus™ Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare) in order to reveal immunoreactive bands by using the ImageQuant™ LAS 4000 mini luminescent image analyzer (GE Healthcare,). Equal protein loading was controlled by the detection of Actin.

### **Immunodetection of candidate genes**

Western blots were probed with CHCHD2 Rabbit Polyclonal Antibody (ProteinTech, 19424-1-AP 1:600), RNF87 Goat Polyclonal Antibody (TRIM4) (Abcam ab4527 1:500), Mouse Anti-Huntingtin protein Monoclonal Antibody (Millipore MAB2166 1:200), Monoclonal or Anti-β-Actin coupled Peroxidase clone AC-15 (Sigma A3854 1:50.000) then with ECL Anti-Mouse or Rabbit IgG HorseRadish Peroxidase-Linked whole antibody (GE Healthcare, NA931/934 1:10000), or Polyclonal Rabbit Anti-Goat Immunoglobulins/HRP (DakoCytomation, P 0449 1:10000). Cultured cells were fixed in 4% paraformaldehyde and blocked in phosphate buffer solution (PBS) supplemented with 0,1% Triton X-100 and 2% bovine serum albumin (Sigma-Aldrich). Primary antibodies were incubated overnight at 4°C in blocking buffer. Antibodies comprised rabbit anti Neuronal Class III β-tubulin (Tuj1) (Covance, 1/500), rabbit anti Microtubule Associated Protein 2 (MAP2) (Covance, 1/500). Cells were stained with the species-matched secondary antibody conjugated either with FITC or Cy3 (1/1000) (Jackson ImmunoResearch) and the nuclei were visualised with 4,6 L'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (1/10000). Images were captured using a fluorescent Zeiss microscope.

### **Lentiviral transduction**

HTT loss of function was performed on subconfluent NSCs using the commercial lentiviral construct (clone TRCN0000019873 NM\_002111.4-9535s1c1, Sigma Aldrich) followed by 1µg/mL puromycin (P8833, Sigma-aldrich) selection at 48h post transduction or shHTT1.1 (targeting second exon, kindly provided by Nicole Deglon) followed by GFP+ cell sorting at 48-72 post transduction. Both constructs showed similar efficiency. Gain of function experiments were conducted with htt171-18Q and htt171-82Q lentiviral constructs at 1/10<sup>th</sup> of lethal MOI described in Perrin et al. 2007 (both kindly provided by Nicole Deglon) gain of function transduced NSC were collected after one week of culture.

### **Statistical analysis**

With the exception of the microarray analysis, all the statistical analyses were performed using Prism5 software. All the data represent means ± SEM and were analyzed by ANOVA with Two-tailed Mann-Whitney test.

### **ACKNOWLEDGEMENTS**

We thank Dr K Sermon (VUB05), Dr S. Viville and Dr P. Tropele (Huez2.3), Dr Verlinsky and Sternide (SI-187), Dr Tomas Stojanov, Dr J Arjomand and CHDI (SIVF017/18/20), Dr G Daley (D4/F5) for providing us with HD-hESC or iPSC lines. We thank Dr M. Pucéat for providing Hues24 samples, Dr V. Drouet for technical help with lentiviruses. The work was supported by grants from European Union Framework program FP6 STEM-HD, and by DIM-STEM POLE Region Ile de France fellowship to F.B-R

### **AUTHORS CONTRIBUTIONS**

M.F, hESCs culture and directed neural differentiation, NSC transgenesis, RNA samples collection and analyses, data collection and analysis; A.R, RNA analysis, generation of Illumina array data and QRT-PCR validation; F.B-R, iPSCs directed differentiation, hESCs neuronal differentiation, RNA and protein samples collection and analyses; N.L, hESCs culture, RNA samples collection and analyses; P.G, microarray data analyses and bioinformatics. S.A, C.B, RNA and protein sample collection and analyses; A.B hESC and NSC culture; N.D, RM HTT knock-down and overexpression lentiviruses; L.J bioinformatics and in silico meta analyses; M.P : conception, study design, participation to writing; N.D.A, study design, data analysis, interpretation, and writing of manuscript; A.P, study design, NSC transgenesis, molecular assays, data analysis, interpretation, and writing of manuscript



## REFERENCES

- 1 Han, S.S., Williams, L.A. and Eggan, K.C. (2011) Constructing and deconstructing stem cell models of neurological disease. *Neuron*, **70**, 626-644.
- 2 Lee, G., Papapetrou, E.P., Kim, H., Chambers, S.M., Tomishima, M.J., Fasano, C.A., Ganat, Y.M., Menon, J., Shimizu, F., Viale, A. *et al.* (2009) Modelling pathogenesis and treatment of familial dysautonomia using patient-specific iPSCs. *Nature*, **461**, 402-406.
- 3 Zhang, J., Lian, Q., Zhu, G., Zhou, F., Sui, L., Tan, C., Mutalif, R.A., Navasankari, R., Zhang, Y., Tse, H.F. *et al.* (2011) A human iPSC model of Hutchinson Gilford Progeria reveals vascular smooth muscle and mesenchymal stem cell defects. *Cell Stem Cell*, **8**, 31-45.
- 4 Ebert, A.D., Yu, J., Rose, F.F., Jr., Mattis, V.B., Lorson, C.L., Thomson, J.A. and Svendsen, C.N. (2009) Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature*, **457**, 277-280.
- 5 Carvajal-Vergara, X., Sevilla, A., D'Souza, S.L., Ang, Y.S., Schaniel, C., Lee, D.F., Yang, L., Kaplan, A.D., Adler, E.D., Rozov, R. *et al.* (2010) Patient-specific induced pluripotent stem-cell-derived models of LEOPARD syndrome. *Nature*, **465**, 808-812.
- 6 Nasir, J., Floresco, S.B., O'Kusky, J.R., Diewert, V.M., Richman, J.M., Zeisler, J., Borowski, A., Marth, J.D., Phillips, A.G. and Hayden, M.R. (1995) Targeted disruption of the Huntington's disease gene results in embryonic lethality and behavioral and morphological changes in heterozygotes. *Cell*, **81**, 811-823.
- 7 Godin, J.D., Colombo, K., Molina-Calavita, M., Keryer, G., Zala, D., Charrin, B.C., Dietrich, P., Volvert, M.L., Guillemot, F., Dragatsis, I. *et al.* (2010) Huntingtin is required for mitotic spindle orientation and mammalian neurogenesis. *Neuron*, **67**, 392-406.
- 8 DiFiglia, M., Sapp, E., Chase, K., Schwarz, C., Meloni, A., Young, C., Martin, E., Vonsattel, J.P., Carraway, R., Reeves, S.A. *et al.* (1995) Huntingtin is a cytoplasmic protein associated with vesicles in human and rat brain neurons. *Neuron*, **14**, 1075-1081.
- 9 Ross, C.A. and Tabrizi, S.J. (2011) Huntington's disease: from molecular pathogenesis to clinical treatment. *Lancet Neurol*, **10**, 83-98.
- 10 Zuccato, C., Valenza, M. and Cattaneo, E. (2010) Molecular mechanisms and potential therapeutical targets in Huntington's disease. *Physiol Rev*, **90**, 905-981.
- 11 Cha, J.H. (2007) Transcriptional signatures in Huntington's disease. *Prog Neurobiol*, **83**, 228-248.
- 12 Sugars, K.L. and Rubinsztein, D.C. (2003) Transcriptional abnormalities in Huntington disease. *Trends Genet*, **19**, 233-238.
- 13 Verlinsky, Y., Strelchenko, N., Kukharensko, V., Rechitsky, S., Verlinsky, O., Galat, V. and Kuliev, A. (2005) Human embryonic stem cell lines with genetic disorders. *Reprod Biomed Online*, **10**, 105-110.
- 14 Mateizel, I., De Temmerman, N., Ullmann, U., Cauffman, G., Sermon, K., Van de Velde, H., De Rycke, M., Degreef, E., Devroey, P., Liebaers, I. *et al.* (2006) Derivation of human embryonic stem cell lines from embryos obtained after IVF and after PGD for monogenic disorders. *Hum Reprod*, **21**, 503-511.
- 15 Tropel, P., Tournois, J., Come, J., Varela, C., Moutou, C., Fagner, P., Caillet, M., Laabi, Y., Peschanski, M. and Viville, S. (2010) High-efficiency derivation of human embryonic stem cell lines following pre-implantation genetic diagnosis. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, **46**, 376-385.
- 16 Bradley, C.K., Scott, H.A., Chami, O., Peura, T.T., Dumevska, B., Schmidt, U. and Stojanov, T. (2011) Derivation of Huntington's disease-affected human embryonic stem cell lines. *Stem Cells Dev*, **20**, 495-502.
- 17 Hodges, A., Strand, A.D., Aragaki, A.K., Kuhn, A., Sengstag, T., Hughes, G., Elliston, L.A., Hartog, C., Goldstein, D.R., Thu, D. *et al.* (2006) Regional and cellular gene expression changes in human Huntington's disease brain. *Hum Mol Genet*, **15**, 965-977.
- 18 Jacobsen, J.C., Gregory, G.C., Woda, J.M., Thompson, M.N., Coser, K.R., Murthy, V., Kohane, I.S., Gusella, J.F., Seong, I.S., MacDonald, M.E. *et al.* (2011) HD CAG-correlated gene expression changes support a simple dominant gain of function. *Hum Mol Genet*, **20**, 2846-2860.
- 19 Park, I.H., Arora, N., Huo, H., Maherali, N., Ahfeldt, T., Shimamura, A., Lensch, M.W., Cowan, C., Hochedlinger, K. and Daley, G.Q. (2008) Disease-Specific Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell*.
- 20 Puigserver, P. and Spiegelman, B.M. (2003) Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocr Rev*, **24**, 78-90.
- 21 Cui, L., Jeong, H., Borovecki, F., Parkhurst, C.N., Tanese, N. and Krainc, D. (2006) Transcriptional repression of PGC-1alpha by mutant huntingtin leads to mitochondrial dysfunction and neurodegeneration. *Cell*, **127**, 59-69.
- 22 de Almeida, L.P., Ross, C.A., Zala, D., Aebischer, P. and Deglon, N. (2002) Lentiviral-mediated delivery of mutant huntingtin in the striatum of rats induces a selective neuropathology modulated by polyglutamine repeat size, huntingtin expression levels, and protein length. *J Neurosci*, **22**, 3473-3483.
- 23 Chaturvedi, R.K., Adhiketty, P., Shukla, S., Hennessy, T., Calingasan, N., Yang, L., Starkov, A., Kiaei, M., Cannella, M., Sassone, J. *et al.* (2009) Impaired PGC-1alpha function in muscle in Huntington's disease. *Hum Mol Genet*, **18**, 3048-3065.
- 24 Chaturvedi, R.K., Calingasan, N.Y., Yang, L., Hennessy, T., Johri, A. and Beal, M.F. (2010) Impairment of PGC-1alpha expression, neuropathology and hepatic steatosis in a transgenic mouse model of Huntington's disease following chronic energy deprivation. *Hum Mol Genet*, **19**, 3190-3205.
- 25 Wexler, N.S., Lorimer, J., Porter, J., Gomez, F., Moskowitz, C., Shackell, E., Marder, K., Penchaszadeh, G., Roberts, S.A., Gayan, J. *et al.* (2004) Venezuelan kindreds reveal that genetic and environmental factors modulate Huntington's disease age of onset. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 3498-3503.

- 26 Luthi-Carter, R., Strand, A., Peters, N.L., Solano, S.M., Hollingsworth, Z.R., Menon, A.S., Frey, A.S., Spektor, B.S., Penney, E.B., Schilling, G. *et al.* (2000) Decreased expression of striatal signaling genes in a mouse model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet*, **9**, 1259-1271.
- 27 Luthi-Carter, R., Strand, A.D., Hanson, S.A., Kooperberg, C., Schilling, G., La Spada, A.R., Merry, D.E., Young, A.B., Ross, C.A., Borchelt, D.R. *et al.* (2002) Polyglutamine and transcription: gene expression changes shared by DRPLA and Huntington's disease mouse models reveal context-independent effects. *Hum Mol Genet*, **11**, 1927-1937.
- 28 Luthi-Carter, R., Hanson, S.A., Strand, A.D., Bergstrom, D.A., Chun, W., Peters, N.L., Woods, A.M., Chan, E.Y., Kooperberg, C., Krainc, D. *et al.* (2002) Dysregulation of gene expression in the R6/2 model of polyglutamine disease: parallel changes in muscle and brain. *Hum Mol Genet*, **11**, 1911-1926.
- 29 Chan, E.Y., Luthi-Carter, R., Strand, A., Solano, S.M., Hanson, S.A., DeJohn, M.M., Kooperberg, C., Chase, K.O., DiFiglia, M., Young, A.B. *et al.* (2002) Increased huntingtin protein length reduces the number of polyglutamine-induced gene expression changes in mouse models of Huntington's disease. *Hum Mol Genet*, **11**, 1939-1951.
- 30 Ferrante, R.J., Kubilus, J.K., Lee, J., Ryu, H., Beesen, A., Zucker, B., Smith, K., Kowall, N.W., Ratan, R.R., Luthi-Carter, R. *et al.* (2003) Histone deacetylase inhibition by sodium butyrate chemotherapy ameliorates the neurodegenerative phenotype in Huntington's disease mice. *J Neurosci*, **23**, 9418-9427.
- 31 Morton, A.J., Hunt, M.J., Hodges, A.K., Lewis, P.D., Redfern, A.J., Dunnett, S.B. and Jones, L. (2005) A combination drug therapy improves cognition and reverses gene expression changes in a mouse model of Huntington's disease. *Eur J Neurosci*, **21**, 855-870.
- 32 Benn, C.L., Landles, C., Li, H., Strand, A.D., Woodman, B., Sathasivam, K., Li, S.H., Ghazi-Noori, S., Hockly, E., Faruque, S.M. *et al.* (2005) Contribution of nuclear and extranuclear polyQ to neurological phenotypes in mouse models of Huntington's disease. *Hum Mol Genet*, **14**, 3065-3078.
- 33 Desplats, P.A., Kass, K.E., Gilmartin, T., Stanwood, G.D., Woodward, E.L., Head, S.R., Sutcliffe, J.G. and Thomas, E.A. (2006) Selective deficits in the expression of striatal-enriched mRNAs in Huntington's disease. *J Neurochem*, **96**, 743-757.
- 34 Crocker, S.F., Costain, W.J. and Robertson, H.A. (2006) DNA microarray analysis of striatal gene expression in symptomatic transgenic Huntington's mice (R6/2) reveals neuroinflammation and insulin associations. *Brain Res*, **1088**, 176-186.
- 35 Wyttenbach, A., Swartz, J., Kita, H., Thykjaer, T., Carmichael, J., Bradley, J., Brown, R., Maxwell, M., Schapira, A., Orntoft, T.F. *et al.* (2001) Polyglutamine expansions cause decreased CRE-mediated transcription and early gene expression changes prior to cell death in an inducible cell model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet*, **10**, 1829-1845.
- 36 Sipione, S., Rigamonti, D., Valenza, M., Zuccato, C., Conti, L., Pritchard, J., Kooperberg, C., Olson, J.M. and Cattaneo, E. (2002) Early transcriptional profiles in huntingtin-inducible striatal cells by microarray analyses. *Hum Mol Genet*, **11**, 1953-1965.
- 37 Kita, H., Carmichael, J., Swartz, J., Muro, S., Wyttenbach, A., Matsubara, K., Rubinsztein, D.C. and Kato, K. (2002) Modulation of polyglutamine-induced cell death by genes identified by expression profiling. *Hum Mol Genet*, **11**, 2279-2287.
- 38 Sugars, K.L., Brown, R., Cook, L.J., Swartz, J. and Rubinsztein, D.C. (2004) Decreased cAMP response element-mediated transcription: an early event in exon 1 and full-length cell models of Huntington's disease that contributes to polyglutamine pathogenesis. *J Biol Chem*, **279**, 4988-4999.
- 39 Apostol, B.L., Illes, K., Pallos, J., Bodai, L., Wu, J., Strand, A., Schweitzer, E.S., Olson, J.M., Kazantsev, A., Marsh, J.L. *et al.* (2006) Mutant huntingtin alters MAPK signaling pathways in PC12 and striatal cells: ERK1/2 protects against mutant huntingtin-associated toxicity. *Hum Mol Genet*, **15**, 273-285.
- 40 Eiges, R., Urbach, A., Malcov, M., Frumkin, T., Schwartz, T., Amit, A., Yaron, Y., Eden, A., Yanuka, O., Benvenisty, N. *et al.* (2007) Developmental study of fragile X syndrome using human embryonic stem cells derived from preimplantation genetically diagnosed embryos. *Cell Stem Cell*, **1**, 568-577.
- 41 Marteyn, A., Maury, Y., Gauthier, M.M., Lecuyer, C., Vernet, R., Denis, J.A., Pietu, G., Peschanski, M. and Martinat, C. (2011) Mutant human embryonic stem cells reveal neurite and synapse formation defects in type 1 myotonic dystrophy. *Cell Stem Cell*, **8**, 434-444.
- 42 Klinglmueller, F., Tuechler, T. and Posch, M. (2011) Cross-platform comparison of microarray data using order restricted inference. *Bioinformatics*, **27**, 953-960.
- 43 Becanovic, K., Pouladi, M.A., Lim, R.S., Kuhn, A., Pavlidis, P., Luthi-Carter, R., Hayden, M.R. and Leavitt, B.R. (2010) Transcriptional changes in Huntington disease identified using genome-wide expression profiling and cross-platform analysis. *Hum Mol Genet*, **19**, 1438-1452.
- 44 Peter Giles, L.E., Gemma V. Higgs, Simon P. Brooks, Stephen B. Dunnett and Jones, a.L. (2011) Longitudinal analysis of gene expression and behaviour in the HdhQ150 mouse model of Huntington's disease. *Brain Research Bulletin*, (in press).
- 45 Ohi, Y., Qin, H., Hong, C., Blouin, L., Polo, J.M., Guo, T., Qi, Z., Downey, S.L., Manos, P.D., Rossi, D.J. *et al.* (2011) Incomplete DNA methylation underlies a transcriptional memory of somatic cells in human iPS cells. *Nat Cell Biol*, **13**, 541-549.
- 46 Hussein, S.M., Batada, N.N., Vuoristo, S., Ching, R.W., Autio, R., Narva, E., Ng, S., Sourour, M., Hamalainen, R., Olsson, C. *et al.* (2011) Copy number variation and selection during reprogramming to pluripotency. *Nature*, **471**, 58-62.
- 47 Gore, A., Li, Z., Fung, H.L., Young, J.E., Agarwal, S., Antosiewicz-Bourget, J., Canto, I., Giorgetti, A., Israel, M.A., Kiskinis, E. *et al.* (2011) Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells. *Nature*, **471**, 63-67.

- 48 Okita, K., Ichisaka, T. and Yamanaka, S. (2007) Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*, **448**, 313-317.
- 49 Kaltenbach, L.S., Romero, E., Becklin, R.R., Chettier, R., Bell, R., Phansalkar, A., Strand, A., Torcassi, C., Savage, J., Hurlburt, A. *et al.* (2007) Huntingtin interacting proteins are genetic modifiers of neurodegeneration. *PLoS Genet*, **3**, e82.
- 50 Damiano, M., Galvan, L., Deglon, N. and Brouillet, E. (2010) Mitochondria in Huntington's disease. *Biochim Biophys Acta*, **1802**, 52-61.
- 51 Baughman, J.M., Nilsson, R., Gohil, V.M., Arlow, D.H., Gauhar, Z. and Mootha, V.K. (2009) A computational screen for regulators of oxidative phosphorylation implicates SLIRP in mitochondrial RNA homeostasis. *PLoS Genet*, **5**, e1000590.
- 52 Law, I.K., Liu, L., Xu, A., Lam, K.S., Vanhoutte, P.M., Che, C.M., Leung, P.T. and Wang, Y. (2009) Identification and characterization of proteins interacting with SIRT1 and SIRT3: implications in the anti-aging and metabolic effects of sirtuins. *Proteomics*, **9**, 2444-2456.
- 53 Colin, E., Regulier, E., Perrin, V., Durr, A., Brice, A., Aebischer, P., Deglon, N., Humbert, S. and Saudou, F. (2005) Akt is altered in an animal model of Huntington's disease and in patients. *Eur J Neurosci*, **21**, 1478-1488.
- 54 Seo, M., Lee, W.H. and Suk, K. (2010) Identification of novel cell migration-promoting genes by a functional genetic screen. *FASEB J*, **24**, 464-478.
- 55 Gauthier, L.R., Charrin, B.C., Borrell-Pages, M., Dompierre, J.P., Rangone, H., Cordelieres, F.P., De Mey, J., MacDonald, M.E., Lessmann, V., Humbert, S. *et al.* (2004) Huntingtin controls neurotrophic support and survival of neurons by enhancing BDNF vesicular transport along microtubules. *Cell*, **118**, 127-138.
- 56 Yu, J., Yu, L., Chen, Z., Zheng, L., Chen, X., Wang, X., Ren, D. and Zhao, S. (2002) Protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase interacts with protein kinase A inhibitors. *Brain Res Mol Brain Res*, **99**, 145-149.
- 57 Kasyapa, C., Gu, T.L., Nagarajan, L., Polakiewicz, R. and Cowell, J.K. (2009) Phosphorylation of the SSBP2 and ABL proteins by the ZNF198-FGFR1 fusion kinase seen in atypical myeloproliferative disorders as revealed by phosphopeptide-specific MS. *Proteomics*, **9**, 3979-3988.
- 58 Zhai, G., Teumer, A., Stolk, L., Perry, J.R., Vandenput, L., Coviello, A.D., Koster, A., Bell, J.T., Bhasin, S., Eriksson, J. *et al.* (2011) Eight common genetic variants associated with serum DHEAS levels suggest a key role in ageing mechanisms. *PLoS Genet*, **7**, e1002025.
- 59 Zhai, W., Jeong, H., Cui, L., Krainc, D. and Tjian, R. (2005) In vitro analysis of huntingtin-mediated transcriptional repression reveals multiple transcription factor targets. *Cell*, **123**, 1241-1253.
- 60 Chambers, S.M., Fasano, C.A., Papapetrou, E.P., Tomishima, M., Sadelain, M. and Studer, L. (2009) Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nat Biotechnol*, **27**, 275-280.
- 61 Author (2008).

## **ABBREVIATIONS**

hPSC: Human pluripotent stem cell

polyQ: Polyglutamine

hESC: Human embryonic stem cell lines

PGD: pre-implantation genetic diagnosis

R-NSC: Rosette-Neural stem cells

NSC: Neural stem cell lines

HD-hiPSC: Huntington's disease patient-derived induced pluripotent stem cells

HDj-hiPSC: Juvenile onset Huntington's disease patient-derived induced pluripotent stem cells

18Q: N-terminal fragment (171 amino acids) of the huntingtin protein

82Q: N-terminal fragment (171 amino acids) of the mutant huntingtin protein

DHEAS : Serum dehydroepiandrosterone sulphate ( )

## ➤ Expériences supplémentaires :

### **Effet de la perte d'expression allèle spécifique de la HTT mutante sur la vitesse de transport des vésicules de BDNF dans les neurites de neurones différenciés à partir de NSC-MH.**

Dans le cadre d'une collaboration avec Valérie Drouet, Marta Ruiz, Diana Zala, Gwenaëlle Auregan, Raymonde Hassig, Noelle Dufour, Anselme L Perrier, Frédéric Saudou, Philippe Hantraye, et Nicole Déglon

Les techniques visant à réduire les niveaux intracellulaires de l'ARNm de la mut-HTT à l'aide de l'interférence ARN pourraient stopper, ou du moins retarder le processus de mort neuronale et constituent une stratégie prometteuse pour la thérapie des maladies polyglutamine (Xia, Mao et al. 2004 ; Chen, Kren et al. 2005 ; Harper, Staber et al. 2005 ; Huang and Kochanek 2005 ; Rodriguez-Lebron, Denovan-Wright et al. 2005 ; Wang, Liu et al. 2005 ; Machida, Okada et al. 2006 ; DiFiglia, Sena-Esteves et al. 2007 ; Gary, Davidson et al. 2007), (Huang, Schiefer et al. 2007). Dans leur très grande majorité, ces études ne discriminent pas les allèles de type sauvage et mutant et donc induisent aussi bien une diminution du niveau de protéine HTT mutante (perte de fonction toxique désirée) que sauvage (perte de fonction normale non désirable). Récemment, plusieurs groupes ont démontré que la perte d'expression des deux allèles de la HTT est bien tolérée *in vivo* mais avec des conséquences fonctionnelles inconnues (Boudreau, McBride et al. 2009; Drouet, Perrin et al. 2009 ). L'objectif de ce projet collaboratif est de profiter du modèle HD-hESC pour mettre au point une perte d'expression ciblée de l'allèle mutant de la HTT.

Les polymorphismes nucléotidiques simples (SNP) sont utilisés pour discriminer les transcrits de type sauvage et mutant de maladies à répétitions CAG (Miller, Xia et al. 2003 ; Xia, Mao et al. 2004 ; Alves, Regulier et al. 2008). L'identification d'une seule base variant entre les ARN messagers de l'allèle sauvage et de l'allèle mutant permet de profiter de la spécificité du mécanisme d'interférence ARN pour cibler spécifiquement l'un ou l'autre des allèles. Pour la MH, des études récentes ont indiqué que le choix de cinq ARN interférents ciblant trois SNP serait suffisant pour traiter 75% des patients atteints par la MH, confirmant l'intérêt de l'approche (Lombardi, Jaspers et al. 2009; Pfister, Kennington et al. 2009 ). Pour évaluer l'efficacité thérapeutique et la sélectivité des siRNA et shRNA ciblant ces SNP *in vivo*, les modèles disponibles ne sont pas entièrement appropriés. En effet, les modèles de souris Knock-In n'expriment pas la HTT humaine et des modèles transgéniques exprimant de courts fragments N-terminaux de la HTT humaine ne contiennent pas les SNP correspondants (voir Tableau 4). Les souris BAC-HD, les seules à exprimer une HTT humaine de taille entière n'expriment qu'un seul allèle humain, permettant l'analyse de l'efficacité, mais pas celle de la sélectivité qui est un aspect important de la stratégie de perte d'expression allèle spécifique. Pour surmonter ce problème, l'équipe du docteur Nicole Déglon a développé de nouveaux modèles de la MH fondés sur l'expression lentivirale d'allèles chimériques de la HTT, portant les SNP les plus fréquents au sein de la population humaine et présentant un taux d'hétérozygotie satisfaisant rs363125, rs362331 et rs2276881 (Lombardi, Jaspers et al. 2009; Pfister, Kennington et al. 2009 ). Nous avons fourni des

NSC-MH qui constituent un modèle idéal pour des tests fonctionnels de l'efficacité et la sélectivité des ARN interférents ciblant les SNP situés dans les exons 39, 50 et 60 du gène de la HTT humaine.

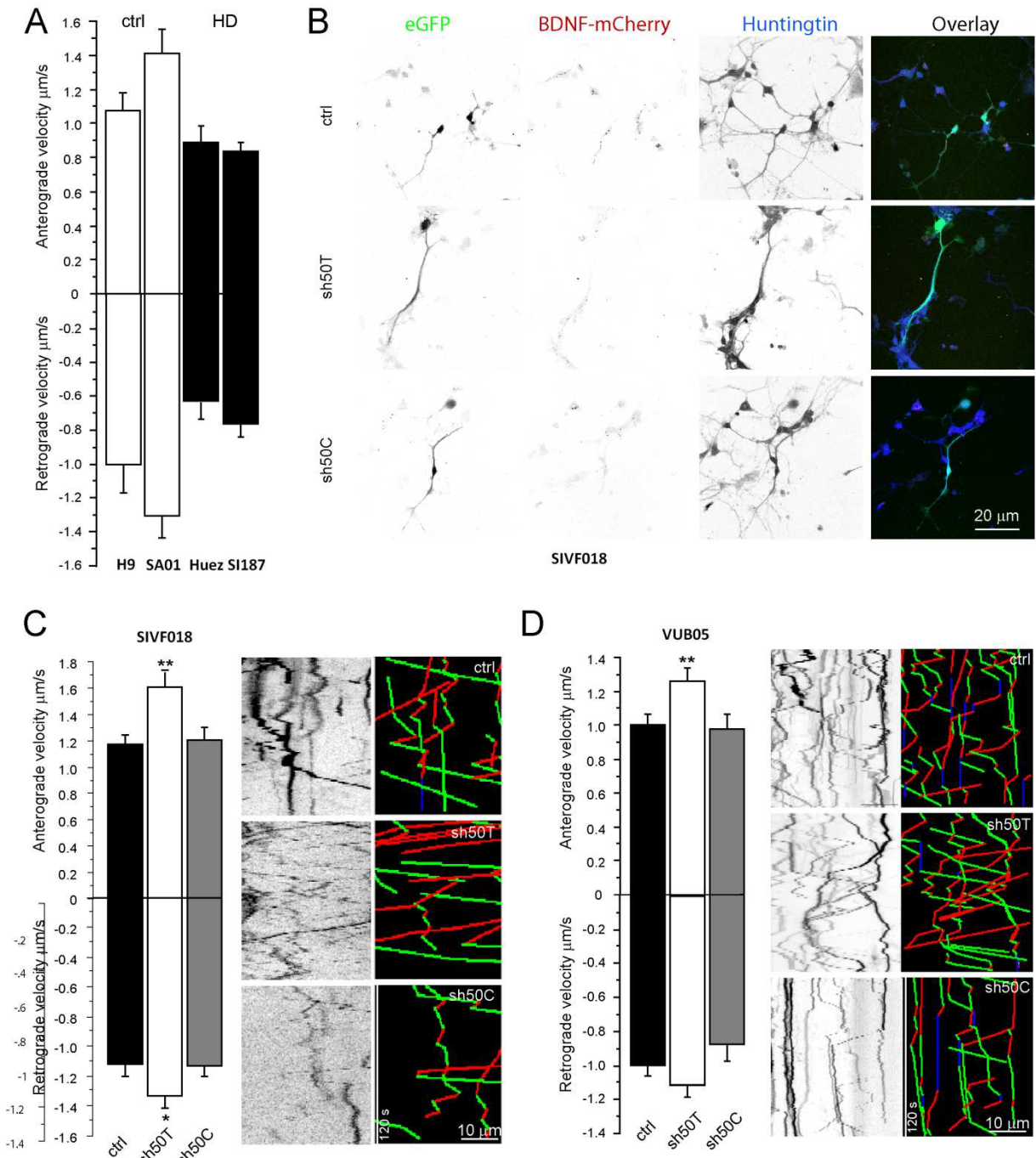
Afin d'identifier un défaut fonctionnel pouvant potentiellement être corrigé par perte d'expression spécifique de la HTT mutante, nous avons mesuré, au sein de nos NSC-MH, l'effet de la mutation de la MH sur le transport vésiculaire du BDNF. Chez la souris, la phosphorylation par AKT de la sérine 421 de la HTT joue un rôle régulateur important dans la vitesse de transport du BDNF le long des axones (Gauthier, Charrin et al. 2004). Notre étude initiale du transport du BDNF dans des neurones issus de NSC-MH et contrôles a montré que notre modèle cellulaire reproduisait bien le défaut de transport du BDNF lié à la mutation (voir Figure 22), et la fonction régulatrice d'AKT, activée par IGF1 (voir Figure 23). L'IGF1 induit en effet une augmentation de phosphorylation de la sérine 421 HTT via l'activation de AKT (Zala, Colin et al. 2008). Une fois le défaut fonctionnel de transport du BDNF identifié dans notre modèle, nos travaux ont porté sur la validation fonctionnelle de l'efficacité d'une perte d'expression allèle spécifique de la HTT mutante. Ce programme de recherche dirigé par N. Deglon fera l'objet d'un prochain article.

L'équipe du docteur Nicole Deglon a développé trois couples de siRNA ciblant les SNP rs363125 (exon 39, couple si39C/si39A), rs362331 (exon 50, couple si50C/si50T) et rs2276881 (exon 60, couple si60G/si60A) présents sur l'ARNm de la HTT. L'efficacité et la sélectivité de ces siRNA ont été testées au sein de culture de cellules embryonnaires de rein transformées (hEK 293 T) sur des mini-gènes chimériques associant les 171 premiers acides aminés de la HTT humaine contenant 82 répétitions CAG fusionnés à une petite séquence exonique contenant les exons des SNP rs363125, rs362331 ou rs2276881. De notre côté, nous avons identifié les polymorphismes nucléotidiques simples (SNP) compatibles avec une stratégie de ciblage de l'ARNm par ARN interférence au sein de toutes nos lignées. Parmi les trois SNP initialement sélectionnés, celui présent sur l'exon 50 (rs362331) s'est révélé compatible avec notre étude. En effet, deux lignées mutantes (VUB05-MH et SIVF018-MH) et une lignée contrôle (SA01) sont éligibles pour cette stratégie puisqu'elles sont hétérozygotes C/T sur le SNP rs362331. Ceci permet de cibler, en théorie spécifiquement, un seul des deux allèles en utilisant un siRNA ciblant la séquence rs362331 C ou T. Afin de déterminer quel polymorphisme de l'ex50 est porté par l'allèle mutant nous avons couplé une reverse transcription réalisée avec des primers spécifiques des deux états du SNP rs362331 et une analyse de la taille de l'amplification par PCR du motif poly-CAG. L'analyse classique par séquençage de produit de PCR est rendue complexe par la distance séparant l'exon 1 (qui porte le motif polyCAG) et l'exon50 (6700 pdb). Nous avons montré que les allèles mutants de la lignée VUB05-MH (44 CAG) et de la lignée SIVF018-MH (46 CAG) sont associés avec la version T de rs362331.

Notre contribution s'est ensuite focalisée sur l'étude du couple si50C/si50T. L'objectif de notre contribution était double : tout d'abord, valider par QRT-PCR la stratégie d'extinction allèle-spécifique non plus sur un mini-gène mais sur des allèles natifs au sein d'un génome humain intègre ; Ensuite, de mesurer l'impact de cette extinction allèle spécifique sur le défaut de transport du BDNF dans les neurones mutants. De façon intéressante, cette approche a montré une augmentation de la vitesse de déplacement des vésicules de BDNF lorsque l'expression de l'allèle mutant est diminuée, alors que la perte d'expression de l'allèle sauvage n'a pas d'effet significatif (voir Figure 22).

Bien que l'étude soit encore inachevée, les résultats obtenus jusqu'à présent sont très encourageants pour les perspectives de thérapies de la MH sur la base d'une perte d'expression de la protéine mutante chez le patient *in situ*. De plus, ils valident la pertinence des neurones dérivés de notre modèle pluripotent, qui sont capables de récapituler une signature cellulaire pathologique de la MH.

Nos résultats obtenus par nucléofection de plasmides dans des neurones issus de NSC-MH n'ont pas pour l'instant pu être associés à la capacité de vecteurs lentiviraux portant le même shRNA à diminuer l'expression de l'allèle mutant dans des cultures de NSC prolifératives. Un faible taux de transfection est satisfaisant pour les analyses de transport du BDNF car les mesures sont faites sur une seule cellule. Le faible taux de transfection rend impossible l'analyse de la perte d'expression spécifique d'un allèle de la HTT au sein de la population de neurones. Ces travaux sont donc encore en cours et leur aboutissement offrirait un outil précieux pour la poursuite de la modélisation pathologique de la MH.



**Figure 22 : Vitesse du transport vésiculaire du BDNF dans les NSC dérivées de hESC.**

A : vitesse de transport vésiculaire antérograde et rétrograde au sein des neurones dérivés de deux lignées de NSC normales (H9, SA01) et de deux lignées mutantes (Huez et SI187). B : expression de la HTT, des transgènes antisens ciblant le SNP rs362331 de l'exon 50 (eGFP), et de BDNF-cherry dans les neurones issus de la lignée mutante SIVF018-HD. C et D : Effet des siRNA ciblant les allèles 50T (allèles mutants) et 50C (allèles normaux) au sein des neurones issus des lignées mutantes SIVF018 et VUB05, respectivement.



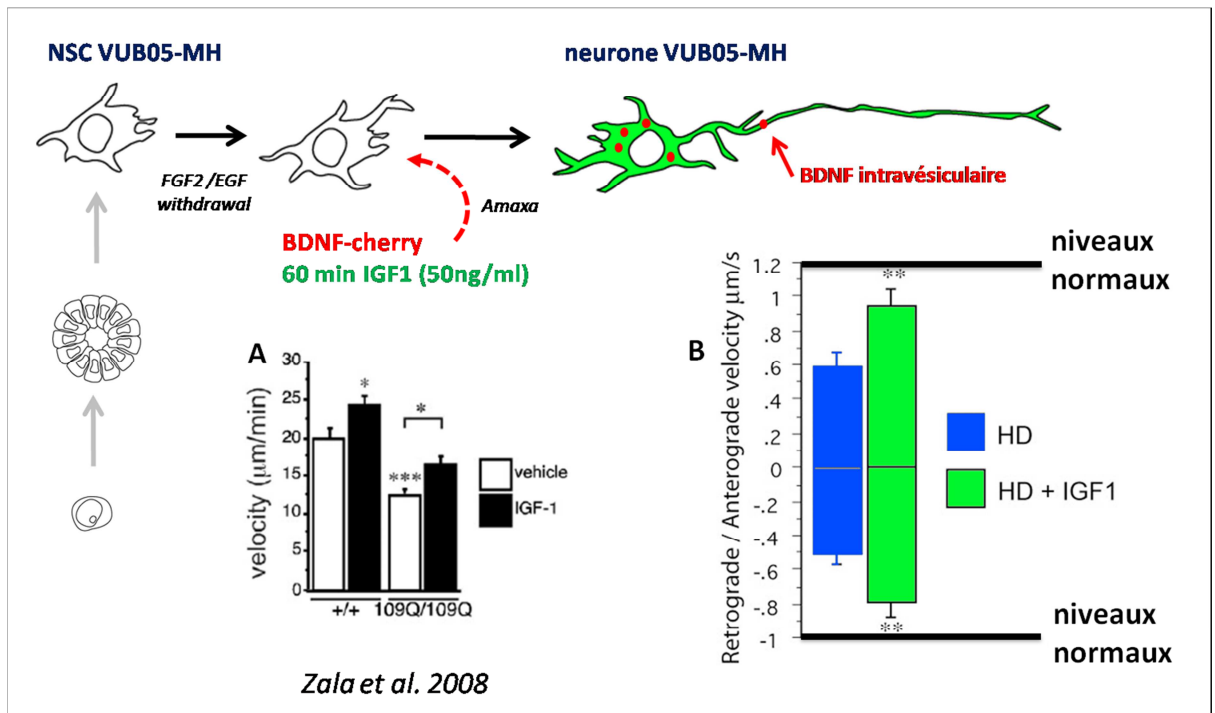


Figure 23 : L'activation de la voie de signalisation IGF1/Akt améliore le défaut de transport du BDNF dans les neurones dérivés de hESC-MH

A : récupération partielle de la vitesse de transport du BDNF par stimulation du signal IGF-1 dans un modèle de souris de la MH. B : récupération partielle de la vitesse de transport du BDNF par stimulation du signal IGF-1 au sein des neurones dérivés de NSC issus de la lignée hESC mutante VUB05.



# DISCUSSION



## 1) L'approche transcriptomique

### Le choix des types cellulaires impliqués dans notre étude

La maladie de Huntington est une maladie caractérisée par une neurodégénérescence progressive et une déclaration clinique à l'âge adulte. Dans ce cadre, le choix du phénotype hESC et d'un phénotype neural immature multipotent (NSC) pour une étude transcriptomique différentielle peut paraître surprenant. Il existe cependant plusieurs arguments en faveur d'un tel choix. Tout d'abord, ce choix a été guidé par la disponibilité « pragmatique » du type cellulaire pluripotent, qui est à la base de l'ensemble de l'activité de l'institut. Il est notable que le transcriptome des hESC est très homogène entre lignées (voir article n°1), ce qui favorise la détection de perturbations transcriptionnelles. De plus, les cellules hESC présentent un profil transcriptionnel particulier, où la fraction du génome complètement réprimée par les modifications épigénétiques (hétérochromatine) est exceptionnellement faible. Cet état est interprété comme favorisant la différenciation vers les lignées cellulaires qui formeront l'organisme, ce qui est la fonction physiologique des cellules pluripotentes. Leur profil de transcription particulier fait qu'ils expriment, même faiblement une fraction importante des gènes humains (Gaspar-Maia, Alajem et al. 2011). Des modifications transcriptionnelles concernant les atteintes non neuronales de la MH pourraient ainsi être révélées. Au cours de la différenciation, la régulation transcriptionnelle verrouillera des zones hétérochromatiniennes et euchromatiniennes dans les progénies des hESC, générant les profils transcriptionnels distincts des différents lignages cellulaires. La pathologie de la maladie de Huntington révèle l'existence de symptômes non neuronaux, notamment métaboliques qui pourraient jouer un rôle dans l'évolution de la maladie. Il est donc raisonnable de considérer que l'analyse des perturbations transcriptionnelles causées par la MH au sein des cellules pluripotentes peut apporter des informations pertinentes pour la pathologie.

Nous avons choisi les cellules souches neurales (NSC) dérivées des hESC comme second type cellulaire d'intérêt pour les études transcriptomiques. Là encore il s'agit du choix pragmatique d'un type cellulaire le plus mature possible au cours de la différenciation neuronale, que l'on peut produire massivement en culture et suffisamment homogène pour des analyses transcriptomiques. Les NSC représentaient au cours de ma thèse le meilleur compromis entre faisabilité et pertinence parmi les phénotypes neurales accessibles à partir des hESC. La différenciation astrocytaire des hESC est mal maîtrisée. Le seul protocole à notre disposition est peu robuste et ne produit pas de cellules en nombre suffisant tout en exigeant une durée de différenciation dépassant 120 jours ce qui rend très difficile son utilisation pour notre étude. Il semblerait que les NSC issues de cellules souches pluripotentes gardent un phénotype immature et n'acquièrent pas aussi rapidement que leur contrepartie fœtale et post-natale une plus forte gliogénicité (Patterson, Chan et al. 2011). Nous n'avons donc pas pu nous intéresser aux perturbations transcriptionnelles présentes dans ces populations qui participent pourtant à la pathologie. Cependant, le développement récent de protocoles de différenciation astrocytaire à partir de hESC (Emdad, D'Souza et al. 2011) présente un intérêt majeur pour la modélisation pathologique de la MH.

L'étude des perturbations transcriptomiques au sein des neurones exprimant DARRP32, les neurones moyens épineux qui sont les plus rapidement affectés dans la maladie, n'a pas été mise en place. En

effet, bien que la production à partir de hPSC de neurones exprimant DARPP32 soit possible (Aubry, Bugi et al. 2008) et maîtrisée dans l'équipe, le protocole disponible pour l'instant ne fournit pas une population homogène, ni même une population neuronale avec une proportion fixe de MSN. L'utilisation de population de neurones au sens large n'a pas non plus été retenue pour les études transcriptionnelles à cause de la variabilité entre lignées des différenciations neuronales, incompatible avec l'approche transcriptomique. Une faible différence de rythme de différenciation neuronale se traduit par des cultures dont la composition cellulaire est trop variable.

Au-delà de nos travaux, d'autres phénotypes pourraient être pertinents pour conduire les mêmes analyses transcriptomiques différentielles. La différenciation musculaire squelettique reste inaccessible à ce jour à partir de hESC, cependant l'analyse des cellules souches mésenchymateuses dérivées de hESC pourrait se révéler pertinente pour l'étude des atteintes périphériques de la MH. L'atteinte testiculaire de la MH est déjà potentiellement modélisable directement avec le stade hESC puisque les lignées de tératocarcinomes embryonnaires, qui sont les premières cellules pluripotentes à avoir été accessibles en culture ont été dérivées de tumeurs testiculaires.

### **Analyses sur neurones différenciés**

Les résultats obtenus à l'aide des NSC ont été partiellement analysés en se limitant à une lignée mutante et une lignée contrôle. La raison de cette limitation est simple, les variations de vitesse de maturation neuronale entre lignées sont importantes (de 15 à 30 jours pour l'acquisition par une très grande majorité des cellules de la morphologie neuronale). La contamination des cultures de neurones par des cellules immatures aurait un effet très important sur les résultats transcriptomiques. De plus, la culture à long terme des neurones s'accompagne d'une survie relativement faible, ce qui pose des problèmes de quantité de matériel nécessaire aux études biochimiques. Il faut noter que les variations de vitesse de différenciation neuronale ne sont pas corrélées avec la présence ou l'absence de la mutation causale de la maladie. Ces résultats contredisent les constatations de l'équipe de David Cram à l'Université Monash de Victoria en Australie selon lesquelles les lignées de hESC-MH ne se différencient pas aussi bien en cellules neurales que leurs contreparties normales (Niclis, Trounson et al. 2009). Cependant, ces résultats ne s'appuient que sur trois lignées et n'indiquent un effet limitant la différenciation neurale que dans une lignée, celle correspondant à la mutation la plus sévère (51) CAG. Nos constatations sur les 13 lignées que nous avons manipulées, et qui incluent une lignée portant 70 répétitions CAG, indiquent un effet indépendant de la nature mutante ou normale des lignées concernées. L'analyse de nos gènes candidats au niveau neuronal étant d'une importance évidente, nous avons néanmoins choisi d'étudier deux lignées cellulaires pour lesquelles la chronologie de différenciation neuronale était comparable (SA01 et SIVF018). De façon encourageante, des résultats préliminaires obtenus à la fin de ma thèse permettent de penser que l'utilisation d'inhibiteurs de la voie Notch pourrait permettre de synchroniser la différenciation neuronale des lignées NSC. Il deviendrait alors possible de dépasser les limitations imposées par les variations de vitesses de maturation neuronale entre lignées et d'utiliser un phénotype neuronal synchrone pour poursuivre nos études. Le comportement de nos candidats au sein de neurones post-mitotiques est d'une importance capitale pour leur pertinence *in vivo*. In fine, il reste le problème de

l'identification des sous-types neuronaux obtenus par le processus de différenciation terminale des NSCs et de leur homogénéité entre lignées.

### **Les gènes candidats**

Les critères stricts de significativité ( $p$ -value  $< 0.00001$  et un facteur multiplicateur de l'expression (fold change) minimal de 2) identifient sept gènes (CHCHD2, EEF1G, TRIM4, GALR2, PKIB, ABHD12B et SOX8) présentant des niveaux d'ARNm différents entre lignées mutantes et contrôles. Parmi la sélection de gènes issus de nos listes Illumina, GALR2, ABHD12B ont été significativement confirmés seulement au stade hESC. Il a été démontré que GALR2 est impliqué dans la différenciation et la survie neuronale (Shen, Yuan et al. 2005 ; Tofighi, Joseph et al. 2008). Des modèles de souris Knock-out pour GALR2 ont montré une diminution de la croissance neuritique (Hobson, Holmes et al. 2006) et sa diminution d'expression est également impliquée dans un modèle murin de la sclérose en plaque (Hobson, Bacon et al. 2010). ABHD12B est aussi impliqué dans une pathologie neurodégénérative (Fiskerstrand, H'Mida-Ben Brahim et al. 2010). Comme nous l'avons évoqué précédemment, les gènes candidats, pour lesquels les perturbations transcriptionnelles n'ont été détectables que dans le cadre du phénotype pluripotent, pourraient refléter des mécanismes pathologiques pertinents. Cependant, l'étude mécanistique du rôle pathologique de ces perturbations transcriptionnelles est rendue complexe par la difficulté pratique de modifier génétiquement les cellules pluripotentes et des conditions de cultures relativement contraignantes.

Une alternative possible pour s'intéresser au rôle périphérique possible de GALR2, ABHD12B serait l'étude de leur régulation par la HTT-mut au sein des cellules souches mésenchymateuses, type cellulaire dont la différenciation à partir des hESC est maîtrisée au laboratoire. L'analyse des gènes candidats pour lesquels la dérégulation est cohérente entre hESC et NSC a été pragmatiquement privilégiée. J'ai donc choisi de poursuivre l'étude des gènes CHCHD2, TRIM4, PKIB au sein des NSC, dont la manipulation en culture est plus aisée que les hESC, et qui sont notablement plus homogènes que les neurones accessibles avec les protocoles actuels.

CHCHD2, TRIM4 et PKIB sont en fait régulés de façon comparable aux deux stades de différenciation. D'une certaine façon, cette constatation renforce la crédibilité de l'approche consistant à comparer les ARNm des populations pluripotentes mutantes et contrôles. Il semble raisonnable de penser que les candidats qui présentent une dérégulation au niveau des ARNm, aussi bien au stade hESC qu'au stade NSC, correspondent à une perturbation plus robuste que ceux qui sont spécifique d'un des deux phénotypes. La modification génétique des cellules hESC est complexe, notamment de par leur propension à pousser en colonies et à fortement diminuer l'expression des transgènes. Ces gènes seront détaillés ci-dessous.

### **Cohérence avec les autres études transcriptomiques de la MH**

Il n'est pas surprenant de constater la divergence entre notre étude transcriptomique différentielle et l'ensemble des études précédentes. Cette approche a été utilisée par de nombreuses études de dérégulations transcriptionnelles dans des contextes très variés : chez le patient (Borovecki, Lovrecic et al. 2005 ; Hodges, Strand et al. 2006), au sein des modèles souris de la MH, notamment R6/1 et R6/2 (Iannicola, Moreno et al. 2000 ; Luthi-Carter, Strand et al. 2000; Ferrante, Kubilus et al. 2003 ;

Benn, Landles et al. 2005 ; Morton, Hunt et al. 2005 ; Crocker, Costain et al. 2006 ; Desplats, Kass et al. 2006 ) et au sein de modèles cellulaires basés sur des cultures transgéniques de PC12 et/ou de ST14a (Wyttenbach, Swartz et al. 2001 ; Sipione, Rigamonti et al. 2002 ; Apostol, Illes et al. 2006). La pathologie étant principalement cérébrale (Vonsattel, Myers et al. 1985), le cerveau est l'organe où les changements d'expression des gènes sont les plus prononcés. Logiquement, un degré important de convergence des signatures transcriptomiques des cerveaux de patients atteints de MH et des modèles animaux de la MH a été établi (Kuhn, Goldstein et al. 2007). Néanmoins, comme nous l'avons évoqué dans l'introduction, la nature des modèles précédemment étudiés est fondamentalement différente. En effet, les modèles murins correspondent à une évolution rapide de la maladie, plus proche de la forme juvénile de la MH et rendant l'étude d'un état précoce difficile. A l'opposé, l'évolution des événements au sein de notre modèle est probablement plus lente, en particulier à cause de nombres de CAG associés à des déclenchements à l'âge adulte de la MH. De même, les études transcriptomiques (concernant l'ensemble des transcrits) réalisées chez l'Homme ne l'ont pas été sur des tissus nerveux à des stades précoces, à cause de l'accès très limité aux échantillons de patients correspondants. Dans des tissus cérébraux de patients symptomatiques, la mort neuronale est déjà très importante (50 % au grade 1 à plus de 90 % au grade 3-4). Les mécanismes pathologiques détectable dans ces tissus sont donc logiquement tardifs, c'est-à-dire des conséquences secondaires voire ultimes des cascades moléculaires initialement engagées par la mutation. L'impact du biais de compositions des tissus de patients sur l'expression des gènes peut jouer un rôle très important dans la détection des modifications transcriptionnelles et des techniques d'analyses complexes cherches à prendre en compte ce facteur (Kuhn, Thu et al. 2011). Ainsi un gène, dont l'expression serait augmentée dans les MSNs, ne sera vraisemblablement jamais détectable comme tel à partir d'échantillons de patients étant donné la disparition massive de ce type cellulaire. Les mécanismes précoces, que l'on peut supposer plus à même d'être stoppés ou ralentis par une approche pharmacologique que ceux plus tardifs, ne sont donc probablement plus analysables au stade terminal de la MH. On peut s'attendre à ce que les événements liés à la mort cellulaire elle-même masquent ces mécanismes par les profondes modifications cellulaires causées par l'apoptose.

Les stades symptomatiques humains correspondent à une mort neuronale avancée, et représentent donc un tissu pour lequel le biais de composition par rapport à un cerveau sain est très important. Notre modèle combine un contexte génétique humain naturellement porteur de répétitions CAG causant la MH et l'accès à des événements pathologiques précoces. Malgré l'absence de recouvrements nos listes avec les études précédemment menées, les catégories de gènes affectées sont cohérentes avec les principales fonctions altérées par la maladie (métabolisme mitochondrial, transduction du signal, trafic intracellulaire, fonction synaptique).

### **Combien de lignées cellulaires pour modéliser une pathologie génétique?**

Il faut reconnaître une faiblesse intrinsèque de notre approche : le nombre de lignées de hESC-MH accessibles pour la modélisation est très restreint et notre cohorte n'en contient que 6. Ce chiffre est faible, bien que très supérieur à celui utilisé dans la majorité des études de modélisation pathologique



à partir de cellules souches humaines (embryonnaires ou induites à la pluripotence). En conséquence, la puissance statistique de nos expériences est limitée en comparaison de l'analyse d'Angela Hodges et ses collaborateurs, sur la base d'échantillons issus de 44 cerveaux de malades et de 36 cerveaux sains. Pour compenser le faible nombre de hESC-MH disponibles, nous avons utilisé deux types cellulaires différents et réalisés des quadruplets de réplicats cultivés indépendamment pour chaque condition analysée, portant à 48 le nombre d'échantillons de notre étude. Nous avons par ailleurs analysé l'impact de la perte d'expression de la HTT et du gain de fonction d'allèles mutants modèles pour évaluer la pertinence de gènes candidats jamais encore décrits dans le cadre de la MH. Nous avons utilisé un total de onze lignées hESC pour nos études (lignées contrôles comprises). Ce chiffre peut paraître dérisoire au regard des cohortes utilisées lorsque des analyses transcriptomiques sont faites sur les échantillons de patients. Néanmoins, ces onze lignées correspondent à onze contextes génomiques différents, ce qui au regard des analyses faites sur les modèles murins, génétiquement très homogènes, représente une opportunité d'écarter des effets liés au biais génomique. Ceci dit, nous avons observé que l'augmentation progressive de notre cohorte de lignées a eu un impact important sur le contenu des listes de gènes signalés comme significativement dérégulés par l'analyse des puces à ADNc. En conséquence, et malgré les coûts imposés par la génération de lignées de hPSC, leur culture et la multiplication des échantillons analysés par puce, il paraît raisonnable de penser que l'utilisation de six lignées mutantes pour des études de comparaison transcriptomique est loin d'être superflu. Je pense d'ailleurs que la tendance actuelle à générer des lignées hiPS d'un unique patient pour servir de base cellulaire à la modélisation pathologique de maladies monogéniques et *a fortiori* polygéniques est une stratégie hasardeuse.

## 2) Etude des gènes candidats

A l'aide de onze lignées de cellules hESC, nous avons identifié de nouveaux gènes dont l'expression est affectée par la présence d'un allèle muté de HTT. Ces gènes sont potentiellement liés à des mécanismes pathologiques déjà connus de la maladie de Huntington, mais n'ont jamais été décrits auparavant. La signature transcriptomique de notre modèle est atypique et ne recouvre pas du tout celle des autres modèles de la maladie ou des échantillons de cerveaux de patients. En pratique, la comparaison des 200 premiers gènes différentiellement exprimés dans le noyau caudé, le cortex et le cervelet des patients et dans nos deux populations issues de hESC-HD, n'identifie que un gène conservé : ARRB1. Cette différence est une chance de jeter un regard nouveau sur les modifications transcriptionnelles dans le cadre de la maladie de Huntington. Notre modèle pourrait potentiellement ouvrir un nouveau champ d'analyses, centré sur les événements transcriptionnels précoces de la MH. L'évolution très rapide de la maladie dans des modèles de rongeurs a été un atout important pour mieux comprendre la MH. Mais le revers de la médaille est la difficulté d'en étudier les processus précoces. Étant donné la nature dégénérative de la MH et la complexité des défis thérapeutiques posés par la perte massive de neurones, l'une des perspectives les plus prometteuses dans le traitement pharmacologique de la MH serait de bloquer précocement la cascade d'événements causant la mort neuronale. Un modèle bien adapté à l'évaluation des premiers événements pathologiques pourrait donc être très intéressant pour la conception de ce type de thérapies visant à ralentir ou idéalement stopper l'évolution pathologique. Cette approche ne peut pas aborder la question des patients déjà symptomatiques, mais ne doit pas être négligée dans le contexte d'une maladie héréditaire, offrant l'opportunité d'un traitement pré-symptomatique. Considérant le fait que les événements transcriptionnels débutent en amont des symptômes cliniques et de la mort neuronale, l'étude plus poussée des biomarqueurs présentés ici pourrait se révéler très utile au traitement de la MH.

Ainsi, on peut espérer que ces gènes soient des acteurs clés des mécanismes précoces de la maladie. Pourtant, même s'ils ne sont que des marqueurs de ces événements, leur intérêt n'est pas pour autant négligeable, notamment pour l'évaluation du potentiel d'approches thérapeutiques ciblant les stades précoces de la maladie. Il est donc important de comprendre les relations qui lient ces gènes entre eux et à l'expression de la HTT mutante. Pour correctement étudier les mécanismes pathologiques liés aux gènes identifiés, il faut se restreindre à un choix limité de gènes candidats. Mes critères n'ont pas été purement objectifs, les informations bibliographiques ayant largement biaisé le résultat brut fourni par la reproductibilité par RT-QPCR des variations révélées par les puces.

## **Analyse de CHCHD2 (coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 2)**

CHCHD2 est un candidat très intéressant expérimentalement, et qui lie directement la HTT (Kaltenbach, Romero et al. 2007). De plus CHCHD2 est lié à deux fonctions différentes connues pour être altérées dans la MH (Figure 24).

Premièrement, CHCHD2 est connecté à la voie de signalisation AKT (Seo, Lee et al. 2010), qui est perturbée dans les modèles de la MH et les patients (Colin, Regulier et al. 2005). Ce défaut de signalisation d'AKT est lié à une phosphorylation diminuée de la sérine 421 de la HTT-MH, qui à son tour diminue le transport vésiculaire du BDNF dans les neurones mutants. CHCHD2 est six fois plus exprimé par les hESC-MH et deux fois par les NSC-MH. L'expression de CHCHD2 est significativement augmentée par la perte de fonction HTT en contexte mutant, mais pas en contexte normal. De même son expression est stimulée par celle de la forme tronquée de la HTT normale, mais pas de la mut-HTT. Ceci pourrait suggérer qu'une fonction normale de la HTT serait de favoriser l'expression de CHCHD2. Tout au long de la différenciation neuronale, CHCHD2 est surexprimé en contexte mutant. De façon intéressante, les hiPS ont un comportement similaire aux hESC à ceci près que les niveaux d'expression globaux sont très faibles, au point d'être indétectables au stade pluripotent. Ce profil est cohérent avec une perte de fonction normale de la HTT-mut. CHCHD2 est donc un candidat important de notre liste, non seulement par son « score » obtenu dans notre étude (Tableau 6), mais aussi au vu des résultats obtenus en collaboration avec les équipes du docteur Nicole Deglon et de Sandrine Humbert sur la vitesse de déplacement des vésicules de BDNF. Il sera donc intéressant de tester l'influence de la modification de l'expression de ce gène sur ce système expérimental. En outre, CHCHD2 a été publié en tant que protéine capable de promouvoir la migration des cellules de manière dépendante de l'AKT (Seo, Lee et al. 2010).

Deuxièmement, la perte d'expression de CHCHD2 perturbe la phosphorylation oxydative et le métabolisme mitochondrial (Baughman, Nilsson et al. 2009). Cette fonction est peut être liée à son interaction avec SIRT1 (Law, Liu et al. 2009). Les défauts mitochondriaux sont fortement impliqués dans la MH (Damiano, Galvan et al. 2010) et dans les maladies neurodégénératives en général (Schon and Przedborski 2011). Ainsi CHCHD2 pourrait être d'un intérêt particulier dans la cascade moléculaire conduisant à des défauts mitochondriaux pour la MH. Il est à noter que la surexpression de CHCHD2 dans le contexte mutant est vérifiée transversalement dans nos expériences à l'exception du gain de fonction et est encore accentuée par la diminution d'expression de la HTT. Il serait intéressant d'analyser l'expression de CHCHD2 dans les modèles de souris au cours de l'évolution de la maladie, afin d'analyser si sa surexpression est récapitulée dans les stades précédant la mort neuronale. Compte tenu de sa capacité à augmenter le métabolisme mitochondrial et la migration cellulaire, une hypothèse intéressante serait que la surexpression de CHCHD2 pourrait transitoirement favoriser la survie cellulaire et permettrait de faire face aux effets de la mutation lors du développement et peut-être au cours des phases précoces de la maladie.

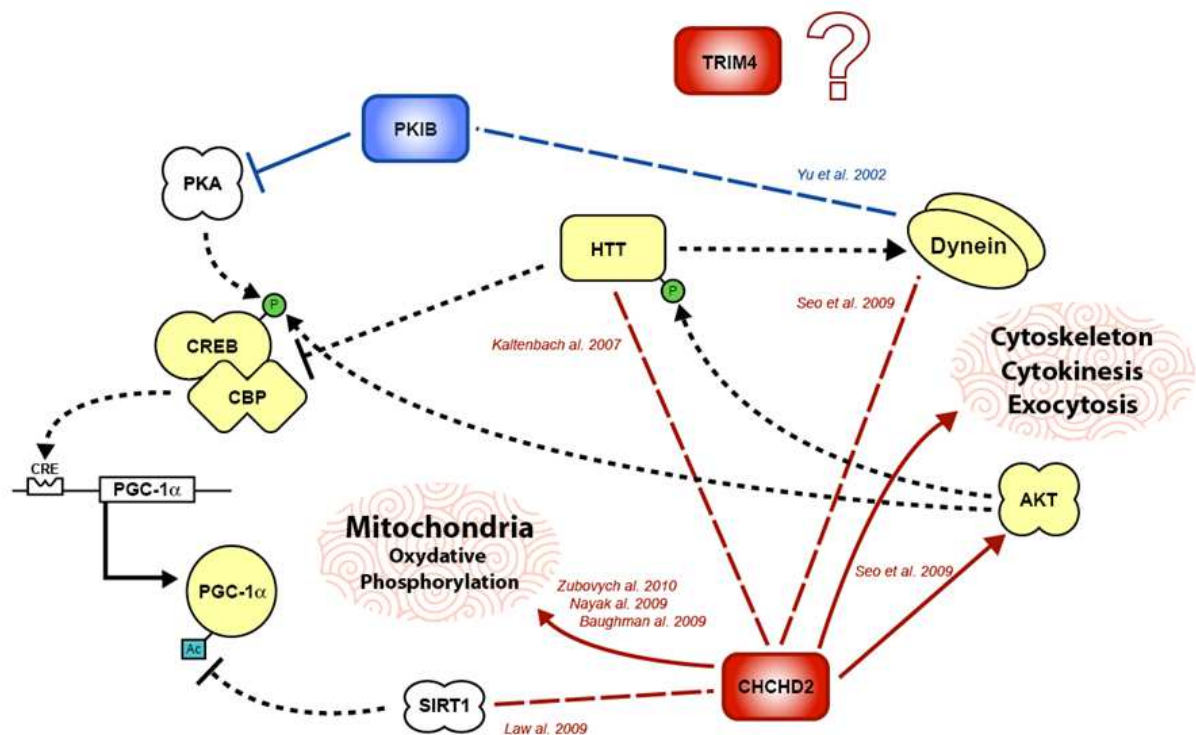


Figure 24 : Réseau des nouveaux biomarqueurs de la MH

### Analyse de PKIB (cAMP-dependent Protein Kinase Inhibitor protein $\beta$ )

La famille des PKI, des inhibiteurs de la PKA (Olsen and Uhler 1991 ; Scarpetta and Uhler 1993 ; Collins and Uhler 1997), est très exprimée dans le cerveau, le muscle strié, et les testicules (Ashby and Walsh 1972). PKIB, en particulier, est le PKI le plus exprimé dans le cerveau (Zheng, Yu et al. 2000). PKIB a été récemment impliqué dans la différenciation neuronale et sa perte de fonction semble inhiber celle-ci (Huang, Turner et al. 2011), même si la différenciation neuronale ne semble pas affectée dans notre modèle, la fonctionnalité de nos neurones n'a jamais été quantifiée, nous ne pouvons donc pas conclure quant à leur degré de maturation. Enfin la surexpression de PKIB favorise l'agressivité tumorale (Chung, Furihata et al. 2009), son expression affaiblie en contexte mutant pourrait donc avoir un lien avec la faible incidence de cancer chez les malades atteints de la MH, et avec la sensibilité accrue au stress cellulaire dans la MH (voir introduction). PKIB est 4,4 fois moins exprimé par les hESC-MH et deux fois par les NSC-MH. La diminution d'expression de la HTT diminue l'expression de PKIB. La surexpression des formes tronquées de la HTT n'a pas d'effet sur l'expression de PKIB. Lors de la maturation neuronale, PKIB est sous exprimé en contexte mutant. A nouveau, les NSC dérivées d' hiPS-MH surexpriment PKIB sans cohérence avec les hESC-MH et les neurones qui en sont dérivés. PKIB semble être l'exemple d'une perte de fonction normale de la HTT. La diminution de l'expression de PKIB en contexte mutant pourrait être impliquée au niveau des anomalies de la signalisation via AKT (Chung, Furihata et al. 2009) et de CREB, via l'inhibition de PKA. Il existe donc un faisceau de données qui font de PKIB un gène très intéressant parmi les gènes que nous avons mis en avant avec notre étude.

### **Analyse de TRIM4 (Tripartite Motif containing 4)**

TRIM4 fait partie de la famille des protéines TRIM, impliquées dans l'inflammation et la réponse antivirale (Kawai and Akira 2011). Très peu de publications mentionnent TRIM4. Les données les plus précises montrent qu'il est localisé au niveau de petits « corps cytoplasmiques » (Reymond, Meroni et al. 2001). Ce gène vient très récemment d'être associé dans une méta-analyse à une baisse plus rapide des concentrations de DHEA (déhydroépiandrostérone, marqueur associé au vieillissement) avec l'âge (Zhai, Teumer et al. 2011). TRIM4 est significativement surexprimé dans tous les types cellulaires étudiés (ES, NSC et neurones). L'expression de TRIM4 est significativement affaiblie par la surexpression de formes tronquées de la HTT. Cependant comparativement aux hESC, les hiPSC montrent une réponse très forte et opposée qui peut être est dû à un défaut spécifique de méthylation (Ohi, Qin et al. 2011), ou au nombre de répétitions CAG.

## **3) Mieux exploiter le modèle cellulaire**

### **Le contrôle qualitatif des modèles cellulaires pathologiques**

Au cours de ma thèse, il est devenu évident que les cellules hESC présentent au même titre que toute autre culture cellulaire *in vitro* une instabilité génomique (Lefort, Feyeux et al. 2008). La relative stabilité génomique des hESC est probablement due à l'expression naturelle de la télomérase, limitant ainsi les réarrangements chromosomiques massifs qui existent dans les lignées cellulaires tumorales. Le raccourcissement à chaque division des extrémités 5' des chromosomes pour lesquelles le mécanisme de réplication ne peut synthétiser un brin complémentaire complet, est une des causes majeures de l'instabilité chromosomique des cellules tumorales. Au cours des divisions ce raccourcissement amène au déclenchement des systèmes de réparation de l'ADN qui détectent les extrémités chromosomiques non télomériques. L'action des systèmes de réparation cause dans ce contexte des fusions aberrantes de chromosomes, à l'origine d'instabilités chromosomiques dues à la ségrégation de chromosomes poly-centromériques. Chez l'Homme, et en conditions physiologiques, seules les cellules de la lignée germinale et les cellules de la masse interne du blastocyste compensent efficacement ce problème (Wong and Collins 2003). La forte expression d'une enzyme ribonucléique, la télomérase, permet la synthèse de séquences répétées aux extrémités des chromosomes (les télomères). Néanmoins, les cellules hESC ne sont pas pour autant à l'abri des mutations spontanées autres que celles déclenchées par le raccourcissement des télomères. Les hESC et leurs progénies, présentent des insertions/délétions et des translocations (voir Annexes). Les pathologies associées peuvent être de très mauvais pronostics, en particulier dans le cas de la duplication/translocation du chromosome 1q. Ce type de mutations peut être aisément vérifié par hybridation *in situ* de sondes fluorescentes. De façon générale, la recherche d'anomalies génomiques de taille similaire est possible par puces d'hybridation génomique comparative, technique relativement abordable. Pour aller plus loin, il faut noter que chez l'Homme, le taux de mutation ponctuelle par division est très faible mais supérieur à 1 mutation par génome (calculé à partir de (Nachman and Crowell 2000) et (Xue, Wang et al. 2009) en supposant une contribution équivalente des mutations maternelles et paternelles et moins de 80 cycles cellulaires entre chaque fécondations). Avec un

temps de cycle d'environ 36h (Amit, Carpenter et al. 2000) et un passage par semaine en moyenne, il y a 4,6 doublement par passage. En conséquence une lignée d'hES présentant 35 passages (ce qui est faible au vu de la littérature) présente 160 mutations par génome. Les boîtes de culture contiennent de l'ordre du million de cellules, cela représenterai une chance sur 20 pour chaque base du génome d'avoir été mutée au moins une fois dans une des cellules de la boîte. Considérant qu'il n'y a aucun système immunitaire présent pour exercer une pression de sélection, on voit facilement que l'utilisation de hESC nécessite un contrôle de leur intégrité génomique. Ainsi, comme leur séquence génomique complète est pour l'instant inaccessible, la stratégie la plus simple bien que très coûteuse reste de multiplier le nombre de lignées cellulaires de façon à limiter l'influence des mutations sur les résultats de modélisation pathologique. Le contrôle de la ressource cellulaire à proprement dit est important, mais les conditions de cultures dans lesquelles les résultats sont générés ont au moins autant d'importance. Au total, la logique et nos résultats préconisent un suivi régulier non seulement des cellules souches pluripotentes humaines mais aussi de leurs descendances, en particulier lorsque celles-ci semblent éviter la sénescence.

Si l'intégrité génomique des lignées pluripotentes doit faire l'objet d'une attention particulière, celle de leurs descendances est aussi d'une importance capitale. Cette constatation nous a conduit à limiter au maximum le nombre de cycles cellulaires de nos cellules souches neurales en amont de nos analyses. L'importance pour la modélisation pathologique reste relative car des expériences de confirmation de la pertinence des processus étudiés doivent être faites quel que soit le statut génomique des lignées.

# Perspectives





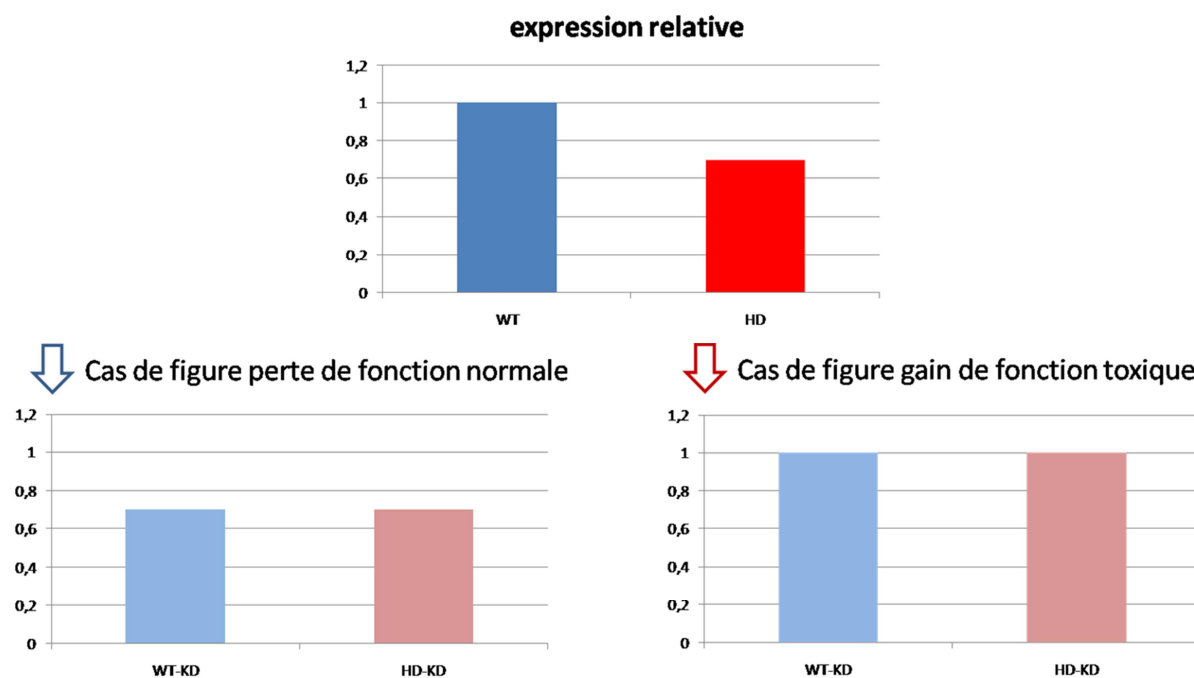
Le bilan de mon travail au laboratoire soulève de nombreux points pour lesquels une amélioration de notre approche me semble possible. L'évolution des outils d'analyse transcriptionnelle et de modification génétique ouvre des opportunités nouvelles qui changent la façon dont nous reconduirions notre étude et ouvrent aussi de nouvelles perspectives pour la poursuite de celles-ci.

## **1) Comment améliorer la validation des perturbations liées à la HTT ?**

### **I. La perte de fonction**

De façon à confirmer le lien entre une modification transcriptionnelle et la mutation, une approche classique est de diminuer l'expression du gène concerné par la mutation, ici la HTT. En effet si la modification persiste indépendamment de l'expression de la HTT, il semble alors probable que cet événement soit indépendant de la mutation. L'interprétation est en fait plus complexe, car dans le cas d'un effet dû à la perte de fonction normale de la HTT, la perte d'expression de la HTT ne changera pas ou aggravera le phénotype. L'analyse de la perte d'expression de la HTT dans un contexte mutant seul ne permet alors pas de corriger l'effet de la mutation. S'il s'agit d'un gain de fonction toxique l'effet sera inverse. Il est donc nécessaire dans ces expériences d'avoir, à la fois la perte de fonction en contexte normal et en contexte mutant. Le cas d'un gène sous exprimé en condition mutante, par un mécanisme de perte de fonction normale, ou de gain de fonction toxique est illustré en Figure 25 : un gène, dont l'expression est perturbée par gain de fonction toxique de la HTT mutante, devrait voir son expression normalisée par la perte d'expression de la HTT au sein d'une lignée mutante ; au contraire, un gène dont l'expression est perturbée par la perte de la fonction normale voit son expression perturbée par la perte d'expression de la HTT au sein d'une lignée normale. De plus la balance entre l'expression de l'allèle mutant et l'allèle normal peut probablement jouer un rôle dans l'impact de la mutation sur la cellule. De façon intéressante, la surexpression de la HTT normale joue un rôle neuroprotecteur dans un modèle murin de la MH (Van Raamsdonk, Gibson et al. 2006). Dans tous les cas l'efficacité de la perte de fonction n'est jamais totale et identifier la part d'allèle mutant et d'allèle normal exprimé en contexte natif et de perte d'expression n'est pas accessible. En conséquence, interpréter pleinement l'effet de la perte de fonction est impossible. De façon à contourner le problème nous avons cherché à obtenir une perte de fonction spécifique de chaque allèle (mutant et normal). Le ciblage de la mutation en elle-même n'est pas une stratégie optimale car un allèle jugé normal peut contenir de huit à 36 mutations (distribution quasi-normale autour de 18), et un allèle mutant au-delà de 37 mutations. Le ciblage spécifique des allèles mutants n'est donc pas véritablement possible sur la base du nombre de répétitions. Cependant le ciblage des polymorphismes nucléotidiques uniques sur les exons du gène de la Huntingtine permet théoriquement une perte d'expression ciblée de chacun des allèles. Dans le cadre d'une collaboration avec le docteur Nicole Deglon, nous avons montré les possibilités de cette approche. Néanmoins, il n'a pas été possible d'obtenir des lignées purifiées de NSC capables d'une perte d'expression ciblée de la HTT mutante ou sauvage. En effet, malgré l'accessibilité de deux lignées éligibles pour la perte de fonction ciblée de la HTT, l'absence de gène de sélection ne nous a pas permis d'étendre le succès de la mesure, à l'échelle cellulaire, de la vitesse de transport du BDNF aux analyses d'expression des gènes. Il faudrait donc développer un moyen efficace de générer des lignées

porteuses de la mutation au sein desquelles une extinction de l'expression spécifique, homogène et robuste de la HTT mutante est obtenue.



**Figure 25 : Effet de la perte d'expression de la HTT sur l'expression d'un biomarqueur en fonction de l'effet de la mutation**

Légende : bleu : niveau d'expression d'un biomarqueur en contexte normal, rouge niveau d'expression d'un biomarqueur en contexte mutant. Couleurs pastel : niveaux d'expression correspondants avec une perte d'expression de la HTT.

## II. Le gain de fonction

Au même titre que la perte d'expression de la HTT dans un contexte muté, forcer l'expression d'un allèle mutant dans un contexte normal est une stratégie de validation classique de l'effet d'une mutation. Le raisonnement est le suivant : une perturbation transcriptionnelle réellement liée à l'expression du gène mutant devrait être récapitulée par l'expression d'un allèle mutant dans une lignée normale. Néanmoins, la simplicité n'est là encore qu'apparente. En effet, Les perturbations transcriptionnelles que nous avons détectées ne correspondent probablement, ni à un stade tardif de la maladie, ni aux modèles murins ou humains de la MH. Ceux-ci sont essentiellement des modèles de gain de fonction avec une surexpression d'une version tronquée ou complète de la HTT portant un grand nombre de résidus glutamine (poly-Q). Dans les cas où la surexpression de HTT mutante tronquée récapitule l'état observé dans les NSC mutantes, l'hypothèse d'un lien direct avec la mutation est renforcée. Le cas de figure opposé est beaucoup plus délicat à interpréter. Que conclure de l'absence de validation de nos biomarqueurs par l'expérience de gain de fonction ? Malheureusement, aucune conclusion claire ne peut être tirée de cette expérience pour les résultats négatifs. Deux raisons peuvent être avancées pour soutenir ce point de vue : tout d'abord, la présence au sein d'une cellule proliférative d'une HTT à poly-Q très long n'a pas de signification pathologique *a priori* pour les formes classiques de la maladie. En effet les neurones des malades présentent une augmentation génomique du nombre de CAG qui est interprétée comme post-mitotique. En dehors

des patients atteints de la forme juvénile et des modèles murins, il n'y a donc pas de contexte pathologique qui soit le parallèle de ce modèle d'étude. Il n'est malheureusement pas possible pour l'instant d'obtenir des neurones différenciés à partir de ces populations de NSC surexprimant les formes tronquées de la HTT. En effet, il n'est pas possible avec les vecteurs disponibles au laboratoire de sélectionner ou d'enrichir ces populations. Il serait de ce point de vue utile de générer des constructions lentivirales permettant la sélection de populations transduites de façon homogène par les fragments N-terminaux de la HTT. Il faut noter que seules les approches lentivirales ont rencontré un succès robuste dans ce modèle. Ceci impose une contrainte de taille sur les constructions éligibles pour la modification génétique des NSC. En conséquence, il est plus difficilement envisageable de faire exprimer des formes entières de la HTT (mutée ou non) dans ces cellules. Par ailleurs, l'expression de la HTT mutante tronquée à des niveaux largement supérieurs aux niveaux physiologiques de la HTT normale ne permet pas de récapituler les interactions multiples de la HTT mutante non clivée. Il est donc probable que certains mécanismes pathologiques ne puissent pas être révélés par la surexpression de formes clivées de la HTT. De plus, la surexpression de formes courtes non mutantes court-circuite la régulation du clivage de la HTT qui semble jouer un rôle important dans la pathologie. Pour aller plus loin dans l'analyse de gain de fonction toxique de la HTT mutante il serait donc utile d'avoir accès à des lentivirus codant pour des formes longues des HTT normale et mutante. Il serait utile de pouvoir sélectionner des populations transduites homogènes. Enfin, ni le niveau final ni la cinétique d'expression des formes tronquées ne sont contrôlables à l'aide de ces outils. Il serait donc utile de pouvoir contrôler autant la perte que le gain de fonction dans le temps.

### **III. L'expression inductible**

Dans le cadre de la validation des modifications transcriptionnelles causées par la HTT mutante, il serait intéressant d'utiliser des systèmes inductibles. Le principal avantage de cette approche est la possibilité de s'affranchir d'un effet délétère de la construction exprimée. C'est notamment le cas pour la perte d'expression de la HTT totale et du gain de fonction de la HTT mutante qui ont un effet sur la survie des NSCs. La différenciation des NSC étant contrôlée pour partie par la densité cellulaire, les modifications génétiques entraînent une variation de survie entre la condition contrôle et la condition testée risquent de fausser les résultats. L'expression inductible des transgènes faciliterait l'isolation de lignées modifiées et renforcerait la confiance dans les résultats obtenus. Par ailleurs les lignées seraient leur propre contrôle, sous dépendance de l'induction de l'expression du transgène, elle-même réversible. Cette particularité pourrait s'avérer intéressante à plusieurs titres. Cette technique rendrait possible l'isolation de populations de NSC pour lesquelles l'état de différenciation serait contrôlable indépendamment de la survie. Ainsi, il serait possible d'obtenir des cultures de neurones transfectés de façon homogènes à partir de ces NSC. L'étude de la cinétique de la modification d'expression des gènes affectés par la mutation serait alors possible, et ce à différents stades de différenciation neurale.

#### **IV. Relations entre gènes candidats**

L'analyse des données transcriptomiques issues de notre étude a révélé l'existence de modifications transcriptionnelles encore jamais décrites à ce jour. Les expériences de surexpression et de perte de fonction qui ont suivi ont renforcé la crédibilité d'une partie de ces résultats. Une liste courte des gènes les plus intéressants est reportée sur le Tableau 6. Il est intéressant de constater qu'une partie non négligeable de ces gènes semble appartenir à un petit réseau de protéines centré autour de la HTT (voir Figure 24). Au sein de ce réseau, des fonctions déjà impliquées dans la pathologie apparaissent : l'interaction entre membranes et cytosquelette, la voie AKT, la régulation de l'activité mitochondriale, et la régulation transcriptionnelle via la voie CREB. Il est donc crucial de caractériser les liens possibles entre ces différents gènes. Afin de mieux comprendre d'éventuelles interactions entre ces gènes, il semble logique de s'intéresser à l'influence qu'ils peuvent exercer les uns sur les autres, et en particulier aux relations épistatiques qui peuvent exister entre eux. Il serait donc opportun de caractériser l'influence de la perte et du gain d'expression de chaque gène sur le niveau d'expression des autres.

### **2) La stratégie d'analyse transcriptomique**

La découverte de ces gènes, dont l'expression est perturbée par un allèle mutant de la HTT, a été rendue possible par la technologie des puces à ADN. Cette technologie est en constante évolution et permet de rechercher à grande échelle des perturbations avec une finesse et une précision grandissantes.

#### **I. Des Puces en constante évolution**

Au vu des résultats obtenus et de l'évolution des techniques d'analyse transcriptionnelle au cours de ma thèse, il est intéressant de s'interroger sur la pertinence, *a posteriori*, de l'utilisation de puces à ADN simple. En effet, ces puces permettent d'évaluer l'expression génique de l'ensemble du génome sur la base de l'identification de petites séquences spécifiques d'un gène : les sondes. Le choix de ces sondes est très important car leur hybridation doit être spécifique du gène concerné. Leur bonne annotation est donc primordiale. Ce dernier point n'est pas trivial car pour assurer une reconnaissance spécifique, 48803 sondes différentes sont nécessaires pour la technologie que nous avons utilisée. L'analyse nécessite donc un traitement informatisé dont la pertinence est totalement soumise à la qualité de l'annotation, qui ironiquement, ne couvre pas la HTT elle-même. Il faut savoir que cette combinatoire est loin de permettre de distinguer systématiquement entre les variants transcriptionnels des gènes. Avec l'accumulation des données en biologie, il est devenu clair qu'un gène ne peut plus être considéré comme une « simple » unité fonctionnelle codant une seule protéine ayant une fonction unique. Chaque gène est plutôt un « assemblage » d'exons dont la combinatoire au cours de la transcription et de l'épissage permet de générer des ARNm différents. Ces isoformes peuvent coder des protéines différentes et être différentiellement régulés. Ainsi, une analyse à grande échelle des transcrits humains a révélé que plus de 60% des gènes humains génèrent au moins deux transcrits qui diffèrent par leur contenu exonique (de la Grange, Dutertre et al. 2005 ; de la Grange, Dutertre et al. 2007). Il existe notamment des puces à exon, qui avec près de quatre millions de sondes

permettent de contrôler ce paramètre à l'échelle du génome. L'évolution constante des techniques d'analyse de l'expression du matériel génétique élargit le faisceau du lampadaire sous lequel nous cherchons nos clefs pathologiques.

## II. Vers une réelle analyse transcriptomique

Le transcriptome correspond à l'ensemble des transcrits d'une cellule. Les ARNm n'en sont qu'un sous-ensemble. L'analyse des transcrits par des puces requiert un choix *a priori* de séquences qui seront analysées par les sondes, ciblant majoritairement les ARNm. Diverses techniques permettent de limiter ce biais. Parmi les ARN non codants, il est notamment possible de rechercher des perturbations au niveau des micro-ARN (miRNA) à l'aide de puces dédiées, dont le développement est relativement récent. Leur fonction régulatrice de l'expression des gènes semble impliquée dans de nombreux états pathologiques, pour revue : (Barbato, Ruberti et al. 2009). La génération des sondes dépend de l'efficacité des algorithmes par nature imparfaits et de la bonne connaissance du génome étudié. De même la distinction des gènes à forte homologie et de deux transcrits alternatifs non discriminés par les algorithmes identifiants les séquences transcrites pose problème. Une alternative possible est le RNA-seq (Sultan, Schulz et al. 2008). Cette technique permet d'analyser la population totale des ARN messagers ou miRNA exprimés dans un type cellulaire donné. Les gènes multi-exons de l'Homme produisent majoritairement plusieurs transcrits, variables entre types cellulaires (Barash, Calarco et al. 2010). Ceci révisé complètement les principes et les possibilités actuelles d'analyse globale, qui généralement associent à chaque gène un transcrit. Ces types de données permettent de créer un lien entre le patrimoine génétique d'un individu et la totalité des transcrits qui sont exprimés dans un type cellulaire donné (Montgomery, Sammeth et al. 2010). La grande force de l'approche RNA-seq est la possibilité de comparer les résultats de différentes expériences entre eux, sans une normalisation complexe et source d'erreur.

### 3) Possibilités offertes par le modèle

Au cours de mon travail de thèse, je n'ai pu explorer qu'une partie des possibilités offertes par l'utilisation des cellules souches pluripotentes humaines pour la modélisation de la maladie de Huntington, et de nombreuses pistes auraient pu être défrichées. Quelles sont celles qui *a posteriori* gardent leur intérêt ?

#### I. Différencier sélectivement les hPSC

La différenciation reproductible et homogène, en neurones moyens épineux GABAergiques, n'était pas accessible à mon arrivée au laboratoire. Il a donc fallu choisir un phénotype adapté à une stratégie d'analyse transcriptionnelle. Au cours de mon travail au laboratoire, j'ai développé un protocole pour la production de populations neurales ayant un phénotype homogène et stable : les NSCs. Ce type cellulaire s'est révélé facile à manipuler mais ne permet pas d'obtenir des neurones moyens épineux GABAergiques striataux. Un des axes de l'équipe est la recherche d'un protocole

capable de fournir des neurones moyens épineux de façon reproductible et homogène. L'obtention de populations pures de progéniteurs et de neurones spécifiques de zones pertinentes pour l'étude de la maladie n'est pas une chose aisée.

Cependant, la modification génétique des cellules pluripotentes peut théoriquement régler ce problème. Au même titre qu'il existe des gènes maîtres capables de reprogrammer un grand nombre de cellules somatiques en cellules pluripotentes, il existe des gènes capables de rediriger une cellule d'un état de différenciation vers un autre. Ce raisonnement a notamment été appliqué aux neurones avec un certain succès et il semble de plus en plus crédible que l'expression de facteurs de transcriptions bien choisis rendent ce type d'approche de plus en plus aisée. Les efforts, mis en œuvre dans l'utilisation de vecteurs non intégratifs pour obtenir des hiPS, sont très prometteurs de ce point de vue puisqu'ils sont directement transférables à la différenciation génétiquement dirigée.

Si ces axes de travail aboutissent, l'utilisation de divers progéniteurs neuraux régionalisés dans le cadre de la modélisation pathologique de la MH est prometteuse, notamment pour mieux comprendre la spécificité des mécanismes de l'augmentation somatique du nombre de triplet CAG au sein des neurones moyens épineux du striatum des malades. Grâce à la technique de small pool PCR, il a déjà été possible de mettre en évidence une augmentation mosaïque du nombre de CAG au sein de corps embryoides dérivés de cellules souches embryonnaires (Niclis, Trounson et al. 2009), ce qui récapitule l'existence d'un mosaïcisme *in vivo*. Nous n'avons cependant jamais constaté de changement de longueur des allèles mutants dans nos conditions expérimentales. L'obtention de progéniteurs capables de se différencier de façon homogène en neurones moyens épineux du striatum fournirait un outil précieux pour l'étude de ce mécanisme pathologique. La MH n'affecte pas les différents types neuronaux de la même façon. Il serait donc intéressant de pouvoir comparer des populations neuronales différemment affectées par la maladie de façon à mieux comprendre les déterminants de cette neurodégénérescence. Enfin, les progéniteurs neuraux pourraient fournir un outil expérimental intéressant pour l'étude des interactions entre glie et neurones dans la MH. Les hESC-MH et leurs progénies sont un outil de choix pour de telles études.

Par ailleurs, il me semble intéressant d'explorer les interactions entre neurones et cellules gliales dans le cadre de la MH. A partir des lignées de cellules pluripotentes atteintes de la MH, et des lignées contrôles, l'association des couples neurone/astrocyte couvrant les quatre configurations mutant/normal possibles pourrait se révéler très informative sur la part des deux types cellulaires dans les mécanismes connus de la maladie. Néanmoins, les symptômes de la MH ne semblent pas pouvoir être expliqués uniquement par l'étude des populations neurales.

La grande force de la modélisation pathologique utilisant les cellules pluripotentes humaines réside dans la possibilité théorique de générer tous les types cellulaires présents dans l'organisme. Il serait intéressant de s'intéresser aux types cellulaires non neuraux affectés par la MH. La communauté scientifique apporte un intérêt grandissant aux cellules pluripotentes, générant un nombre croissant protocoles de différenciation qui donnent accès à de nouveaux types cellulaires. Et il paraît parfaitement pertinent de vouloir comprendre l'implication de types cellulaires périphériques dans la maladie. L'analyse d'adipocytes, de cellules germinales, ou encore de cellules pancréatiques et cardiaques pourrait bien se traduire en avancées significatives pour le quotidien des malades.

## II. Le risque de la stratégie tout hiPS

Les cellules souches pluripotentes représentent un grand espoir pour l'étude des maladies génétiques humaines. En particulier, la possibilité d'isoler par reprogrammation de fibroblastes de patients des lignées d'hiPS, donne accès à des modèles pathologiques inaccessibles il y a seulement quelques années. Dans le cadre des maladies rares la reprogrammation est beaucoup plus facile d'accès que la dérivation de lignées de hESC mutantes. Dans notre cas les hiPSC pourraient permettre de dépasser les limitations liées au faible nombre de lignées utilisées dans notre étude. Cependant, notre étude rappelle que la technologie de reprogrammation est encore immature, en particulier, la remise à zéro de l'état de méthylation (Ohi, Qin et al. 2011), n'est pas réellement maîtrisée. La question de la qualité des modèles cellulaires issus de la reprogrammation se pose donc de façon légitime. L'utilisation des modèles hiPSC doit en tout cas, au même titre que celle des hESC, utiliser un nombre suffisant des lignées indépendantes. Il semble sage de penser que la transition progressive vers une utilisation d'une large majorité de modèle pluripotents de type hiPS se fasse en utilisant au mieux les lignées de cellules hESC disponibles afin de s'appuyer sur une technologie hiPS réellement maîtrisée. Les promesses des nouvelles techniques de reprogrammation et l'amélioration des contrôles de la qualité de celle-ci pourront alors fournir une ressource cellulaire précieuse pour la modélisation des maladies rares et au-delà, pour la modélisation pathologique au sens large.

## Conclusions personnelles

L'accès récent aux cellules pluripotentes humaines porteuses de mutations responsables de maladies génétiques devrait être considéré comme une opportunité d'aborder les étapes précoces de ces maladies. Bien que ce raisonnement soit évident en matière de maladies associées au développement, notre travail soulève la possibilité que cette approche puisse être applicable aux maladies largement considérées comme maladies de l'adulte.

Modéliser la MH et d'autres maladies monogéniques d'apparition tardive en utilisant des cellules souches humaines pluripotentes pourrait apporter beaucoup d'autres résultats très intéressants. Les phases précoces de ces maladies représentent une cible idéale pour un traitement pharmacologique visant à ralentir ou stopper leur évolution. En utilisant un nombre suffisant de lignées de cellules pluripotentes et les contrôles adéquats, la modélisation pathologique humaine devrait ouvrir le champ expérimental à de nombreuses questions.

A mon avis on ne doit pas écarter les hESC en raison de la disponibilité de cellules hiPS. Ces cellules bien que promises à une très large utilisation en biologie humaine, ne sont pas encore complètement assimilables aux hESC. En particulier, on manque encore de recul sur la technologie de reprogrammation cellulaire. Pour autant, les cellules souches embryonnaires ne sont pas une panacée. Au même titre que les hiPS ne remplacent pas les hESC, l'utilisation croissante des cellules pluripotentes complète simplement une boîte à outils expérimentale. Malgré la pression visant à limiter l'expérimentation animale, perdre le bénéfice de l'expertise développée sur les autres modèles de la

maladie serait une grossière erreur. L'utilisation coordonnée des différents outils de modélisations disponibles est une stratégie ayant déjà fait ses preuves, et qui s'enrichira d'une utilisation raisonnée des cellules souches pluripotentes.



## **Bibliographie**

- (1993). "A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. The Huntington's Disease Collaborative Research Group." Cell **72**(6): 971-983.
- Aarts, M., Y. Liu, et al. (2002). "Treatment of ischemic brain damage by perturbing NMDA receptor-PSD-95 protein interactions." Science **298**(5594): 846-850.
- Albin, R. L., A. Reiner, et al. (1990). "Striatal and nigral neuron subpopulations in rigid Huntington's disease: implications for the functional anatomy of chorea and rigidity-akinesia." Ann Neurol **27**(4): 357-365.
- Altar, C. A., N. Cai, et al. (1997). "Anterograde transport of brain-derived neurotrophic factor and its role in the brain." Nature **389**(6653): 856-860.
- Alves, S., E. Regulier, et al. (2008). "Striatal and nigral pathology in a lentiviral rat model of Machado-Joseph disease." Hum Mol Genet **17**(14): 2071-2083.
- Amabile, G. and A. Meissner (2009). "Induced pluripotent stem cells: current progress and potential for regenerative medicine." Trends Mol Med **15**(2): 59-68.
- Amit, M., M. K. Carpenter, et al. (2000). "Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture." Dev Biol **227**(2): 271-278.
- Anderson, R. M., A. R. Lawrence, et al. (2002). "Chordin and noggin promote organizing centers of forebrain development in the mouse." Development **129**(21): 4975-4987.
- Andrade, M. A. and P. Bork (1995). "HEAT repeats in the Huntington's disease protein." Nat Genet **11**(2): 115-116.
- Andreassen, O. A., A. Dedeoglu, et al. (2002). "Huntington's disease of the endocrine pancreas: insulin deficiency and diabetes mellitus due to impaired insulin gene expression." Neurobiol Dis **11**(3): 410-424.
- Andrew, S. E., Y. P. Goldberg, et al. (1993). "The relationship between trinucleotide (CAG) repeat length and clinical features of Huntington's disease." Nat Genet **4**(4): 398-403.
- Apostol, B. L., K. Illes, et al. (2006). "Mutant huntingtin alters MAPK signaling pathways in PC12 and striatal cells: ERK1/2 protects against mutant huntingtin-associated toxicity." Hum Mol Genet **15**(2): 273-285.
- Arenas, J., Y. Campos, et al. (1998). "Complex I defect in muscle from patients with Huntington's disease." Ann Neurol **43**(3): 397-400.
- Armstrong, R. J., C. Watts, et al. (2000). "Survival, neuronal differentiation, and fiber outgrowth of propagated human neural precursor grafts in an animal model of Huntington's disease." Cell Transplant **9**(1): 55-64.
- Arrasate, M., S. Mitra, et al. (2004). "Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death." Nature **431**(7010): 805-810.
- Arzberger, T., K. Krampfl, et al. (1997). "Changes of NMDA receptor subunit (NR1, NR2B) and glutamate transporter (GLT1) mRNA expression in Huntington's disease--an in situ hybridization study." J Neuropathol Exp Neurol **56**(4): 440-454.
- Ashby, C. D. and D. A. Walsh (1972). "Characterization of the interaction of a protein inhibitor with adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinases. I. Interaction with the catalytic subunit of the protein kinase." J Biol Chem **247**(20): 6637-6642.
- Ashizawa, T., L. J. Wong, et al. (1994). "CAG repeat size and clinical presentation in Huntington's disease." Neurology **44**(6): 1137-1143.
- Atwal, R. S., J. Xia, et al. (2007). "Huntingtin has a membrane association signal that can modulate huntingtin aggregation, nuclear entry and toxicity." Hum Mol Genet **16**(21): 2600-2615.
- Aubry, L., A. Bugi, et al. (2008). "Striatal progenitors derived from human ES cells mature into DARPP32 neurons in vitro and in quinolinic acid-lesioned rats." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(43): 16707-16712.
- Auerbach, W., M. S. Hurlbert, et al. (2001). "The HD mutation causes progressive lethal neurological disease in mice expressing reduced levels of huntingtin." Hum Mol Genet **10**(22): 2515-2523.
- Augenlicht, L. H. and D. Kobrin (1982). "Cloning and screening of sequences expressed in a mouse colon tumor." Cancer Res **42**(3): 1088-1093.
- Augenlicht, L. H., J. Taylor, et al. (1991). "Patterns of gene expression that characterize the colonic mucosa in patients at genetic risk for colonic cancer." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(8): 3286-3289.

- Augenlicht, L. H., M. Z. Wahrman, et al. (1987). "Expression of cloned sequences in biopsies of human colonic tissue and in colonic carcinoma cells induced to differentiate in vitro." *Cancer Res* **47**(22): 6017-6021.
- Augood, S. J., R. L. Faull, et al. (1997). "Dopamine D1 and D2 receptor gene expression in the striatum in Huntington's disease." *Ann Neurol* **42**(2): 215-221.
- Augood, S. J., R. L. Faull, et al. (1996). "Reduction in enkephalin and substance P messenger RNA in the striatum of early grade Huntington's disease: a detailed cellular in situ hybridization study." *Neuroscience* **72**(4): 1023-1036.
- Aziz, N. A., H. Pijl, et al. (2009). "Increased hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in Huntington's disease." *J Clin Endocrinol Metab* **94**(4): 1223-1228.
- Bachoud-Levi, A. C. (2009). "Neural grafts in Huntington's disease: viability after 10 years." *Lancet Neurol* **8**(11): 979-981.
- Bachoud-Levi, A. C., V. Gaura, et al. (2006). "Effect of fetal neural transplants in patients with Huntington's disease 6 years after surgery: a long-term follow-up study." *Lancet Neurol* **5**(4): 303-309.
- Bachoud-Levi, A. C., P. Remy, et al. (2000). "Motor and cognitive improvements in patients with Huntington's disease after neural transplantation." *Lancet* **356**(9246): 1975-1979.
- Bacos, K., M. Bjorkqvist, et al. (2008). "Islet beta-cell area and hormone expression are unaltered in Huntington's disease." *Histochem Cell Biol* **129**(5): 623-629.
- Bae, B. I., H. Xu, et al. (2005). "p53 mediates cellular dysfunction and behavioral abnormalities in Huntington's disease." *Neuron* **47**(1): 29-41.
- Bain, G., D. Kitchens, et al. (1995). "Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro." *Dev Biol* **168**(2): 342-357.
- Bakay, M., Y. W. Chen, et al. (2002). "Sources of variability and effect of experimental approach on expression profiling data interpretation." *BMC Bioinformatics* **3**: 4.
- Ban, H., N. Nishishita, et al. (2011). "Efficient generation of transgene-free human induced pluripotent stem cells (iPSCs) by temperature-sensitive Sendai virus vectors." *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Bao, J., A. H. Sharp, et al. (1996). "Expansion of polyglutamine repeat in huntingtin leads to abnormal protein interactions involving calmodulin." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(10): 5037-5042.
- Baquet, Z. C., J. A. Gorski, et al. (2004). "Early striatal dendrite deficits followed by neuron loss with advanced age in the absence of anterograde cortical brain-derived neurotrophic factor." *J Neurosci* **24**(17): 4250-4258.
- Barash, Y., J. A. Calarco, et al. (2010). "Deciphering the splicing code." *Nature* **465**(7294): 53-59.
- Barbato, C., F. Ruberti, et al. (2009). "Searching for MIND: microRNAs in neurodegenerative diseases." *J Biomed Biotechnol* **2009**: 871313.
- Barberi, T., P. Klivenyi, et al. (2003). "Neural subtype specification of fertilization and nuclear transfer embryonic stem cells and application in parkinsonian mice." *Nat Biotechnol* **21**(10): 1200-1207.
- Barker, N., M. van de Wetering, et al. (2008). "The intestinal stem cell." *Genes Dev* **22**(14): 1856-1864.
- Barnes, G. T., M. P. Duyao, et al. (1994). "Mouse Huntington's disease gene homolog (Hdh)." *Somat Cell Mol Genet* **20**(2): 87-97.
- Bauer, P. O., H. K. Wong, et al. (2009). "Inhibition of Rho kinases enhances the degradation of mutant huntingtin." *J Biol Chem* **284**(19): 13153-13164.
- Baughman, J. M., R. Nilsson, et al. (2009). "A computational screen for regulators of oxidative phosphorylation implicates SLIRP in mitochondrial RNA homeostasis." *PLoS Genet* **5**(8): e1000590.
- Beal, M. F. and R. J. Ferrante (2004). "Experimental therapeutics in transgenic mouse models of Huntington's disease." *Nat Rev Neurosci* **5**(5): 373-384.
- Beal, M. F., N. W. Kowall, et al. (1986). "Replication of the neurochemical characteristics of Huntington's disease by quinolinic acid." *Nature* **321**(6066): 168-171.
- Becanovic, K., M. A. Pouladi, et al. (2010). "Transcriptional changes in Huntington disease identified using genome-wide expression profiling and cross-platform analysis." *Hum Mol Genet* **19**(8): 1438-1452.
- Behrens, P. F., P. Franz, et al. (2002). "Impaired glutamate transport and glutamate-glutamine cycling: downstream effects of the Huntington mutation." *Brain* **125**(Pt 8): 1908-1922.
- Beighton, P. and M. R. Hayden (1981). "Huntington's chorea." *S Afr Med J* **59**(8): 250.
- Benchoua, A., L. Aubry, et al. (2008). Method and medium for neural differentiation of pluripotent cells. E. P. office. **WO/2010/063848**.
- Benchoua, A., Y. Trioulier, et al. (2006). "Involvement of mitochondrial complex II defects in neuronal death produced by N-terminus fragment of mutated huntingtin." *Mol Biol Cell* **17**(4): 1652-1663.

- Benn, C. L., C. Landles, et al. (2005). "Contribution of nuclear and extranuclear polyQ to neurological phenotypes in mouse models of Huntington's disease." *Hum Mol Genet* **14**(20): 3065-3078.
- Benn, C. L., T. Sun, et al. (2008). "Huntingtin modulates transcription, occupies gene promoters in vivo, and binds directly to DNA in a polyglutamine-dependent manner." *J Neurosci* **28**(42): 10720-10733.
- Bennett, E. J., T. A. Shaler, et al. (2007). "Global changes to the ubiquitin system in Huntington's disease." *Nature* **448**(7154): 704-708.
- Berardelli, A., J. Noth, et al. (1999). "Pathophysiology of chorea and bradykinesia in Huntington's disease." *Mov Disord* **14**(3): 398-403.
- Berrios, G. E., A. C. Wagle, et al. (2002). "Psychiatric symptoms in neurologically asymptomatic Huntington's disease gene carriers: a comparison with gene negative at risk subjects." *Acta Psychiatr Scand* **105**(3): 224-230.
- Besson, M. T., P. Dupont, et al. (2010). "Increased energy metabolism rescues glia-induced pathology in a Drosophila model of Huntington's disease." *Hum Mol Genet* **19**(17): 3372-3382.
- Beurrier, C., M. Faideau, et al. (2010). "Ciliary neurotrophic factor protects striatal neurons against excitotoxicity by enhancing glial glutamate uptake." *PLoS One* **5**(1): e8550.
- Beverstock, G. C. (1984). "The current state of research with peripheral tissues in Huntington disease." *Hum Genet* **66**(2-3): 115-131.
- Bjorkqvist, M., M. Fex, et al. (2005). "The R6/2 transgenic mouse model of Huntington's disease develops diabetes due to deficient beta-cell mass and exocytosis." *Hum Mol Genet* **14**(5): 565-574.
- Bjorkqvist, M., A. Petersen, et al. (2006). "Progressive alterations in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the R6/2 transgenic mouse model of Huntington's disease." *Hum Mol Genet* **15**(10): 1713-1721.
- Bjorkqvist, M., E. J. Wild, et al. (2008). "A novel pathogenic pathway of immune activation detectable before clinical onset in Huntington's disease." *J Exp Med* **205**(8): 1869-1877.
- Block-Galarza, J., K. O. Chase, et al. (1997). "Fast transport and retrograde movement of huntingtin and HAP 1 in axons." *Neuroreport* **8**(9-10): 2247-2251.
- Bodner, R. A., T. F. Outeiro, et al. (2006). "Pharmacological promotion of inclusion formation: a therapeutic approach for Huntington's and Parkinson's diseases." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(11): 4246-4251.
- Bohanna, I., N. Georgiou-Karistianis, et al. (2008). "Magnetic resonance imaging as an approach towards identifying neuropathological biomarkers for Huntington's disease." *Brain Res Rev* **58**(1): 209-225.
- Borovecki, F., L. Lovrecic, et al. (2005). "Genome-wide expression profiling of human blood reveals biomarkers for Huntington's disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(31): 11023-11028.
- Borrell-Page, M., D. Zala, et al. (2006). "Huntington's disease: from huntingtin function and dysfunction to therapeutic strategies." *Cell Mol Life Sci* **63**(22): 2642-2660.
- Boudreau, R. L., J. L. McBride, et al. (2009). "Nonallele-specific silencing of mutant and wild-type huntingtin demonstrates therapeutic efficacy in Huntington's disease mice." *Mol Ther* **17**(6): 1053-1063.
- Bradley, C. K., H. A. Scott, et al. (2011). "Derivation of Huntington's disease-affected human embryonic stem cell lines." *Stem Cells Dev* **20**(3): 495-502.
- Braunstein, K. E., J. Eschbach, et al. (2010). "A point mutation in the dynein heavy chain gene leads to striatal atrophy and compromises neurite outgrowth of striatal neurons." *Hum Mol Genet* **19**(22): 4385-4398.
- Brinkman, R. R., M. M. Mezei, et al. (1997). "The likelihood of being affected with Huntington disease by a particular age, for a specific CAG size." *Am J Hum Genet* **60**(5): 1202-1210.
- Brouillet, E., P. Hantraye, et al. (1995). "Chronic mitochondrial energy impairment produces selective striatal degeneration and abnormal choreiform movements in primates." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(15): 7105-7109.
- Browne, S. E., A. C. Bowling, et al. (1997). "Oxidative damage and metabolic dysfunction in Huntington's disease: selective vulnerability of the basal ganglia." *Ann Neurol* **41**(5): 646-653.
- Brustovetsky, N., R. LaFrance, et al. (2005). "Age-dependent changes in the calcium sensitivity of striatal mitochondria in mouse models of Huntington's Disease." *J Neurochem* **93**(6): 1361-1370.
- Butterfield, D. A., B. J. Howard, et al. (2001). "Brain oxidative stress in animal models of accelerated aging and the age-related neurodegenerative disorders, Alzheimer's disease and Huntington's disease." *Curr Med Chem* **8**(7): 815-828.
- Candiani, S., M. Pestarino, et al. (2007). "Characterization, developmental expression and evolutionary features of the huntingtin gene in the amphioxus *Branchiostoma floridae*." *BMC Dev Biol* **7**: 127.

- Cantuti-Castelvetri, I., M. T. Lin, et al. (2005). "Somatic mitochondrial DNA mutations in single neurons and glia." *Neurobiol Aging* **26**(10): 1343-1355.
- Caplan, A. I., M. Elyaderani, et al. (1997). "Principles of cartilage repair and regeneration." *Clin Orthop Relat Res*(342): 254-269.
- Carmichael, J., J. Chatellier, et al. (2000). "Bacterial and yeast chaperones reduce both aggregate formation and cell death in mammalian cell models of Huntington's disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(17): 9701-9705.
- Carpenter, M. K., M. S. Inokuma, et al. (2001). "Enrichment of neurons and neural precursors from human embryonic stem cells." *Exp Neurol* **172**(2): 383-397.
- Carson, C. T., S. Aigner, et al. (2006). "Stem cells: the good, bad and barely in control." *Nat Med* **12**(11): 1237-1238.
- Carvajal-Vergara, X., A. Sevilla, et al. (2010). "Patient-specific induced pluripotent stem-cell-derived models of LEOPARD syndrome." *Nature* **465**(7299): 808-812.
- Cattaneo, E. and L. Conti (1998). "Generation and characterization of embryonic striatal conditionally immortalized ST14A cells." *J Neurosci Res* **53**(2): 223-234.
- Cattaneo, E., D. Rigamonti, et al. (2001). "Loss of normal huntingtin function: new developments in Huntington's disease research." *Trends Neurosci* **24**(3): 182-188.
- Cattaneo, E., C. Zuccato, et al. (2005). "Normal huntingtin function: an alternative approach to Huntington's disease." *Nat Rev Neurosci* **6**(12): 919-930.
- Caviston, J. P. and E. L. Holzbaur (2009). "Huntingtin as an essential integrator of intracellular vesicular trafficking." *Trends Cell Biol* **19**(4): 147-155.
- Caviston, J. P., J. L. Ross, et al. (2007). "Huntingtin facilitates dynein/dynactin-mediated vesicle transport." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(24): 10045-10050.
- Cepeda, C., C. S. Colwell, et al. (1998). "Dopaminergic modulation of early signs of excitotoxicity in visualized rat neostriatal neurons." *Eur J Neurosci* **10**(11): 3491-3497.
- Cepeda, C., R. S. Hurst, et al. (2003). "Transient and progressive electrophysiological alterations in the corticostriatal pathway in a mouse model of Huntington's disease." *J Neurosci* **23**(3): 961-969.
- Cha, J. H. (2007). "Transcriptional signatures in Huntington's disease." *Prog Neurobiol* **83**(4): 228-248.
- Cha, J. H., A. S. Frey, et al. (1999). "Altered neurotransmitter receptor expression in transgenic mouse models of Huntington's disease." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **354**(1386): 981-989.
- Cha, J. H., C. M. Kosinski, et al. (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**(11): 6480-6485.
- Chambers, S. M., C. A. Fasano, et al. (2009). "Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling." *Nat Biotechnol* **27**(3): 275-280.
- Chan, E. Y., R. Luthi-Carter, et al. (2002). "Increased huntingtin protein length reduces the number of polyglutamine-induced gene expression changes in mouse models of Huntington's disease." *Hum Mol Genet* **11**(17): 1939-1951.
- Chaturvedi, R. K., P. Adihetty, et al. (2009). "Impaired PGC-1alpha function in muscle in Huntington's disease." *Hum Mol Genet* **18**(16): 3048-3065.
- Chaturvedi, R. K., N. Y. Calingasan, et al. (2010). "Impairment of PGC-1alpha expression, neuropathology and hepatic steatosis in a transgenic mouse model of Huntington's disease following chronic energy deprivation." *Hum Mol Genet* **19**(16): 3190-3205.
- Chen-Plotkin, A. S., G. Sadri-Vakili, et al. (2006). "Decreased association of the transcription factor Sp1 with genes downregulated in Huntington's disease." *Neurobiol Dis* **22**(2): 233-241.
- Chen, Z. J., B. T. Kren, et al. (2005). "Sleeping Beauty-mediated down-regulation of huntingtin expression by RNA interference." *Biochem Biophys Res Commun* **329**(2): 646-652.
- Chetverin, A. B. and F. R. Kramer (1994). "Oligonucleotide arrays: new concepts and possibilities." *Biotechnology (N Y)* **12**(11): 1093-1099.
- Chin, M. H., M. J. Mason, et al. (2009). "Induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells are distinguished by gene expression signatures." *Cell Stem Cell* **5**(1): 111-123.
- Cho, S. R., A. Benraiss, et al. (2007). "Induction of neostriatal neurogenesis slows disease progression in a transgenic murine model of Huntington disease." *J Clin Invest* **117**(10): 2889-2902.
- Choo, Y. S., G. V. Johnson, et al. (2004). "Mutant huntingtin directly increases susceptibility of mitochondria to the calcium-induced permeability transition and cytochrome c release." *Hum Mol Genet* **13**(14): 1407-1420.
- Chung, S., M. Furihata, et al. (2009). "Overexpressing PKIB in prostate cancer promotes its aggressiveness by linking between PKA and Akt pathways." *Oncogene* **28**(32): 2849-2859.

- Cicchetti, F., S. Saporta, et al. (2009). "Neural transplants in patients with Huntington's disease undergo disease-like neuronal degeneration." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(30): 12483-12488.
- Cohen, M. A., P. Itsykson, et al. (2007). "Neural differentiation of human ES cells." Curr Protoc Cell Biol **Chapter 23**: Unit 23 27.
- Colin, E., E. Regulier, et al. (2005). "Akt is altered in an animal model of Huntington's disease and in patients." Eur J Neurosci **21**(6): 1478-1488.
- Colin, E., D. Zala, et al. (2008). "Huntingtin phosphorylation acts as a molecular switch for anterograde/retrograde transport in neurons." EMBO J **27**(15): 2124-2134.
- Collewijn, H., L. N. Went, et al. (1988). "Oculomotor defects in patients with Huntington's disease and their offspring." J Neurol Sci **86**(2-3): 307-320.
- Collins, S. P. and M. D. Uhler (1997). "Characterization of PKIgamma, a novel isoform of the protein kinase inhibitor of cAMP-dependent protein kinase." J Biol Chem **272**(29): 18169-18178.
- Cong, S. Y., B. A. Pepers, et al. (2005). "Mutant huntingtin represses CBP, but not p300, by binding and protein degradation." Mol Cell Neurosci **30**(4): 560-571.
- Conneally, P. M. (1984). "Huntington disease: genetics and epidemiology." Am J Hum Genet **36**(3): 506-526.
- Conrad, D. F., T. D. Andrews, et al. (2006). "A high-resolution survey of deletion polymorphism in the human genome." Nat Genet **38**(1): 75-81.
- Conrad, D. F., M. Jakobsson, et al. (2006). "A worldwide survey of haplotype variation and linkage disequilibrium in the human genome." Nat Genet **38**(11): 1251-1260.
- Cornett, J., L. Smith, et al. (2006). "Context-dependent dysregulation of transcription by mutant huntingtin." J Biol Chem **281**(47): 36198-36204.
- Cowan, C. A., J. Atienza, et al. (2005). "Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells." Science **309**(5739): 1369-1373.
- Crocker, S. F., W. J. Costain, et al. (2006). "DNA microarray analysis of striatal gene expression in symptomatic transgenic Huntington's mice (R6/2) reveals neuroinflammation and insulin associations." Brain Res **1088**(1): 176-186.
- Cui, L., H. Jeong, et al. (2006). "Transcriptional repression of PGC-1alpha by mutant huntingtin leads to mitochondrial dysfunction and neurodegeneration." Cell **127**(1): 59-69.
- Cummings, D. M., A. J. Milnerwood, et al. (2006). "Aberrant cortical synaptic plasticity and dopaminergic dysfunction in a mouse model of Huntington's disease." Hum Mol Genet **15**(19): 2856-2868.
- Damiano, M., L. Galvan, et al. (2010). "Mitochondria in Huntington's disease." Biochim Biophys Acta **1802**(1): 52-61.
- Davies, S. W., M. Turmaine, et al. (1997). "Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation." Cell **90**(3): 537-548.
- Dawbarn, D., M. E. De Quidt, et al. (1985). "Survival of basal ganglia neuropeptide Y-somatostatin neurones in Huntington's disease." Brain Res **340**(2): 251-260.
- de Almeida, L. P., C. A. Ross, et al. (2002). "Lentiviral-mediated delivery of mutant huntingtin in the striatum of rats induces a selective neuropathology modulated by polyglutamine repeat size, huntingtin expression levels, and protein length." J Neurosci **22**(9): 3473-3483.
- de la Grange, P., M. Dutertre, et al. (2007). "A new advance in alternative splicing databases: from catalogue to detailed analysis of regulation of expression and function of human alternative splicing variants." BMC Bioinformatics **8**: 180.
- de la Grange, P., M. Dutertre, et al. (2005). "FAST DB: a website resource for the study of the expression regulation of human gene products." Nucleic Acids Res **33**(13): 4276-4284.
- DeMarch, Z., C. Giampa, et al. (2008). "Beneficial effects of rolipram in the R6/2 mouse model of Huntington's disease." Neurobiol Dis **30**(3): 375-387.
- DeMarch, Z., C. Giampa, et al. (2007). "Beneficial effects of rolipram in a quinolinic acid model of striatal excitotoxicity." Neurobiol Dis **25**(2): 266-273.
- Desplats, P. A., K. E. Kass, et al. (2006). "Selective deficits in the expression of striatal-enriched mRNAs in Huntington's disease." J Neurochem **96**(3): 743-757.
- DiFiglia, M., E. Sapp, et al. (1995). "Huntingtin is a cytoplasmic protein associated with vesicles in human and rat brain neurons." Neuron **14**(5): 1075-1081.
- DiFiglia, M., E. Sapp, et al. (1997). "Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain." Science **277**(5334): 1990-1993.
- DiFiglia, M., M. Sena-Esteves, et al. (2007). "Therapeutic silencing of mutant huntingtin with siRNA attenuates striatal and cortical neuropathology and behavioral deficits." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(43): 17204-17209.
- Djousse, L., B. Knowlton, et al. (2002). "Weight loss in early stage of Huntington's disease." Neurology **59**(9): 1325-1330.

- Dragatsis, I., M. S. Levine, et al. (2000). "Inactivation of Hdh in the brain and testis results in progressive neurodegeneration and sterility in mice." *Nat Genet* **26**(3): 300-306.
- Dragileva, E., A. Hendricks, et al. (2009). "Intergenerational and striatal CAG repeat instability in Huntington's disease knock-in mice involve different DNA repair genes." *Neurobiol Dis* **33**(1): 37-47.
- Drouet, V., V. Perrin, et al. (2009). "Sustained effects of nonallele-specific Huntingtin silencing." *Ann Neurol* **65**(3): 276-285.
- Duan, W., Z. Guo, et al. (2003). "Dietary restriction normalizes glucose metabolism and BDNF levels, slows disease progression, and increases survival in huntingtin mutant mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(5): 2911-2916.
- Dunah, A. W., H. Jeong, et al. (2002). "Sp1 and TAFII130 transcriptional activity disrupted in early Huntington's disease." *Science* **296**(5576): 2238-2243.
- Dunnett, S. B. and A. E. Rosser (2004). "Cell therapy in Huntington's disease." *NeuroRx* **1**(4): 394-405.
- Dunnett, S. B. and A. E. Rosser (2007). "Stem cell transplantation for Huntington's disease." *Exp Neurol* **203**(2): 279-292.
- Duyao, M., C. Ambrose, et al. (1993). "Trinucleotide repeat length instability and age of onset in Huntington's disease." *Nat Genet* **4**(4): 387-392.
- Duyao, M. P., A. B. Auerbach, et al. (1995). "Inactivation of the mouse Huntington's disease gene homolog Hdh." *Science* **269**(5222): 407-410.
- Dyer, R. B. and C. T. McMurray (2001). "Mutant protein in Huntington disease is resistant to proteolysis in affected brain." *Nat Genet* **29**(3): 270-278.
- Ebert, A. D., J. Yu, et al. (2009). "Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient." *Nature* **457**(7227): 277-280.
- Eiges, R., A. Urbach, et al. (2007). "Developmental study of fragile X syndrome using human embryonic stem cells derived from preimplantation genetically diagnosed embryos." *Cell Stem Cell* **1**(5): 568-577.
- Elkabetz, Y., G. Panagiotakos, et al. (2008). "Human ES cell-derived neural rosettes reveal a functionally distinct early neural stem cell stage." *Genes Dev* **22**(2): 152-165.
- Emdad, L., S. L. D'Souza, et al. (2011). "Efficient Differentiation of Human Embryonic and Induced Pluripotent Stem Cells into Functional Astrocytes." *Stem Cells Dev*.
- Engelender, S., A. H. Sharp, et al. (1997). "Huntingtin-associated protein 1 (HAP1) interacts with the p150Glued subunit of dynactin." *Hum Mol Genet* **6**(13): 2205-2212.
- Englund, U., A. Bjorklund, et al. (2002). "Migration patterns and phenotypic differentiation of long-term expanded human neural progenitor cells after transplantation into the adult rat brain." *Brain Res Dev Brain Res* **134**(1-2): 123-141.
- Estrada-Sanchez, A. M., T. Montiel, et al. (2009). "Glutamate toxicity in the striatum of the R6/2 Huntington's disease transgenic mice is age-dependent and correlates with decreased levels of glutamate transporters." *Neurobiol Dis* **34**(1): 78-86.
- Evans, M. J. and M. H. Kaufman (1981). "Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos." *Nature* **292**(5819): 154-156.
- Faber, P. W., G. T. Barnes, et al. (1998). "Huntingtin interacts with a family of WW domain proteins." *Hum Mol Genet* **7**(9): 1463-1474.
- Faideau, M., J. Kim, et al. (2010). "In vivo expression of polyglutamine-expanded huntingtin by mouse striatal astrocytes impairs glutamate transport: a correlation with Huntington's disease subjects." *Hum Mol Genet* **19**(15): 3053-3067.
- Fain, J. N., N. A. Del Mar, et al. (2001). "Abnormalities in the functioning of adipocytes from R6/2 mice that are transgenic for the Huntington's disease mutation." *Hum Mol Genet* **10**(2): 145-152.
- Fan, M. M. and L. A. Raymond (2007). "N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor function and excitotoxicity in Huntington's disease." *Prog Neurobiol* **81**(5-6): 272-293.
- Farrer, L. A. (1985). "Diabetes mellitus in Huntington disease." *Clin Genet* **27**(1): 62-67.
- Farrer, L. A. (1986). "Suicide and attempted suicide in Huntington disease: implications for preclinical testing of persons at risk." *Am J Med Genet* **24**(2): 305-311.
- Farrer, L. A. and P. L. Yu (1985). "Anthropometric discrimination among affected, at-risk, and not-at-risk individuals in families with Huntington disease." *Am J Med Genet* **21**(2): 307-316.
- Fernandez-Marcos, P. J. and J. Auwerx (2011). "Regulation of PGC-1alpha, a nodal regulator of mitochondrial biogenesis." *Am J Clin Nutr* **93**(4): 884S-890.
- Ferrante, R. J., C. A. Gutekunst, et al. (1997). "Heterogeneous topographic and cellular distribution of huntingtin expression in the normal human neostriatum." *J Neurosci* **17**(9): 3052-3063.
- Ferrante, R. J. and N. W. Kowall (1987). "Tyrosine hydroxylase-like immunoreactivity is distributed in the matrix compartment of normal human and Huntington's disease striatum." *Brain Res* **416**(1): 141-146.

- Ferrante, R. J., N. W. Kowall, et al. (1985). "Selective sparing of a class of striatal neurons in Huntington's disease." *Science* **230**(4725): 561-563.
- Ferrante, R. J., N. W. Kowall, et al. (1991). "Proliferative and degenerative changes in striatal spiny neurons in Huntington's disease: a combined study using the section-Golgi method and calbindin D28k immunocytochemistry." *J Neurosci* **11**(12): 3877-3887.
- Ferrante, R. J., J. K. Kubilus, et al. (2003). "Histone deacetylase inhibition by sodium butyrate chemotherapy ameliorates the neurodegenerative phenotype in Huntington's disease mice." *J Neurosci* **23**(28): 9418-9427.
- Fiskerstrand, T., D. H'Mida-Ben Brahim, et al. (2010). "Mutations in ABHD12 cause the neurodegenerative disease PHARC: An inborn error of endocannabinoid metabolism." *Am J Hum Genet* **87**(3): 410-417.
- Fleck, M. W., S. Hirotsune, et al. (2000). "Hippocampal abnormalities and enhanced excitability in a murine model of human lissencephaly." *J Neurosci* **20**(7): 2439-2450.
- Folstein, S. E., R. J. Leigh, et al. (1986). "The diagnosis of Huntington's disease." *Neurology* **36**(10): 1279-1283.
- Fossale, E., V. C. Wheeler, et al. (2002). "Identification of a presymptomatic molecular phenotype in Hdh CAG knock-in mice." *Hum Mol Genet* **11**(19): 2233-2241.
- Fricker-Gates, R. A., C. Lundberg, et al. (2001). "Neural transplantation: restoring complex circuitry in the striatum." *Restor Neurol Neurosci* **19**(1-2): 119-138.
- Fusco, F. R., Q. Chen, et al. (1999). "Cellular localization of huntingtin in striatal and cortical neurons in rats: lack of correlation with neuronal vulnerability in Huntington's disease." *J Neurosci* **19**(4): 1189-1202.
- Gahwiler, B. H. (1999). "Nerve cells in culture: the extraordinary discovery by Ross Granville Harrison." *Brain Res Bull* **50**(5-6): 343-344.
- Gantois, I., K. Fang, et al. (2007). "Ablation of D1 dopamine receptor-expressing cells generates mice with seizures, dystonia, hyperactivity, and impaired oral behavior." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(10): 4182-4187.
- Garcia Ruiz, P., A. Fontan, et al. (2001). "[Disorders in gaze saccades in Huntington disease. Clinical correlations]." *Nervenarzt* **72**(6): 437-440.
- Gardian, G. and L. Vecsei (2004). "Huntington's disease: pathomechanism and therapeutic perspectives." *J Neural Transm* **111**(10-11): 1485-1494.
- Gary, D. S., A. Davidson, et al. (2007). "Investigation of RNA interference to suppress expression of full-length and fragment human huntingtin." *Neuromolecular Med* **9**(2): 145-155.
- Gaspar-Maia, A., A. Alajem, et al. (2011). "Open chromatin in pluripotency and reprogramming." *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**(1): 36-47.
- Gauthier, L. R., B. C. Charrin, et al. (2004). "Huntingtin controls neurotrophic support and survival of neurons by enhancing BDNF vesicular transport along microtubules." *Cell* **118**(1): 127-138.
- Gervais, F. G., R. Singaraja, et al. (2002). "Recruitment and activation of caspase-8 by the Huntingtin-interacting protein Hip-1 and a novel partner Hipp1." *Nat Cell Biol* **4**(2): 95-105.
- Gil, J. M. and A. C. Rego (2008). "Mechanisms of neurodegeneration in Huntington's disease." *Eur J Neurosci* **27**(11): 2803-2820.
- Gissi, C., G. Pesole, et al. (2006). "Huntingtin gene evolution in Chordata and its peculiar features in the ascidian *Ciona* genus." *BMC Genomics* **7**: 288.
- Godin, J. D., K. Colombo, et al. (2010). "Huntingtin is required for mitotic spindle orientation and mammalian neurogenesis." *Neuron* **67**(3): 392-406.
- Godin, J. D., G. Poizat, et al. (2010). "Mutant huntingtin-impaired degradation of beta-catenin causes neurotoxicity in Huntington's disease." *EMBO J* **29**(14): 2433-2445.
- Goebel, H. H., R. Heipertz, et al. (1978). "Juvenile Huntington chorea: clinical, ultrastructural, and biochemical studies." *Neurology* **28**(1): 23-31.
- Goehler, H., M. Lalowski, et al. (2004). "A protein interaction network links GIT1, an enhancer of huntingtin aggregation, to Huntington's disease." *Mol Cell* **15**(6): 853-865.
- Goetz, A. K., B. Scheffler, et al. (2006). "Temporally restricted substrate interactions direct fate and specification of neural precursors derived from embryonic stem cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(29): 11063-11068.
- Gomez-Tortosa, E., M. E. MacDonald, et al. (2001). "Quantitative neuropathological changes in presymptomatic Huntington's disease." *Ann Neurol* **49**(1): 29-34.
- Gong, B., M. C. Lim, et al. (2008). "Time-lapse analysis of aggregate formation in an inducible PC12 cell model of Huntington's disease reveals time-dependent aggregate formation that transiently delays cell death." *Brain Res Bull* **75**(1): 146-157.
- Gonitel, R., H. Moffitt, et al. (2008). "DNA instability in postmitotic neurons." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(9): 3467-3472.

- Gonzalez-Gaitan, M. and H. Jackle (1997). "Role of *Drosophila* alpha-adaptin in presynaptic vesicle recycling." *Cell* **88**(6): 767-776.
- Gore, A., Z. Li, et al. (2011). "Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells." *Nature* **471**(7336): 63-67.
- Goto, S., A. Hirano, et al. (1989). "An immunohistochemical investigation of the human neostriatum in Huntington's disease." *Ann Neurol* **25**(3): 298-304.
- Graham, R. K., Y. Deng, et al. (2006). "Cleavage at the caspase-6 site is required for neuronal dysfunction and degeneration due to mutant huntingtin." *Cell* **125**(6): 1179-1191.
- Graham, R. K., M. A. Pouladi, et al. (2009). "Differential susceptibility to excitotoxic stress in YAC128 mouse models of Huntington disease between initiation and progression of disease." *J Neurosci* **29**(7): 2193-2204.
- Graveland, G. A., R. S. Williams, et al. (1985). "Evidence for degenerative and regenerative changes in neostriatal spiny neurons in Huntington's disease." *Science* **227**(4688): 770-773.
- Gray, M., D. I. Shirasaki, et al. (2008). "Full-length human mutant huntingtin with a stable polyglutamine repeat can elicit progressive and selective neuropathogenesis in BACHD mice." *J Neurosci* **28**(24): 6182-6195.
- Greene, L. A. and A. S. Tischler (1976). "Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**(7): 2424-2428.
- Grinthal, A., I. Adamovic, et al. (2010). "PR65, the HEAT-repeat scaffold of phosphatase PP2A, is an elastic connector that links force and catalysis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(6): 2467-2472.
- Gu, X., V. M. Andre, et al. (2007). "Pathological cell-cell interactions are necessary for striatal pathogenesis in a conditional mouse model of Huntington's disease." *Mol Neurodegener* **2**: 8.
- Gu, X., C. Li, et al. (2005). "Pathological cell-cell interactions elicited by a neuropathogenic form of mutant Huntingtin contribute to cortical pathogenesis in HD mice." *Neuron* **46**(3): 433-444.
- Gunawardena, S. and L. S. Goldstein (2005). "Polyglutamine diseases and transport problems: deadly traffic jams on neuronal highways." *Arch Neurol* **62**(1): 46-51.
- Gunawardena, S., L. S. Her, et al. (2003). "Disruption of axonal transport by loss of huntingtin or expression of pathogenic polyQ proteins in *Drosophila*." *Neuron* **40**(1): 25-40.
- Gusella, J. F., N. S. Wexler, et al. (1983). "A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease." *Nature* **306**(5940): 234-238.
- Gutekunst, C. A., S. H. Li, et al. (1999). "Nuclear and neuropil aggregates in Huntington's disease: relationship to neuropathology." *J Neurosci* **19**(7): 2522-2534.
- Hackam, A. S., A. S. Yassa, et al. (2000). "Huntingtin interacting protein 1 induces apoptosis via a novel caspase-dependent death effector domain." *J Biol Chem* **275**(52): 41299-41308.
- Hafezparast, M., R. Klocke, et al. (2003). "Mutations in dynein link motor neuron degeneration to defects in retrograde transport." *Science* **300**(5620): 808-812.
- Hamilton, J. M., T. Wolfson, et al. (2004). "Rate and correlates of weight change in Huntington's disease." *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **75**(2): 209-212.
- Han, S. S., L. A. Williams, et al. (2011). "Constructing and deconstructing stem cell models of neurological disease." *Neuron* **70**(4): 626-644.
- Hansson, O., R. F. Castilho, et al. (2001). "Partial resistance to malonate-induced striatal cell death in transgenic mouse models of Huntington's disease is dependent on age and CAG repeat length." *J Neurochem* **78**(4): 694-703.
- Harjes, P. and E. E. Wanker (2003). "The hunt for huntingtin function: interaction partners tell many different stories." *Trends Biochem Sci* **28**(8): 425-433.
- Harper, B. (2005). "Huntington disease." *J R Soc Med* **98**(12): 550.
- Harper, S. Q., P. D. Staber, et al. (2005). "RNA interference improves motor and neuropathological abnormalities in a Huntington's disease mouse model." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(16): 5820-5825.
- Hassel, B., S. Tessler, et al. (2008). "Glutamate uptake is reduced in prefrontal cortex in Huntington's disease." *Neurochem Res* **33**(2): 232-237.
- Her, L. S. and L. S. Goldstein (2008). "Enhanced sensitivity of striatal neurons to axonal transport defects induced by mutant huntingtin." *J Neurosci* **28**(50): 13662-13672.
- Hermel, E., J. Gafni, et al. (2004). "Specific caspase interactions and amplification are involved in selective neuronal vulnerability in Huntington's disease." *Cell Death Differ* **11**(4): 424-438.
- Higo, T., K. Hamada, et al. (2010). "Mechanism of ER stress-induced brain damage by IP(3) receptor." *Neuron* **68**(5): 865-878.
- Hilditch-Maguire, P., F. Trettel, et al. (2000). "Huntingtin: an iron-regulated protein essential for normal nuclear and perinuclear organelles." *Hum Mol Genet* **9**(19): 2789-2797.
- Hobson, S. A., A. Bacon, et al. (2010). "Galanin acts as a trophic factor to the central and peripheral nervous systems." *EXS* **102**: 25-38.



- Hobson, S. A., F. E. Holmes, et al. (2006). "Mice deficient for galanin receptor 2 have decreased neurite outgrowth from adult sensory neurons and impaired pain-like behaviour." *J Neurochem* **99**(3): 1000-1010.
- Hodges, A., A. D. Strand, et al. (2006). "Regional and cellular gene expression changes in human Huntington's disease brain." *Hum Mol Genet* **15**(6): 965-977.
- Hoffner, G., M. L. Island, et al. (2005). "Purification of neuronal inclusions of patients with Huntington's disease reveals a broad range of N-terminal fragments of expanded huntingtin and insoluble polymers." *J Neurochem* **95**(1): 125-136.
- Hoffner, G., P. Kahlem, et al. (2002). "Perinuclear localization of huntingtin as a consequence of its binding to microtubules through an interaction with beta-tubulin: relevance to Huntington's disease." *J Cell Sci* **115**(Pt 5): 941-948.
- Hong, S., U. J. Kang, et al. (2008). "Neural precursors derived from human embryonic stem cells maintain long-term proliferation without losing the potential to differentiate into all three neural lineages, including dopaminergic neurons." *J Neurochem* **104**(2): 316-324.
- Hoogeveen, A. T., R. Willemsen, et al. (1993). "Characterization and localization of the Huntington disease gene product." *Hum Mol Genet* **2**(12): 2069-2073.
- Horton, T. M., B. H. Graham, et al. (1995). "Marked increase in mitochondrial DNA deletion levels in the cerebral cortex of Huntington's disease patients." *Neurology* **45**(10): 1879-1883.
- Huang, B. and S. Kochanek (2005). "Adenovirus-mediated silencing of huntingtin expression by shRNA." *Hum Gene Ther* **16**(5): 618-626.
- Huang, B., J. Schiefer, et al. (2007). "High-capacity adenoviral vector-mediated reduction of huntingtin aggregate load in vitro and in vivo." *Hum Gene Ther* **18**(4): 303-311.
- Huang, H. S., D. L. Turner, et al. (2011). "Ascl1-induced neuronal differentiation of P19 cells requires expression of a specific inhibitor protein of cyclic AMP-dependent protein kinase." *J Neurochem*.
- Huang, Y. H., Y. Lin, et al. (2008). "CREB modulates the functional output of nucleus accumbens neurons: a critical role of N-methyl-D-aspartate glutamate receptor (NMDAR) receptors." *J Biol Chem* **283**(5): 2751-2760.
- Huangfu, D., K. Osafune, et al. (2008). "Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2." *Nat Biotechnol* **26**(11): 1269-1275.
- Humbert, S., E. A. Bryson, et al. (2002). "The IGF-1/Akt pathway is neuroprotective in Huntington's disease and involves Huntingtin phosphorylation by Akt." *Dev Cell* **2**(6): 831-837.
- Hunt, M. J. and A. J. Morton (2005). "Atypical diabetes associated with inclusion formation in the R6/2 mouse model of Huntington's disease is not improved by treatment with hypoglycaemic agents." *Exp Brain Res* **166**(2): 220-229.
- Hunter, J. M., M. Lesort, et al. (2007). "Ubiquitin-proteasome system alterations in a striatal cell model of Huntington's disease." *J Neurosci Res* **85**(8): 1774-1788.
- Huntington, G. (2003). "On chorea. George Huntington, M.D." *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* **15**(1): 109-112.
- Hurlbert, M. S., W. Zhou, et al. (1999). "Mice transgenic for an expanded CAG repeat in the Huntington's disease gene develop diabetes." *Diabetes* **48**(3): 649-651.
- Hussein, S. M., N. N. Batada, et al. (2011). "Copy number variation and selection during reprogramming to pluripotency." *Nature* **471**(7336): 58-62.
- Iannicola, C., S. Moreno, et al. (2000). "Early alterations in gene expression and cell morphology in a mouse model of Huntington's disease." *J Neurochem* **75**(2): 830-839.
- Igarashi, S., H. Morita, et al. (2003). "Inducible PC12 cell model of Huntington's disease shows toxicity and decreased histone acetylation." *Neuroreport* **14**(4): 565-568.
- Ishiguro, H., K. Yamada, et al. (2001). "Age-dependent and tissue-specific CAG repeat instability occurs in mouse knock-in for a mutant Huntington's disease gene." *J Neurosci Res* **65**(4): 289-297.
- Itsykson, P., N. Ilouz, et al. (2005). "Derivation of neural precursors from human embryonic stem cells in the presence of noggin." *Mol Cell Neurosci* **30**(1): 24-36.
- Jackson, G. R., I. Salecker, et al. (1998). "Polyglutamine-expanded human huntingtin transgenes induce degeneration of Drosophila photoreceptor neurons." *Neuron* **21**(3): 633-642.
- Jacobsen, J. C., G. C. Gregory, et al. (2011). "HD CAG-correlated gene expression changes support a simple dominant gain of function." *Hum Mol Genet* **20**(14): 2846-2860.
- Jain, M., R. J. Armstrong, et al. (2003). "Migration and differentiation of transplanted human neural precursor cells." *Neuroreport* **14**(9): 1257-1262.
- Jana, N. R., E. A. Zemskov, et al. (2001). "Altered proteasomal function due to the expression of polyglutamine-expanded truncated N-terminal huntingtin induces apoptosis by caspase activation through mitochondrial cytochrome c release." *Hum Mol Genet* **10**(10): 1049-1059.

- Jenkins, B. G., W. J. Koroshetz, et al. (1993). "Evidence for impairment of energy metabolism in vivo in Huntington's disease using localized <sup>1</sup>H NMR spectroscopy." *Neurology* **43**(12): 2689-2695.
- Jenkins, B. G., H. D. Rosas, et al. (1998). "1H NMR spectroscopy studies of Huntington's disease: correlations with CAG repeat numbers." *Neurology* **50**(5): 1357-1365.
- Jeong, H., F. Then, et al. (2009). "Acetylation targets mutant huntingtin to autophagosomes for degradation." *Cell* **137**(1): 60-72.
- Jiang, H., M. A. Poirier, et al. (2006). "Depletion of CBP is directly linked with cellular toxicity caused by mutant huntingtin." *Neurobiol Dis* **23**(3): 543-551.
- Johnson, R. and N. J. Buckley (2009). "Gene dysregulation in Huntington's disease: REST, microRNAs and beyond." *Neuromolecular Med* **11**(3): 183-199.
- Josefsen, K., M. D. Nielsen, et al. (2008). "Impaired glucose tolerance in the R6/1 transgenic mouse model of Huntington's disease." *J Neuroendocrinol* **20**(2): 165-172.
- Kallioniemi, O. P., A. Kallioniemi, et al. (1993). "Comparative genomic hybridization: a rapid new method for detecting and mapping DNA amplification in tumors." *Semin Cancer Biol* **4**(1): 41-46.
- Kaltenbach, L. S., E. Romero, et al. (2007). "Huntingtin interacting proteins are genetic modifiers of neurodegeneration." *PLoS Genet* **3**(5): e82.
- Kapp, M. B. (2006). "Ethical and legal issues in research involving human subjects: do you want a piece of me?" *J Clin Pathol* **59**(4): 335-339.
- Kassubek, J., W. Gaus, et al. (2004). "Evidence for more widespread cerebral pathology in early HD: an MRI-based morphometric analysis." *Neurology* **62**(3): 523-524; author reply 524.
- Kassubek, J., F. D. Juengling, et al. (2005). "Thalamic atrophy in Huntington's disease co-varies with cognitive performance: a morphometric MRI analysis." *Cereb Cortex* **15**(6): 846-853.
- Kasyapa, C., T. L. Gu, et al. (2009). "Phosphorylation of the SSBP2 and ABL proteins by the ZNF198-FGFR1 fusion kinase seen in atypical myeloproliferative disorders as revealed by phosphopeptide-specific MS." *Proteomics* **9**(16): 3979-3988.
- Kauffman, J. S., A. Zinovyeva, et al. (2003). "Neural expression of the Huntington's disease gene as a chordate evolutionary novelty." *J Exp Zool B Mol Dev Evol* **297**(1): 57-64.
- Kawai, T. and S. Akira (2011). "Regulation of innate immune signalling pathways by the tripartite motif (TRIM) family proteins." *EMBO Mol Med*.
- Kawasaki, H., K. Mizuseki, et al. (2000). "Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity." *Neuron* **28**(1): 31-40.
- Kazantsev, A., E. Preisinger, et al. (1999). "Insoluble detergent-resistant aggregates form between pathological and nonpathological lengths of polyglutamine in mammalian cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(20): 11404-11409.
- Kegel, K. B., A. R. Meloni, 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**(9): 7466-7476.
- Kennedy, L., E. Evans, et al. (2003). "Dramatic tissue-specific mutation length increases are an early molecular event in Huntington disease pathogenesis." *Hum Mol Genet* **12**(24): 3359-3367.
- Kim, M. W., Y. Chelliah, et al. (2009). "Secondary structure of Huntingtin amino-terminal region." *Structure* **17**(9): 1205-1212.
- Kim, Y. J., Y. Yi, et al. (2001). "Caspase 3-cleaved N-terminal fragments of wild-type and mutant huntingtin are present in normal and Huntington's disease brains, associate with membranes, and undergo calpain-dependent proteolysis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(22): 12784-12789.
- Kirkwood, S. C., J. L. Su, et al. (2001). "Progression of symptoms in the early and middle stages of Huntington disease." *Arch Neurol* **58**(2): 273-278.
- Kita, H., J. Carmichael, et al. (2002). "Modulation of polyglutamine-induced cell death by genes identified by expression profiling." *Hum Mol Genet* **11**(19): 2279-2287.
- Kleinsmith, L. J. and G. B. Pierce, Jr. (1964). "Multipotentiality of Single Embryonal Carcinoma Cells." *Cancer Res* **24**: 1544-1551.
- Klingmueller, F., T. Tuechler, et al. (2011). "Cross-platform comparison of microarray data using order restricted inference." *Bioinformatics* **27**(7): 953-960.
- Koch, P., T. Opitz, et al. (2009). "A rosette-type, self-renewing human ES cell-derived neural stem cell with potential for in vitro instruction and synaptic integration." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(9): 3225-3230.
- Korona, D. A., K. G. Lecompte, et al. (2011). "The high fidelity and unique error signature of human DNA polymerase epsilon." *Nucleic Acids Res* **39**(5): 1763-1773.
- Koroshetz, W. J., B. G. Jenkins, et al. (1997). "Energy metabolism defects in Huntington's disease and effects of coenzyme Q10." *Ann Neurol* **41**(2): 160-165.
- Kosinski, C. M., C. Schlangen, et al. (2007). "Myopathy as a first symptom of Huntington's disease in a Marathon runner." *Mov Disord* **22**(11): 1637-1640.

- Kovtun, I. V., Y. Liu, et al. (2007). "OGG1 initiates age-dependent CAG trinucleotide expansion in somatic cells." *Nature* **447**(7143): 447-452.
- Kremer, B., P. Goldberg, et al. (1994). "A worldwide study of the Huntington's disease mutation. The sensitivity and specificity of measuring CAG repeats." *N Engl J Med* **330**(20): 1401-1406.
- Kremer, H. P., R. A. Roos, et al. (1990). "Atrophy of the hypothalamic lateral tuberal nucleus in Huntington's disease." *J Neuropathol Exp Neurol* **49**(4): 371-382.
- Kremer, H. P., R. A. Roos, et al. (1991). "The hypothalamic lateral tuberal nucleus and the characteristics of neuronal loss in Huntington's disease." *Neurosci Lett* **132**(1): 101-104.
- Krobitsch, S. and S. Lindquist (2000). "Aggregation of huntingtin in yeast varies with the length of the polyglutamine expansion and the expression of chaperone proteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(4): 1589-1594.
- Kronke, G., V. N. Bochkov, et al. (2003). "Oxidized phospholipids induce expression of human heme oxygenase-1 involving activation of cAMP-responsive element-binding protein." *J Biol Chem* **278**(51): 51006-51014.
- Kuemmerle, S., C. A. Gutekunst, et al. (1999). "Huntington aggregates may not predict neuronal death in Huntington's disease." *Ann Neurol* **46**(6): 842-849.
- Kuhl, D. E., C. H. Markham, et al. (1985). "Local cerebral glucose utilization in symptomatic and presymptomatic Huntington's disease." *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis* **63**: 199-209.
- Kuhl, D. E., E. J. Metter, et al. (1984). "Patterns of cerebral glucose utilization in Parkinson's disease and Huntington's disease." *Ann Neurol* **15** Suppl: S119-125.
- Kuhl, D. E., M. E. Phelps, et al. (1982). "Cerebral metabolism and atrophy in Huntington's disease determined by 18FDG and computed tomographic scan." *Ann Neurol* **12**(5): 425-434.
- Kuhn, A., D. R. Goldstein, et al. (2007). "Mutant huntingtin's effects on striatal gene expression in mice recapitulate changes observed in human Huntington's disease brain and do not differ with mutant huntingtin length or wild-type huntingtin dosage." *Hum Mol Genet* **16**(15): 1845-1861.
- Kuhn, A., D. Thu, et al. (2011). "Population-specific expression analysis (PSEA) reveals molecular changes in diseased brain." *Nat Methods* **8**(11): 945-947.
- Kukekov, V. G., E. D. Laywell, et al. (1999). "Multipotent stem/progenitor cells with similar properties arise from two neurogenic regions of adult human brain." *Exp Neurol* **156**(2): 333-344.
- Lalic, N. M., J. Maric, et al. (2008). "Glucose homeostasis in Huntington disease: abnormalities in insulin sensitivity and early-phase insulin secretion." *Arch Neurol* **65**(4): 476-480.
- Landles, C. and G. P. Bates (2004). "Huntingtin and the molecular pathogenesis of Huntington's disease. Fourth in molecular medicine review series." *EMBO Rep* **5**(10): 958-963.
- Langbehn, D. R., R. R. Brinkman, et al. (2004). "A new model for prediction of the age of onset and penetrance for Huntington's disease based on CAG length." *Clin Genet* **65**(4): 267-277.
- Lanska, D. J., L. Lavine, et al. (1988). "Huntington's disease mortality in the United States." *Neurology* **38**(5): 769-772.
- Lashkari, D. A., J. L. DeRisi, et al. (1997). "Yeast microarrays for genome wide parallel genetic and gene expression analysis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(24): 13057-13062.
- Law, I. K., L. Liu, et al. (2009). "Identification and characterization of proteins interacting with SIRT1 and SIRT3: implications in the anti-aging and metabolic effects of sirtuins." *Proteomics* **9**(9): 2444-2456.
- Leavitt, B. R., J. A. Guttman, et al. (2001). "Wild-type huntingtin reduces the cellular toxicity of mutant huntingtin in vivo." *Am J Hum Genet* **68**(2): 313-324.
- Leavitt, B. R., J. M. van Raamsdonk, et al. (2006). "Wild-type huntingtin protects neurons from excitotoxicity." *J Neurochem* **96**(4): 1121-1129.
- Lee, G., E. P. Papapetrou, et al. (2009). "Modelling pathogenesis and treatment of familial dysautonomia using patient-specific iPSCs." *Nature* **461**(7262): 402-406.
- Lee, H., G. A. Shamy, et al. (2007). "Directed differentiation and transplantation of human embryonic stem cell-derived motoneurons." *Stem Cells* **25**(8): 1931-1939.
- Lee, J., C. H. Kim, et al. (2005). "Mitochondrial cyclic AMP response element-binding protein (CREB) mediates mitochondrial gene expression and neuronal survival." *J Biol Chem* **280**(49): 40398-40401.
- Lee, J. M., J. Zhang, et al. (2010). "A novel approach to investigate tissue-specific trinucleotide repeat instability." *BMC Syst Biol* **4**: 29.
- Lee, S. T., K. Chu, et al. (2009). "Slowed progression in models of Huntington disease by adipose stem cell transplantation." *Ann Neurol* **66**(5): 671-681.
- Lee, W. C., M. Yoshihara, et al. (2004). "Cytoplasmic aggregates trap polyglutamine-containing proteins and block axonal transport in a Drosophila model of Huntington's disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(9): 3224-3229.
- Lefort, N., M. Feyeux, et al. (2008). "Human embryonic stem cells reveal recurrent genomic instability at 20q11.21." *Nat Biotechnol* **26**(12): 1364-1366.

- Leonardi, A., I. S. De Martini, et al. (1978). "Skin fibroblasts in Huntington's disease." *N Engl J Med* **298**(11): 632.
- Li, H., S. H. Li, et al. (2000). "Amino-terminal fragments of mutant huntingtin show selective accumulation in striatal neurons and synaptic toxicity." *Nat Genet* **25**(4): 385-389.
- Li, H., S. H. Li, et al. (2001). "Huntingtin aggregate-associated axonal degeneration is an early pathological event in Huntington's disease mice." *J Neurosci* **21**(21): 8473-8481.
- Li, H., T. Wyman, et al. (2003). "Abnormal association of mutant huntingtin with synaptic vesicles inhibits glutamate release." *Hum Mol Genet* **12**(16): 2021-2030.
- Li, S. H., A. L. Cheng, et al. (2002). "Interaction of Huntington disease protein with transcriptional activator Sp1." *Mol Cell Biol* **22**(5): 1277-1287.
- Li, S. H., C. A. Gutekunst, et al. (1998). "Interaction of huntingtin-associated protein with dynactin P150Glued." *J Neurosci* **18**(4): 1261-1269.
- Li, S. H. and X. J. Li (2004). "Huntingtin-protein interactions and the pathogenesis of Huntington's disease." *Trends Genet* **20**(3): 146-154.
- Li, Z., C. A. Karlovich, et al. (1999). "A putative Drosophila homolog of the Huntington's disease gene." *Hum Mol Genet* **8**(9): 1807-1815.
- Lievens, J. C., M. Dutertre, et al. (1997). "Continuous administration of the glutamate uptake inhibitor L-trans-pyrrolidine-2,4-dicarboxylate produces striatal lesion." *Brain Res Mol Brain Res* **50**(1-2): 181-189.
- Lievens, J. C., B. Woodman, et al. (2001). "Impaired glutamate uptake in the R6 Huntington's disease transgenic mice." *Neurobiol Dis* **8**(5): 807-821.
- Lin, B., J. Nasir, et al. (1994). "Sequence of the murine Huntington disease gene: evidence for conservation, alternate splicing and polymorphism in a triplet (CCG) repeat [corrected]." *Hum Mol Genet* **3**(1): 85-92.
- Lin, B., J. M. Rommens, et al. (1993). "Differential 3' polyadenylation of the Huntington disease gene results in two mRNA species with variable tissue expression." *Hum Mol Genet* **2**(10): 1541-1545.
- Lin, J., P. H. Wu, et al. (2004). "Defects in adaptive energy metabolism with CNS-linked hyperactivity in PGC-1alpha null mice." *Cell* **119**(1): 121-135.
- Lipton, S. A. and P. A. Rosenberg (1994). "Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders." *N Engl J Med* **330**(9): 613-622.
- Liu, C. S., W. L. Cheng, et al. (2008). "Depletion of mitochondrial DNA in leukocytes of patients with poly-Q diseases." *J Neurol Sci* **264**(1-2): 18-21.
- Liu, Z., R. Steward, et al. (2000). "Drosophila Lis1 is required for neuroblast proliferation, dendritic elaboration and axonal transport." *Nat Cell Biol* **2**(11): 776-783.
- Lodi, R., A. H. Schapira, et al. (2000). "Abnormal in vivo skeletal muscle energy metabolism in Huntington's disease and dentatorubropallidoluysian atrophy." *Ann Neurol* **48**(1): 72-76.
- Lombardi, M. S., L. Jaspers, et al. (2009). "A majority of Huntington's disease patients may be treatable by individualized allele-specific RNA interference." *Exp Neurol* **217**(2): 312-319.
- Lumsden, A. L., T. L. Henshall, et al. (2007). "Huntingtin-deficient zebrafish exhibit defects in iron utilization and development." *Hum Mol Genet* **16**(16): 1905-1920.
- Lunkes, A., K. S. Lindenberg, et al. (2002). "Proteases acting on mutant huntingtin generate cleaved products that differentially build up cytoplasmic and nuclear inclusions." *Mol Cell* **10**(2): 259-269.
- Luthi-Carter, R., S. A. Hanson, et al. (2002). "Dysregulation of gene expression in the R6/2 model of polyglutamine disease: parallel changes in muscle and brain." *Hum Mol Genet* **11**(17): 1911-1926.
- Luthi-Carter, R., A. Strand, et al. (2000). "Decreased expression of striatal signaling genes in a mouse model of Huntington's disease." *Hum Mol Genet* **9**(9): 1259-1271.
- Luthi-Carter, R., A. D. Strand, et al. (2002). "Polyglutamine and transcription: gene expression changes shared by DRPLA and Huntington's disease mouse models reveal context-independent effects." *Hum Mol Genet* **11**(17): 1927-1937.
- Lynch, D. R. and R. P. Guttman (2002). "Excitotoxicity: perspectives based on N-methyl-D-aspartate receptor subtypes." *J Pharmacol Exp Ther* **300**(3): 717-723.
- Ma, D. K., M. A. Bonaguidi, et al. (2009). "Adult neural stem cells in the mammalian central nervous system." *Cell Res* **19**(6): 672-682.
- Ma, W., T. Tavakoli, et al. (2008). "Cell-extracellular matrix interactions regulate neural differentiation of human embryonic stem cells." *BMC Dev Biol* **8**: 90.
- MacDonald, M. E., G. Barnes, et al. (1993). "Gametic but not somatic instability of CAG repeat length in Huntington's disease." *J Med Genet* **30**(12): 982-986.
- Machida, Y., T. Okada, et al. (2006). "rAAV-mediated shRNA ameliorated neuropathology in Huntington disease model mouse." *Biochem Biophys Res Commun* **343**(1): 190-197.

- Maglione, V., M. Cannella, et al. (2006). "Huntingtin fragmentation and increased caspase 3, 8 and 9 activities in lymphoblasts with heterozygous and homozygous Huntington's disease mutation." *Mech Ageing Dev* **127**(2): 213-216.
- Mahant, N., E. A. McCusker, et al. (2003). "Huntington's disease: clinical correlates of disability and progression." *Neurology* **61**(8): 1085-1092.
- Maherali, N., R. Sridharan, et al. (2007). "Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution." *Cell Stem Cell* **1**(1): 55-70.
- Maltsberger, J. T. (1961). "Even unto the twelfth generation--Huntington's chorea." *J Hist Med Allied Sci* **16**: 1-17.
- Mangiarini, L., K. Sathasivam, et al. (1996). "Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice." *Cell* **87**(3): 493-506.
- Marcora, E., K. Gowan, et al. (2003). "Stimulation of NeuroD activity by huntingtin and huntingtin-associated proteins HAP1 and MLK2." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(16): 9578-9583.
- Marie, H., W. Morishita, et al. (2005). "Generation of silent synapses by acute in vivo expression of CaMKIV and CREB." *Neuron* **45**(5): 741-752.
- Marshall, P. E., D. M. Landis, et al. (1983). "Immunocytochemical studies of substance P and leucine-enkephalin in Huntington's disease." *Brain Res* **289**(1-2): 11-26.
- Marteyn, A., Y. Maury, et al. (2011). "Mutant human embryonic stem cells reveal neurite and synapse formation defects in type 1 myotonic dystrophy." *Cell Stem Cell* **8**(4): 434-444.
- Martin, B., E. Golden, et al. (2009). "Exendin-4 improves glycemic control, ameliorates brain and pancreatic pathologies, and extends survival in a mouse model of Huntington's disease." *Diabetes* **58**(2): 318-328.
- Martin, E., S. Betuing, et al. (2011). "Mitogen- and stress-activated protein kinase 1-induced neuroprotection in Huntington's disease: role on chromatin remodeling at the PGC-1-alpha promoter." *Hum Mol Genet* **20**(12): 2422-2434.
- Martin, E. W., Jr., M. Cooperman, et al. (1980). "Sixty second-look procedures indicated primarily by rise in serial carcinoembryonic antigen." *J Surg Res* **28**(5): 389-394.
- Martin, G. R. (1981). "Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**(12): 7634-7638.
- Mastromauro, C. A., G. J. Meissen, et al. (1989). "Estimation of fertility and fitness in Huntington disease in New England." *Am J Med Genet* **33**(2): 248-254.
- Mateizel, I., N. De Temmerman, et al. (2006). "Derivation of human embryonic stem cell lines from embryos obtained after IVF and after PGD for monogenic disorders." *Hum Reprod* **21**(2): 503-511.
- Maue, R. A., S. D. Kraner, et al. (1990). "Neuron-specific expression of the rat brain type II sodium channel gene is directed by upstream regulatory elements." *Neuron* **4**(2): 223-231.
- Maury, Y., M. Gauthier, et al. (2011). "[Human pluripotent stem cells: opening key for pathological modeling]." *Med Sci (Paris)* **27**(4): 443-446.
- McGeer, E. G. and P. L. McGeer (1976). "Duplication of biochemical changes of Huntington's chorea by intrastriatal injections of glutamic and kainic acids." *Nature* **263**(5577): 517-519.
- McGovern, D. and T. Webb (1982). "Sensitivity to ionising radiation of lymphocytes from Huntington's chorea patients compared to controls." *J Med Genet* **19**(3): 168-174.
- McGuire, J. R., J. Rong, et al. (2006). "Interaction of Huntingtin-associated protein-1 with kinesin light chain: implications in intracellular trafficking in neurons." *J Biol Chem* **281**(6): 3552-3559.
- Menalled, L. B., J. D. Sison, et al. (2002). "Early motor dysfunction and striosomal distribution of huntingtin microaggregates in Huntington's disease knock-in mice." *J Neurosci* **22**(18): 8266-8276.
- Menkes, J. H. and N. Stein (1973). "Fibroblast cultures in Huntington's disease." *N Engl J Med* **288**(16): 856-857.
- Meriin, A. B., X. Zhang, et al. (2002). "Huntington toxicity in yeast model depends on polyglutamine aggregation mediated by a prion-like protein Rnq1." *J Cell Biol* **157**(6): 997-1004.
- Mihm, M. J., D. M. Amann, et al. (2007). "Cardiac dysfunction in the R6/2 mouse model of Huntington's disease." *Neurobiol Dis* **25**(2): 297-308.
- Mikkelsen, T. S., J. Hanna, et al. (2008). "Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis." *Nature* **454**(7200): 49-55.
- Miller, B. R., J. L. Dorner, et al. (2008). "Up-regulation of GLT1 expression increases glutamate uptake and attenuates the Huntington's disease phenotype in the R6/2 mouse." *Neuroscience* **153**(1): 329-337.
- Miller, V. M., H. Xia, et al. (2003). "Allele-specific silencing of dominant disease genes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(12): 7195-7200.

- Milnerwood, A. J., D. M. Cummings, et al. (2006). "Early development of aberrant synaptic plasticity in a mouse model of Huntington's disease." *Hum Mol Genet* **15**(10): 1690-1703.
- Moffett, J. R., B. Ross, et al. (2007). "N-Acetylaspartate in the CNS: from neurodiagnostics to neurobiology." *Prog Neurobiol* **81**(2): 89-131.
- Moffitt, H., G. D. McPhail, et al. (2009). "Formation of polyglutamine inclusions in a wide range of non-CNS tissues in the HdhQ150 knock-in mouse model of Huntington's disease." *PLoS One* **4**(11): e8025.
- Montgomery, S. B., M. Sammeth, et al. (2010). "Transcriptome genetics using second generation sequencing in a Caucasian population." *Nature* **464**(7289): 773-777.
- Montoya, A., B. H. Price, et al. (2006). "Brain imaging and cognitive dysfunctions in Huntington's disease." *J Psychiatry Neurosci* **31**(1): 21-29.
- Morales, L. M., J. Estevez, et al. (1989). "Nutritional evaluation of Huntington disease patients." *Am J Clin Nutr* **50**(1): 145-150.
- Morfini, G. A., Y. M. You, et al. (2009). "Pathogenic huntingtin inhibits fast axonal transport by activating JNK3 and phosphorylating kinesin." *Nat Neurosci* **12**(7): 864-871.
- Morrison, R. S., H. I. Kornblum, et al. (1987). "Trophic stimulation of cultured neurons from neonatal rat brain by epidermal growth factor." *Science* **238**(4823): 72-75.
- Morton, A. J., M. J. Hunt, et al. (2005). "A combination drug therapy improves cognition and reverses gene expression changes in a mouse model of Huntington's disease." *Eur J Neurosci* **21**(4): 855-870.
- Munoz-Sanjuan, I. and A. H. Brivanlou (2002). "Neural induction, the default model and embryonic stem cells." *Nat Rev Neurosci* **3**(4): 271-280.
- Murphy, K. P., R. J. Carter, et al. (2000). "Abnormal synaptic plasticity and impaired spatial cognition in mice transgenic for exon 1 of the human Huntington's disease mutation." *J Neurosci* **20**(13): 5115-5123.
- Myers, R. H., D. S. Sax, et al. (1991). "Factors associated with slow progression in Huntington's disease." *Arch Neurol* **48**(8): 800-804.
- Nachman, M. W. and S. L. Crowell (2000). "Estimate of the mutation rate per nucleotide in humans." *Genetics* **156**(1): 297-304.
- Nance, M. A. and R. H. Myers (2001). "Juvenile onset Huntington's disease--clinical and research perspectives." *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* **7**(3): 153-157.
- Nasir, J., S. B. Floresco, et al. (1995). "Targeted disruption of the Huntington's disease gene results in embryonic lethality and behavioral and morphological changes in heterozygotes." *Cell* **81**(5): 811-823.
- Neuwald, A. F. and T. Hirano (2000). "HEAT repeats associated with condensins, cohesins, and other complexes involved in chromosome-related functions." *Genome Res* **10**(10): 1445-1452.
- Niclis, J. C., A. O. Trounson, et al. (2009). "Human embryonic stem cell models of Huntington disease." *Reprod Biomed Online* **19**(1): 106-113.
- Norris, P. J., H. J. Waldvogel, et al. (1996). "Decreased neuronal nitric oxide synthase messenger RNA and somatostatin messenger RNA in the striatum of Huntington's disease." *Neuroscience* **72**(4): 1037-1047.
- Nucifora, F. C., Jr., M. Sasaki, et al. (2001). "Interference by huntingtin and atrophin-1 with cbp-mediated transcription leading to cellular toxicity." *Science* **291**(5512): 2423-2428.
- Nurcombe, V., M. D. Ford, et al. (1993). "Developmental regulation of neural response to FGF-1 and FGF-2 by heparan sulfate proteoglycan." *Science* **260**(5104): 103-106.
- O'Malley, J., K. Woltjen, et al. (2009). "New strategies to generate induced pluripotent stem cells." *Curr Opin Biotechnol* **20**(5): 516-521.
- Obrietan, K. and K. R. Hoyt (2004). "CRE-mediated transcription is increased in Huntington's disease transgenic mice." *J Neurosci* **24**(4): 791-796.
- Ohi, Y., H. Qin, et al. (2011). "Incomplete DNA methylation underlies a transcriptional memory of somatic cells in human iPS cells." *Nat Cell Biol* **13**(5): 541-549.
- Ohyama, M., J. C. Vogel, et al. (2007). "Gene ontology analysis of human hair follicle bulge molecular signature." *J Dermatol Sci* **45**(2): 147-150.
- Okita, K., T. Ichisaka, et al. (2007). "Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells." *Nature* **448**(7151): 313-317.
- Okita, K., M. Nakagawa, et al. (2008). "Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors." *Science* **322**(5903): 949-953.
- Olsen, S. R. and M. D. Uhler (1991). "Isolation and characterization of cDNA clones for an inhibitor protein of cAMP-dependent protein kinase." *J Biol Chem* **266**(17): 11158-11162.
- Orr, A. L., S. Li, et al. (2008). "N-terminal mutant huntingtin associates with mitochondria and impairs mitochondrial trafficking." *J Neurosci* **28**(11): 2783-2792.

- Owen, M. and A. J. Friedenstein (1988). "Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors." Ciba Found Symp **136**: 42-60.
- Palfi, S., R. J. Ferrante, et al. (1996). "Chronic 3-nitropropionic acid treatment in baboons replicates the cognitive and motor deficits of Huntington's disease." J Neurosci **16**(9): 3019-3025.
- Palidwor, G. A., S. Shcherbinin, et al. (2009). "Detection of alpha-rod protein repeats using a neural network and application to huntingtin." PLoS Comput Biol **5**(3): e1000304.
- Panov, A. V., J. R. Burke, et al. (2003). "In vitro effects of polyglutamine tracts on Ca<sup>2+</sup>-dependent depolarization of rat and human mitochondria: relevance to Huntington's disease." Arch Biochem Biophys **410**(1): 1-6.
- Panov, A. V., C. A. Gutekunst, et al. (2002). "Early mitochondrial calcium defects in Huntington's disease are a direct effect of polyglutamines." Nat Neurosci **5**(8): 731-736.
- Papalexi, E., A. Persson, et al. (2005). "Reduction of GnRH and infertility in the R6/2 mouse model of Huntington's disease." Eur J Neurosci **22**(6): 1541-1546.
- Park, I. H., N. Arora, et al. (2008). "Disease-Specific Induced Pluripotent Stem Cells." Cell.
- Park, I. H., N. Arora, et al. (2008). "Disease-specific induced pluripotent stem cells." Cell **134**(5): 877-886.
- Parker, J. A., M. Metzler, et al. (2007). "Huntingtin-interacting protein 1 influences worm and mouse presynaptic function and protects *Caenorhabditis elegans* neurons against mutant polyglutamine toxicity." J Neurosci **27**(41): 11056-11064.
- Patterson, M., D. N. Chan, et al. (2011). "Defining the nature of human pluripotent stem cell progeny." Cell Res.
- Paulsen, J. S., V. A. Magnotta, et al. (2006). "Brain structure in preclinical Huntington's disease." Biol Psychiatry **59**(1): 57-63.
- Pearson, C. E. (2003). "Slipping while sleeping? Trinucleotide repeat expansions in germ cells." Trends Mol Med **9**(11): 490-495.
- Penney, J. B., Jr., A. B. Young, et al. (1990). "Huntington's disease in Venezuela: 7 years of follow-up on symptomatic and asymptomatic individuals." Mov Disord **5**(2): 93-99.
- Perrier, A. L., V. Tabar, et al. (2004). "Derivation of midbrain dopamine neurons from human embryonic stem cells." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(34): 12543-12548.
- Perutz, M. F., T. Johnson, et al. (1994). "Glutamine repeats as polar zippers: their possible role in inherited neurodegenerative diseases." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(12): 5355-5358.
- Peter Giles, L. E., Gemma V. Higgs, Simon P. Brooks, Stephen B. Dunnett and a. L. Jones (2011). "Longitudinal analysis of gene expression and behaviour in the HdhQ150 mouse model of Huntington's disease." Brain Research Bulletin (in press).
- Petersen, A., J. Gil, et al. (2005). "Orexin loss in Huntington's disease." Hum Mol Genet **14**(1): 39-47.
- Pettegrew, J. W., J. S. Nichols, et al. (1980). "Membrane studies in Huntington's disease: steady-state fluorescence studies of intact erythrocytes." Ann Neurol **8**(4): 381-386.
- Pettegrew, J. W., J. S. Nichols, et al. (1981). "Membrane studies in Huntington's disease: steady state and time-dependent fluorescence spectroscopy of intact lymphocytes." J Neurochem **36**(6): 1966-1976.
- Pfister, E. L., L. Kennington, et al. (2009). "Five siRNAs targeting three SNPs may provide therapy for three-quarters of Huntington's disease patients." Curr Biol **19**(9): 774-778.
- Phan, J., M. A. Hickey, et al. (2009). "Adipose tissue dysfunction tracks disease progression in two Huntington's disease mouse models." Hum Mol Genet **18**(6): 1006-1016.
- Pierce, G. B., L. C. Stevens, et al. (1967). "Ultrastructural analysis of the early development of teratocarcinomas." J Natl Cancer Inst **39**(4): 755-773.
- Podolsky, S. and N. A. Leopold (1977). "Abnormal glucose tolerance and arginine tolerance tests in Huntington's disease." Gerontology **23**(1): 55-63.
- Podolsky, S., N. A. Leopold, et al. (1972). "Increased frequency of diabetes mellitus in patients with Huntington's chorea." Lancet **1**(7765): 1356-1358.
- Politis, M., N. Pavese, et al. (2008). "Hypothalamic involvement in Huntington's disease: an in vivo PET study." Brain **131**(Pt 11): 2860-2869.
- Prather, R. S. and N. L. First (1990). "Nuclear transfer in mammalian embryos." Int Rev Cytol **120**: 169-190.
- Pratley, R. E., A. D. Salbe, et al. (2000). "Higher sedentary energy expenditure in patients with Huntington's disease." Ann Neurol **47**(1): 64-70.
- Pridmore, S. A. and G. C. Adams (1991). "The fertility of HD-affected individuals in Tasmania." Aust N Z J Psychiatry **25**(2): 262-264.
- Prockop, D. J. (1997). "Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues." Science **276**(5309): 71-74.

- Puigserver, P. and B. M. Spiegelman (2003). "Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator." Endocr Rev **24**(1): 78-90.
- Quinn, N. and A. Schrag (1998). "Huntington's disease and other choreas." J Neurol **245**(11): 709-716.
- Ramsay, G. (1998). "DNA chips: state-of-the art." Nat Biotechnol **16**(1): 40-44.
- Rangone, H., G. Poizat, et al. (2004). "The serum- and glucocorticoid-induced kinase SGK inhibits mutant huntingtin-induced toxicity by phosphorylating serine 421 of huntingtin." Eur J Neurosci **19**(2): 273-279.
- Rauskolb, S., M. Zagrebelsky, et al. (2010). "Global deprivation of brain-derived neurotrophic factor in the CNS reveals an area-specific requirement for dendritic growth." J Neurosci **30**(5): 1739-1749.
- Ravikumar, B., A. Acevedo-Arozena, et al. (2005). "Dynein mutations impair autophagic clearance of aggregate-prone proteins." Nat Genet **37**(7): 771-776.
- Redmond, L., A. H. Kashani, et al. (2002). "Calcium regulation of dendritic growth via CaM kinase IV and CREB-mediated transcription." Neuron **34**(6): 999-1010.
- Reiner, A., R. L. Albin, et al. (1988). "Differential loss of striatal projection neurons in Huntington disease." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(15): 5733-5737.
- Reubinoff, B. E., P. Itsykson, et al. (2001). "Neural progenitors from human embryonic stem cells." Nat Biotechnol **19**(12): 1134-1140.
- Rey, A. (2003). "[Are stem cells well named?]." Med Sci (Paris) **19**(6-7): 645.
- Reymond, A., G. Meroni, et al. (2001). "The tripartite motif family identifies cell compartments." EMBO J **20**(9): 2140-2151.
- Reynolds, B. A., W. Tetzlaff, et al. (1992). "A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes." J Neurosci **12**(11): 4565-4574.
- Reynolds, B. A. and S. Weiss (1992). "Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system." Science **255**(5052): 1707-1710.
- Reynolds, B. A. and S. Weiss (1996). "Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell." Dev Biol **175**(1): 1-13.
- Reynolds, J. D. and J. F. Brien (1992). "Ontogeny of glutamate and gamma-aminobutyric acid release in the hippocampus of the guinea pig." J Dev Physiol **18**(5): 243-252.
- Ribchester, R. R., D. Thomson, et al. (2004). "Progressive abnormalities in skeletal muscle and neuromuscular junctions of transgenic mice expressing the Huntington's disease mutation." Eur J Neurosci **20**(11): 3092-3114.
- Richardson, E. P., Jr. (1990). "Third Dorothy S. Russell memorial lecture. Huntington's disease: some recent neuropathological studies." Neuropathol Appl Neurobiol **16**(6): 451-460.
- Ridley, R. M., C. D. Frith, et al. (1988). "Anticipation in Huntington's disease is inherited through the male line but may originate in the female." J Med Genet **25**(9): 589-595.
- Rigamonti, D., S. Sipione, et al. (2001). "Huntingtin's neuroprotective activity occurs via inhibition of procaspase-9 processing." J Biol Chem **276**(18): 14545-14548.
- Ringer, S. and D. W. Buxton (1885). "Concerning the Action of small quantities of Calcium, Sodium, and Potassium Salts upon the Vitality and Function of Contractile Tissue and the Cuticular Cells of Fishes." J Physiol **6**(4-5): 154-161.
- Ringer, S. and H. Sainsbury (1882). "Concerning the action of Salts of Potash, Soda, and Ammonia on the Frog's Heart." Med Chir Trans **65**: 191-224 195.
- Rockabrand, E., N. Slepko, et al. (2007). "The first 17 amino acids of Huntingtin modulate its sub-cellular localization, aggregation and effects on calcium homeostasis." Hum Mol Genet **16**(1): 61-77.
- Rodriguez-Lebron, E., E. M. Denovan-Wright, et al. (2005). "Intrastriatal rAAV-mediated delivery of anti-huntingtin shRNAs induces partial reversal of disease progression in R6/1 Huntington's disease transgenic mice." Mol Ther **12**(4): 618-633.
- Roizin, L., S. Stellar, et al. (1974). "Electron microscope and enzyme studies in cerebral biopsies of Huntington's chorea." Trans Am Neurol Assoc **99**: 240-243.
- Rosas, H. D., A. S. Feigin, et al. (2004). "Using advances in neuroimaging to detect, understand, and monitor disease progression in Huntington's disease." NeuroRx **1**(2): 263-272.
- Rosas, H. D., N. D. Hevelone, et al. (2005). "Regional cortical thinning in preclinical Huntington disease and its relationship to cognition." Neurology **65**(5): 745-747.
- Rosas, H. D., W. J. Koroshetz, et al. (2003). "Evidence for more widespread cerebral pathology in early HD: an MRI-based morphometric analysis." Neurology **60**(10): 1615-1620.
- Rosas, H. D., D. H. Salat, et al. (2008). "Cerebral cortex and the clinical expression of Huntington's disease: complexity and heterogeneity." Brain **131**(Pt 4): 1057-1068.



- Rosas, H. D., D. S. Tuch, et al. (2006). "Diffusion tensor imaging in presymptomatic and early Huntington's disease: Selective white matter pathology and its relationship to clinical measures." *Mov Disord* **21**(9): 1317-1325.
- Ross, C. A. and S. J. Tabrizi (2011). "Huntington's disease: from molecular pathogenesis to clinical treatment." *Lancet Neurol* **10**(1): 83-98.
- Rothstein, J. D., S. Patel, et al. (2005). "Beta-lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression." *Nature* **433**(7021): 73-77.
- Sadri-Vakili, G., A. S. Menon, et al. (2006). "Huntingtin inclusions do not down-regulate specific genes in the R6/2 Huntington's disease mouse." *Eur J Neurosci* **23**(12): 3171-3175.
- Saft, C., J. Zange, et al. (2005). "Mitochondrial impairment in patients and asymptomatic mutation carriers of Huntington's disease." *Mov Disord* **20**(6): 674-679.
- Sanai, N., A. D. Tramontin, et al. (2004). "Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration." *Nature* **427**(6976): 740-744.
- Sanberg, P. R., H. C. Fibiger, et al. (1981). "Body weight and dietary factors in Huntington's disease patients compared with matched controls." *Med J Aust* **1**(8): 407-409.
- Sasai, Y. and E. M. De Robertis (1997). "Ectodermal patterning in vertebrate embryos." *Dev Biol* **182**(1): 5-20.
- Sathasivam, K., S. Baxendale, et al. (1997). "Aberrant processing of the Fugu HD (FrHD) mRNA in mouse cells and in transgenic mice." *Hum Mol Genet* **6**(12): 2141-2149.
- Sathasivam, K., C. Hobbs, et al. (1999). "Formation of polyglutamine inclusions in non-CNS tissue." *Hum Mol Genet* **8**(5): 813-822.
- Satoh, D., D. Sato, et al. (2008). "Spatial control of branching within dendritic arbors by dynein-dependent transport of Rab5-endosomes." *Nat Cell Biol* **10**(10): 1164-1171.
- Saudou, F., S. Finkbeiner, et al. (1998). "Huntingtin acts in the nucleus to induce apoptosis but death does not correlate with the formation of intranuclear inclusions." *Cell* **95**(1): 55-66.
- Sawa, A., G. W. Wiegand, et al. (1999). "Increased apoptosis of Huntington disease lymphoblasts associated with repeat length-dependent mitochondrial depolarization." *Nat Med* **5**(10): 1194-1198.
- Scarpetta, M. A. and M. D. Uhler (1993). "Evidence for two additional isoforms of the endogenous protein kinase inhibitor of cAMP-dependent protein kinase in mouse." *J Biol Chem* **268**(15): 10927-10931.
- Schaffar, G., P. Breuer, et al. (2004). "Cellular toxicity of polyglutamine expansion proteins: mechanism of transcription factor deactivation." *Mol Cell* **15**(1): 95-105.
- Schena, M., R. A. Heller, et al. (1998). "Microarrays: biotechnology's discovery platform for functional genomics." *Trends Biotechnol* **16**(7): 301-306.
- Schena, M., D. Shalon, et al. (1995). "Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray." *Science* **270**(5235): 467-470.
- Schilling, G., M. W. Becher, et al. (1999). "Intranuclear inclusions and neuritic aggregates in transgenic mice expressing a mutant N-terminal fragment of huntingtin." *Hum Mol Genet* **8**(3): 397-407.
- Schon, E. A. and S. Przedborski (2011). "Mitochondria: the next (neurode)generation." *Neuron* **70**(6): 1033-1053.
- Semaka, A., J. A. Collins, et al. (2010). "Unstable familial transmissions of Huntington disease alleles with 27-35 CAG repeats (intermediate alleles)." *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **153B**(1): 314-320.
- Semaka, A., S. Creighton, et al. (2006). "Predictive testing for Huntington disease: interpretation and significance of intermediate alleles." *Clin Genet* **70**(4): 283-294.
- Seo, M., W. H. Lee, et al. (2010). "Identification of novel cell migration-promoting genes by a functional genetic screen." *FASEB J* **24**(2): 464-478.
- Sermon, K. D., C. Simon, et al. (2009). "Creation of a registry for human embryonic stem cells carrying an inherited defect: joint collaboration between ESHRE and hESCreg." *Hum Reprod* **24**(7): 1556-1560.
- Seto-Ohshima, A., P. C. Emson, et al. (1988). "Loss of matrix calcium-binding protein-containing neurons in Huntington's disease." *Lancet* **1**(8597): 1252-1255.
- Shelbourne, P. F., C. Keller-McGandy, et al. (2007). "Triplet repeat mutation length gains correlate with cell-type specific vulnerability in Huntington disease brain." *Hum Mol Genet* **16**(10): 1133-1142.
- Shen, P. J., C. G. Yuan, et al. (2005). "Galanin in neuro(glio)genesis: expression of galanin and receptors by progenitor cells in vivo and in vitro and effects of galanin on neurosphere proliferation." *Neuropeptides* **39**(3): 201-205.
- Shieh, P. B., S. C. Hu, et al. (1998). "Identification of a signaling pathway involved in calcium regulation of BDNF expression." *Neuron* **20**(4): 727-740.

- Shimojo, M. (2008). "Huntingtin regulates RE1-silencing transcription factor/neuron-restrictive silencer factor (REST/NRSF) nuclear trafficking indirectly through a complex with REST/NRSF-interacting LIM domain protein (RILP) and dynactin p150 Glued." *J Biol Chem* **283**(50): 34880-34886.
- Shin, J. Y., Z. H. Fang, et al. (2005). "Expression of mutant huntingtin in glial cells contributes to neuronal excitotoxicity." *J Cell Biol* **171**(6): 1001-1012.
- Shokeir, M. H. (1975). "Investigation on Huntington's disease in the Canadian Prairies. II. Fecundity and fitness." *Clin Genet* **7**(4): 349-353.
- Silva, J., O. Barrandon, et al. (2008). "Promotion of reprogramming to ground state pluripotency by signal inhibition." *PLoS Biol* **6**(10): e253.
- Sipione, S., D. Rigamonti, et al. (2002). "Early transcriptional profiles in huntingtin-inducible striatal cells by microarray analyses." *Hum Mol Genet* **11**(17): 1953-1965.
- Slow, E. J., R. K. Graham, et al. (2005). "Absence of behavioral abnormalities and neurodegeneration in vivo despite widespread neuronal huntingtin inclusions." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(32): 11402-11407.
- Slow, E. J., J. van Raamsdonk, et al. (2003). "Selective striatal neuronal loss in a YAC128 mouse model of Huntington disease." *Hum Mol Genet* **12**(13): 1555-1567.
- Smith, R., P. Brundin, et al. (2005). "Synaptic dysfunction in Huntington's disease: a new perspective." *Cell Mol Life Sci* **62**(17): 1901-1912.
- Song, C., G. Perides, et al. (2002). "Expression of full-length polyglutamine-expanded Huntingtin disrupts growth factor receptor signaling in rat pheochromocytoma (PC12) cells." *J Biol Chem* **277**(8): 6703-6707.
- Song, H., S. K. Chung, et al. (2010). "Modeling disease in human ESCs using an efficient BAC-based homologous recombination system." *Cell Stem Cell* **6**(1): 80-89.
- Sonntag, K. C., J. Pruszak, et al. (2007). "Enhanced yield of neuroepithelial precursors and midbrain-like dopaminergic neurons from human embryonic stem cells using the bone morphogenic protein antagonist noggin." *Stem Cells* **25**(2): 411-418.
- Sorensen, S. A. and K. Fenger (1992). "Causes of death in patients with Huntington's disease and in unaffected first degree relatives." *J Med Genet* **29**(12): 911-914.
- Sorensen, S. A., K. Fenger, et al. (1999). "Significantly lower incidence of cancer among patients with Huntington disease: An apoptotic effect of an expanded polyglutamine tract?" *Cancer* **86**(7): 1342-1346.
- Spits, C., I. Mateizel, et al. (2008). "Recurrent chromosomal abnormalities in human embryonic stem cells." *Nat Biotechnol* **26**(12): 1361-1363.
- Squitieri, F., M. Cannella, et al. (2006). "Severe ultrastructural mitochondrial changes in lymphoblasts homozygous for Huntington disease mutation." *Mech Ageing Dev* **127**(2): 217-220.
- Squitieri, F., A. Falleni, et al. (2010). "Abnormal morphology of peripheral cell tissues from patients with Huntington disease." *J Neural Transm* **117**(1): 77-83.
- Squitieri, F., C. Gellera, et al. (2003). "Homozygosity for CAG mutation in Huntington disease is associated with a more severe clinical course." *Brain* **126**(Pt 4): 946-955.
- St-Pierre, J., S. Drori, et al. (2006). "Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators." *Cell* **127**(2): 397-408.
- Stadtfeld, M. and K. Hochedlinger (2010). "Induced pluripotency: history, mechanisms, and applications." *Genes Dev* **24**(20): 2239-2263.
- Steffan, J. S., N. Agrawal, et al. (2004). "SUMO modification of Huntingtin and Huntington's disease pathology." *Science* **304**(5667): 100-104.
- Steffan, J. S., L. Bodai, et al. (2001). "Histone deacetylase inhibitors arrest polyglutamine-dependent neurodegeneration in Drosophila." *Nature* **413**(6857): 739-743.
- Steffan, J. S., A. Kazantsev, et al. (2000). "The Huntington's disease protein interacts with p53 and CREB-binding protein and represses transcription." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(12): 6763-6768.
- Strand, A. D., A. K. Aragaki, et al. (2005). "Gene expression in Huntington's disease skeletal muscle: a potential biomarker." *Hum Mol Genet* **14**(13): 1863-1876.
- Strand, A. D., Z. C. Baquet, et al. (2007). "Expression profiling of Huntington's disease models suggests that brain-derived neurotrophic factor depletion plays a major role in striatal degeneration." *J Neurosci* **27**(43): 11758-11768.
- Strehlow, A. N., J. Z. Li, et al. (2007). "Wild-type huntingtin participates in protein trafficking between the Golgi and the extracellular space." *Hum Mol Genet* **16**(4): 391-409.
- Strong, T. V., D. A. Tagle, et al. (1993). "Widespread expression of the human and rat Huntington's disease gene in brain and nonneural tissues." *Nat Genet* **5**(3): 259-265.
- Subramaniam, S., K. M. Sixt, et al. (2009). "Rhes, a striatal specific protein, mediates mutant-huntingtin cytotoxicity." *Science* **324**(5932): 1327-1330.

- Subramanian, A., P. Tamayo, et al. (2005). "Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(43): 15545-15550.
- Sugars, K. L., R. Brown, et al. (2004). "Decreased cAMP response element-mediated transcription: an early event in exon 1 and full-length cell models of Huntington's disease that contributes to polyglutamine pathogenesis." *J Biol Chem* **279**(6): 4988-4999.
- Sugars, K. L. and D. C. Rubinsztein (2003). "Transcriptional abnormalities in Huntington disease." *Trends Genet* **19**(5): 233-238.
- Suhr, S. T., M. C. Senut, et al. (2001). "Identities of sequestered proteins in aggregates from cells with induced polyglutamine expression." *J Cell Biol* **153**(2): 283-294.
- Sultan, M., M. H. Schulz, et al. (2008). "A global view of gene activity and alternative splicing by deep sequencing of the human transcriptome." *Science* **321**(5891): 956-960.
- Sun, Y., A. Savanenin, et al. (2001). "Polyglutamine-expanded huntingtin promotes sensitization of N-methyl-D-aspartate receptors via post-synaptic density 95." *J Biol Chem* **276**(27): 24713-24718.
- Suter, D. M. and K. H. Krause (2008). "Neural commitment of embryonic stem cells: molecules, pathways and potential for cell therapy." *J Pathol* **215**(4): 355-368.
- Suzuki, S., H. Zhou, et al. (2007). "Opposing functions of CREB and MKK1 synergistically regulate the geometry of dendritic spines in visual cortex." *J Comp Neurol* **503**(5): 605-617.
- Swami, M., A. E. Hendricks, et al. (2009). "Somatic expansion of the Huntington's disease CAG repeat in the brain is associated with an earlier age of disease onset." *Hum Mol Genet* **18**(16): 3039-3047.
- Tabar, V., G. Panagiotakos, et al. (2005). "Migration and differentiation of neural precursors derived from human embryonic stem cells in the rat brain." *Nat Biotechnol* **23**(5): 601-606.
- Tabrizi, S. J., D. R. Langbehn, et al. (2009). "Biological and clinical manifestations of Huntington's disease in the longitudinal TRACK-HD study: cross-sectional analysis of baseline data." *Lancet Neurol* **8**(9): 791-801.
- Taherzadeh-Fard, E., C. Saft, et al. (2009). "PGC-1alpha as modifier of onset age in Huntington disease." *Mol Neurodegener* **4**: 10.
- Takahashi, K., K. Tanabe, et al. (2007). "Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors." *Cell* **131**(5): 861-872.
- Takahashi, K. and S. Yamanaka (2006). "Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors." *Cell* **126**(4): 663-676.
- Takano, H. and J. F. Gusella (2002). "The predominantly HEAT-like motif structure of huntingtin and its association and coincident nuclear entry with dorsal, an NF-kB/Rel/dorsal family transcription factor." *BMC Neurosci* **3**: 15.
- Tao, X., S. Finkbeiner, et al. (1998). "Ca<sup>2+</sup> influx regulates BDNF transcription by a CREB family transcription factor-dependent mechanism." *Neuron* **20**(4): 709-726.
- Tartari, M., C. Gissi, et al. (2008). "Phylogenetic comparison of huntingtin homologues reveals the appearance of a primitive polyQ in sea urchin." *Mol Biol Evol* **25**(2): 330-338.
- Telenius, H., B. Kremer, et al. (1994). "Somatic and gonadal mosaicism of the Huntington disease gene CAG repeat in brain and sperm." *Nat Genet* **6**(4): 409-414.
- Thieben, M. J., A. J. Duggins, et al. (2002). "The distribution of structural neuropathology in pre-clinical Huntington's disease." *Brain* **125**(Pt 8): 1815-1828.
- Thomas, K. and A. Davies (2005). "Neurotrophins: a ticket to ride for BDNF." *Curr Biol* **15**(7): R262-264.
- Thomson, J. A., J. Itskovitz-Eldor, et al. (1998). "Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts." *Science* **282**(5391): 1145-1147.
- Thomson, J. A., J. Kalishman, et al. (1995). "Isolation of a primate embryonic stem cell line." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(17): 7844-7848.
- Tobin, A. J. and E. R. Signer (2000). "Huntington's disease: the challenge for cell biologists." *Trends Cell Biol* **10**(12): 531-536.
- Tofighi, R., B. Joseph, et al. (2008). "Galanin decreases proliferation of PC12 cells and induces apoptosis via its subtype 2 receptor (GalR2)." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(7): 2717-2722.
- Trettel, F., D. Rigamonti, et al. (2000). "Dominant phenotypes produced by the HD mutation in STHdh(Q111) striatal cells." *Hum Mol Genet* **9**(19): 2799-2809.
- Tropel, P., J. Tournois, et al. (2010). "High-efficiency derivation of human embryonic stem cell lines following pre-implantation genetic diagnosis." *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **46**(3-4): 376-385.
- Tropepe, V., S. Hitoshi, et al. (2001). "Direct neural fate specification from embryonic stem cells: a primitive mammalian neural stem cell stage acquired through a default mechanism." *Neuron* **30**(1): 65-78.

- Trottier, Y., D. Devys, et al. (1995). "Cellular localization of the Huntington's disease protein and discrimination of the normal and mutated form." *Nat Genet* **10**(1): 104-110.
- Trushina, E., R. B. Dyer, et al. (2004). "Mutant huntingtin impairs axonal trafficking in mammalian neurons in vivo and in vitro." *Mol Cell Biol* **24**(18): 8195-8209.
- Turner, C., J. M. Cooper, et al. (2007). "Clinical correlates of mitochondrial function in Huntington's disease muscle." *Mov Disord* **22**(12): 1715-1721.
- Tydlacka, S., C. E. Wang, et al. (2008). "Differential activities of the ubiquitin-proteasome system in neurons versus glia may account for the preferential accumulation of misfolded proteins in neurons." *J Neurosci* **28**(49): 13285-13295.
- Tzingounis, A. V. and J. I. Wadiche (2007). "Glutamate transporters: confining runaway excitation by shaping synaptic transmission." *Nat Rev Neurosci* **8**(12): 935-947.
- Unternaehrer, J. J. and G. Q. Daley (2011). "Induced pluripotent stem cells for modelling human diseases." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **366**(1575): 2274-2285.
- Vacher, C., L. Garcia-Oroz, et al. (2005). "Overexpression of yeast hsp104 reduces polyglutamine aggregation and prolongs survival of a transgenic mouse model of Huntington's disease." *Hum Mol Genet* **14**(22): 3425-3433.
- Valenza, M., D. Rigamonti, et al. (2005). "Dysfunction of the cholesterol biosynthetic pathway in Huntington's disease." *J Neurosci* **25**(43): 9932-9939.
- van der Burg, J. M., M. Bjorkqvist, et al. (2009). "Beyond the brain: widespread pathology in Huntington's disease." *Lancet Neurol* **8**(8): 765-774.
- van Duijn, E., E. M. Kingma, et al. (2007). "Psychopathology in verified Huntington's disease gene carriers." *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* **19**(4): 441-448.
- Van Raamsdonk, J. M., W. T. Gibson, et al. (2006). "Body weight is modulated by levels of full-length huntingtin." *Hum Mol Genet* **15**(9): 1513-1523.
- Van Raamsdonk, J. M., Z. Murphy, et al. (2007). "Testicular degeneration in Huntington disease." *Neurobiol Dis* **26**(3): 512-520.
- Van Raamsdonk, J. M., J. Pearson, et al. (2005). "Loss of wild-type huntingtin influences motor dysfunction and survival in the YAC128 mouse model of Huntington disease." *Hum Mol Genet* **14**(10): 1379-1392.
- van Roon-Mom, W. M., S. J. Reid, et al. (2002). "Insoluble TATA-binding protein accumulation in Huntington's disease cortex." *Brain Res Mol Brain Res* **109**(1-2): 1-10.
- Vazey, E. M., K. Chen, et al. (2006). "Transplanted adult neural progenitor cells survive, differentiate and reduce motor function impairment in a rodent model of Huntington's disease." *Exp Neurol* **199**(2): 384-396.
- Velier, J., M. Kim, et al. (1998). "Wild-type and mutant huntingtins function in vesicle trafficking in the secretory and endocytic pathways." *Exp Neurol* **152**(1): 34-40.
- Verhoef, L. G., K. Lindsten, et al. (2002). "Aggregate formation inhibits proteasomal degradation of polyglutamine proteins." *Hum Mol Genet* **11**(22): 2689-2700.
- Verlinsky, Y., N. Strelchenko, et al. (2005). "Human embryonic stem cell lines with genetic disorders." *Reprod Biomed Online* **10**(1): 105-110.
- Vetter, J. M., T. Jehle, et al. (2003). "Mice transgenic for exon 1 of Huntington's disease: properties of cholinergic and dopaminergic pre-synaptic function in the striatum." *J Neurochem* **85**(4): 1054-1063.
- von Horsten, S., I. Schmitt, et al. (2003). "Transgenic rat model of Huntington's disease." *Hum Mol Genet* **12**(6): 617-624.
- Vonsattel, J. P. and M. DiFiglia (1998). "Huntington disease." *J Neuropathol Exp Neurol* **57**(5): 369-384.
- Vonsattel, J. P., C. Keller, et al. (2008). "Neuropathology of Huntington's disease." *Handb Clin Neurol* **89**: 599-618.
- Vonsattel, J. P., R. H. Myers, et al. (1985). "Neuropathological classification of Huntington's disease." *J Neuropathol Exp Neurol* **44**(6): 559-577.
- Walker, F. O. (2007). "Huntington's disease." *Lancet* **369**(9557): 218-228.
- Wang, Y. L., W. Liu, et al. (2005). "Clinico-pathological rescue of a model mouse of Huntington's disease by siRNA." *Neurosci Res* **53**(3): 241-249.
- Warby, S. C., E. Y. Chan, et al. (2005). "Huntingtin phosphorylation on serine 421 is significantly reduced in the striatum and by polyglutamine expansion in vivo." *Hum Mol Genet* **14**(11): 1569-1577.
- Warren, L., P. D. Manos, et al. (2010). "Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA." *Cell Stem Cell* **7**(5): 618-630.
- Wellington, C. L., L. M. Ellerby, et al. (2002). "Caspase cleavage of mutant huntingtin precedes neurodegeneration in Huntington's disease." *J Neurosci* **22**(18): 7862-7872.

- Wellington, C. L., L. M. Ellerby, et al. (1998). "Caspase cleavage of gene products associated with triplet expansion disorders generates truncated fragments containing the polyglutamine tract." *J Biol Chem* **273**(15): 9158-9167.
- Wellington, C. L., R. Singaraja, et al. (2000). "Inhibiting caspase cleavage of huntingtin reduces toxicity and aggregate formation in neuronal and nonneuronal cells." *J Biol Chem* **275**(26): 19831-19838.
- Wernig, M., A. Meissner, et al. (2007). "In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state." *Nature* **448**(7151): 318-324.
- Wexler, N. S., J. Lorimer, et al. (2004). "Venezuelan kindreds reveal that genetic and environmental factors modulate Huntington's disease age of onset." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(10): 3498-3503.
- Weydt, P., V. V. Pineda, et al. (2006). "Thermoregulatory and metabolic defects in Huntington's disease transgenic mice implicate PGC-1alpha in Huntington's disease neurodegeneration." *Cell Metab* **4**(5): 349-362.
- Wheeler, V. C., W. Auerbach, et al. (1999). "Length-dependent gametic CAG repeat instability in the Huntington's disease knock-in mouse." *Hum Mol Genet* **8**(1): 115-122.
- Wheeler, V. C., L. A. Lebel, et al. (2003). "Mismatch repair gene Msh2 modifies the timing of early disease in Hdh(Q111) striatum." *Hum Mol Genet* **12**(3): 273-281.
- Wheeler, V. C., F. Persichetti, et al. (2007). "Factors associated with HD CAG repeat instability in Huntington disease." *J Med Genet* **44**(11): 695-701.
- White, J. K., W. Auerbach, et al. (1997). "Huntingtin is required for neurogenesis and is not impaired by the Huntington's disease CAG expansion." *Nat Genet* **17**(4): 404-410.
- Wilson, B. E., E. Mochon, et al. (1996). "Induction of bcl-2 expression by phosphorylated CREB proteins during B-cell activation and rescue from apoptosis." *Mol Cell Biol* **16**(10): 5546-5556.
- Wong, J. M. and K. Collins (2003). "Telomere maintenance and disease." *Lancet* **362**(9388): 983-988.
- Wytenbach, A., J. Swartz, et al. (2001). "Polyglutamine expansions cause decreased CRE-mediated transcription and early gene expression changes prior to cell death in an inducible cell model of Huntington's disease." *Hum Mol Genet* **10**(17): 1829-1845.
- Xia, H., Q. Mao, et al. (2004). "RNAi suppresses polyglutamine-induced neurodegeneration in a model of spinocerebellar ataxia." *Nat Med* **10**(8): 816-820.
- Xia, J., D. H. Lee, et al. (2003). "Huntingtin contains a highly conserved nuclear export signal." *Hum Mol Genet* **12**(12): 1393-1403.
- Xue, Y., Q. Wang, et al. (2009). "Human Y chromosome base-substitution mutation rate measured by direct sequencing in a deep-rooting pedigree." *Curr Biol* **19**(17): 1453-1457.
- Yamanaka, T., H. Miyazaki, et al. (2008). "Mutant Huntingtin reduces HSP70 expression through the sequestration of NF-Y transcription factor." *EMBO J* **27**(6): 827-839.
- Yanai, A., K. Huang, et al. (2006). "Palmitoylation of huntingtin by HIP14 is essential for its trafficking and function." *Nat Neurosci* **9**(6): 824-831.
- Yang, W., J. R. Dunlap, et al. (2002). "Aggregated polyglutamine peptides delivered to nuclei are toxic to mammalian cells." *Hum Mol Genet* **11**(23): 2905-2917.
- Ying, Q. L. and A. G. Smith (2003). "Defined conditions for neural commitment and differentiation." *Methods Enzymol* **365**: 327-341.
- Young, A. B., I. Shoulson, et al. (1986). "Huntington's disease in Venezuela: neurologic features and functional decline." *Neurology* **36**(2): 244-249.
- Yu, J., M. A. Vodyanik, et al. (2007). "Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells." *Science* **318**(5858): 1917-1920.
- Yu, J., L. Yu, et al. (2002). "Protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase interacts with protein kinase A inhibitors." *Brain Res Mol Brain Res* **99**(2): 145-149.
- Zala, D., E. Colin, et al. (2008). "Phosphorylation of mutant huntingtin at S421 restores anterograde and retrograde transport in neurons." *Hum Mol Genet* **17**(24): 3837-3846.
- Zanella, A., C. Izzo, et al. (1980). "Metabolic impairment and membrane abnormality in red cells from Huntington's disease." *J Neurol Sci* **47**(1): 93-103.
- Zeitlin, S., J. P. Liu, et al. (1995). "Increased apoptosis and early embryonic lethality in mice nullizygous for the Huntington's disease gene homologue." *Nat Genet* **11**(2): 155-163.
- Zeron, M. M., O. Hansson, et al. (2002). "Increased sensitivity to N-methyl-D-aspartate receptor-mediated excitotoxicity in a mouse model of Huntington's disease." *Neuron* **33**(6): 849-860.
- Zhai, G., A. Teumer, et al. (2011). "Eight common genetic variants associated with serum DHEAS levels suggest a key role in ageing mechanisms." *PLoS Genet* **7**(4): e1002025.
- Zhai, W., H. Jeong, et al. (2005). "In vitro analysis of huntingtin-mediated transcriptional repression reveals multiple transcription factor targets." *Cell* **123**(7): 1241-1253.
- Zhang, J., Q. Lian, et al. (2011). "A human iPSC model of Hutchinson Gilford Progeria reveals vascular smooth muscle and mesenchymal stem cell defects." *Cell Stem Cell* **8**(1): 31-45.

- Zhang, S., M. B. Feany, et al. (2009). "Inactivation of Drosophila Huntingtin affects long-term adult functioning and the pathogenesis of a Huntington's disease model." *Dis Model Mech* **2**(5-6): 247-266.
- Zhang, S. C., M. Wernig, et al. (2001). "In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells." *Nat Biotechnol* **19**(12): 1129-1133.
- Zhang, Y., B. R. Leavitt, et al. (2006). "Huntingtin inhibits caspase-3 activation." *EMBO J* **25**(24): 5896-5906.
- Zhang, Y., M. Li, et al. (2003). "Depletion of wild-type huntingtin in mouse models of neurologic diseases." *J Neurochem* **87**(1): 101-106.
- Zheng, L., L. Yu, et al. (2000). "Cloning and mapping of human PKIB and PKIG, and comparison of tissue expression patterns of three members of the protein kinase inhibitor family, including PKIA." *Biochem J* **349**(Pt 2): 403-407.
- Zheng, Y., J. Wildonger, et al. (2008). "Dynein is required for polarized dendritic transport and uniform microtubule orientation in axons." *Nat Cell Biol* **10**(10): 1172-1180.
- Zuccato, C. and E. Cattaneo (2009). "Brain-derived neurotrophic factor in neurodegenerative diseases." *Nat Rev Neurol* **5**(6): 311-322.
- Zuccato, C., A. Ciammola, et al. (2001). "Loss of huntingtin-mediated BDNF gene transcription in Huntington's disease." *Science* **293**(5529): 493-498.
- Zuccato, C., M. Tartari, et al. (2003). "Huntingtin interacts with REST/NRSF to modulate the transcription of NRSE-controlled neuronal genes." *Nat Genet* **35**(1): 76-83.
- Zuccato, C., M. Valenza, et al. (2010). "Molecular mechanisms and potential therapeutic targets in Huntington's disease." *Physiol Rev* **90**(3): 905-981.

# ANNEXES





➤ **Article 2 :**

***Human embryonic stem cells reveal recurrent genomic instability at 20q11.21***  
***(Nature Biotechnology, 2008 Dec;26(12):1364-6. Epub 2008 Nov 23)***

Nathalie Lefort, **Maxime Feyeux**, Cécile Bas, Olivier Féraud, Annelise Bennaceur-Griscelli, Gérard Tachdjian, Marc Peschanski & Anselme L Perrier

Bien que la transformation maligne ne soit pas nécessaire au maintien à long terme de cultures de hESC, la survenue d'altérations génétiques en culture n'est pas improbable, notamment sur de longues durées. En analysant cinq lignées de hESC au cours de leur culture, nous avons identifié une instabilité génomique récurrente dans le génome humain. Une amplification de 2.5 à 4.6 Mb au niveau du 20q11.21, englobant 23 gènes, a été détectée dans quatre lignées cellulaires de différentes origines. Cette amplification est détectable dans le cadre de tumeurs variées chez l'Homme. Elle semble d'ailleurs fournir un avantage sélectif aux cellules hESC en culture de par sa généralisation quasi-systématique aux passages élevés. Indépendamment, des anomalies chromosomiques de grande envergure dans les lignées hESC avaient déjà été rapportées avant la publication de nos travaux, en particulier le gain des chromosomes 12, 17q ou X. Ces gains chromosomiques sont détectables par un simple caryotype au giemsa, contrôle préconisé à la suite de ces résultats pour s'assurer de l'intégrité du génome des lignées hESC (recommandations de l'International Stem Cell Initiative). Des modifications non détectables par un caryotype de type giemsa peuvent être détectées en utilisant des techniques de dépistage avec une meilleure résolution (Kallioniemi, Kallioniemi et al. 1993). Nous avons donc utilisé l'hybridation génomique comparative sur chromosomes artificiels bactériens (IntegraChip Bacterial Artificial Chromosome -BAC- array-based Comparative Genomic Hybridization ou BACaCGH), ou bien des puces à polymorphisme nucléotidique simple (Illumina high-density oligonucleotide array-based Single Nucleotide Polymorphism -puce SNP-) pour identifier d'éventuelles anomalies qui ont ensuite été validées par la technique d'hybridation fluorescente *in situ* (FISH) à l'aide de sondes spécifiques. Nos données montrent que dans trois des cinq lignées (SA01, H9 et VUB05-MH), la duplication du 20q11.21 est apparue pendant la culture à long terme dans notre laboratoire. Cette anomalie n'a pas eu d'effet sur l'expression des marqueurs de pluripotence ni sur la vitesse de croissance cellulaire. La technique de FISH a permis une évaluation précise de la proportion de cellules affectées, ce qui n'est pas possible avec les techniques de caryotypage SNP et BACaCGH. Une équipe concurrente a publié en même temps la démonstration du même type d'anomalie dans cinq autres lignées de hESC, sur 14 étudiées (Spits, Mateizel et al. 2008). Globalement, dans deux laboratoires différents neuf lignées de hESC sur 17 analysées présentaient une région amplifiée localisée sur le chromosome 20q11.21. La région amplifiée comprend environ 23 gènes et un microARN nommé miR-HSA-1825. Cette région correspond à une région synténique considérée comme « hypermutable » chez la souris, et fréquemment impliquée dans les premières étapes de la leucémie myéloïde radio-induite. Par ailleurs, La région 20q11.21 est parfois amplifiée dans les cancers du sein, du poumon, les mélanomes, les carcinomes hépatocellulaires, les cancers de la vessie et à un stade précoce du cancer du col de l'utérus. Ceci suggère que l'amplification de cette région fournit un avantage prolifératif. Parmi les 23 gènes

contenus dans la plus petite région amplifiée plusieurs ont été impliqués dans la survie cellulaire (BCL2L1, PDRG1), la croissance cellulaire (ID1) ou le cycle cellulaire (TPX2, KIF3B).

# Human embryonic stem cells reveal recurrent genomic instability at 20q11.21

Nathalie Lefort<sup>1</sup>, Maxime Feyeux<sup>1</sup>, Cécile Bas<sup>2</sup>, Olivier Féraud<sup>3</sup>, Annelise Bennaceur-Griscelli<sup>3</sup>, Gerard Tachdjian<sup>2</sup>, Marc Peschanski<sup>1</sup> & Anselme L Perrier<sup>1</sup>

**By analyzing five human embryonic stem (hES) cell lines over long-term culture, we identified a recurrent genomic instability in the human genome. An amplification of 2.5–4.6 Mb at 20q11.21, encompassing ~23 genes in common, was detected in four cell lines of different origins. This amplification, which has been associated with oncogenic transformation, may provide a selective advantage to hES cells in culture.**

Karyotypic abnormalities in hES cell lines, in particular gain of chromosomes 12, 17q or X, have been reported by many laboratories<sup>1–3</sup>. These defects were detected in conventional Giemsa-stained karyotypes, and the International Stem Cell Initiative has made Giemsa staining a required control for genomic integrity<sup>4</sup>. Smaller sequence changes have also been reported using screening techniques with higher resolution<sup>1</sup>. We have identified a genomic amplification of 20q11.21 in four independent hES cell lines (**Table 1**) using IntegriChip bacterial artificial chromosome (BAC) array-based comparative genomic hybridization (BAC aCGH), the Illumina high-density oligonucleotide array-based single nucleotide polymorphism (SNP) analysis and fluorescence *in situ* hybridization (FISH) (**Supplementary Methods** online). Our data show that in three of the four lines (SA01, H9 and VUB05-HD), the 20q11.21 duplication arose during long-term culture in our laboratory.

We cultured the hES cell lines SA01, H9, H1, VUB01 and VUB05-HD for a variable number of passages (**Supplementary Methods**). These lines had previously been shown to have a normal diploid karyotype (<http://stemcells.nih.gov/research/registry>). Manual dissection rather than an enzymatic method was systematically used to passage these lines.

BAC aCGH analyses revealed an amplification at 20q11.21 in SA01 at passage 83 (**Fig. 1a**), in H1 at passage 41 and in VUB05-HD at passage 103 (**Supplementary Fig. 1** online). This amplification was not found at earlier passages 30–41 in SA01 or passages 39–40 in VUB05-HD, indicating that it was acquired during long-term culture (**Table 1**). In the case of H1, none of our BAC aCGH or FISH

experiments showed an absence of this aberration, so it is unclear when it arose. BAC aCGH analysis did not detect a 20q11.21 amplification in H9 (passages 34–74) or VUB01 (passages 85–150). We further investigated the genomic integrity of SA01 at passage 49 and of VUB05-HD at passage 94 using the Illumina high-density

**Table 1** 20q11.21 amplification detection

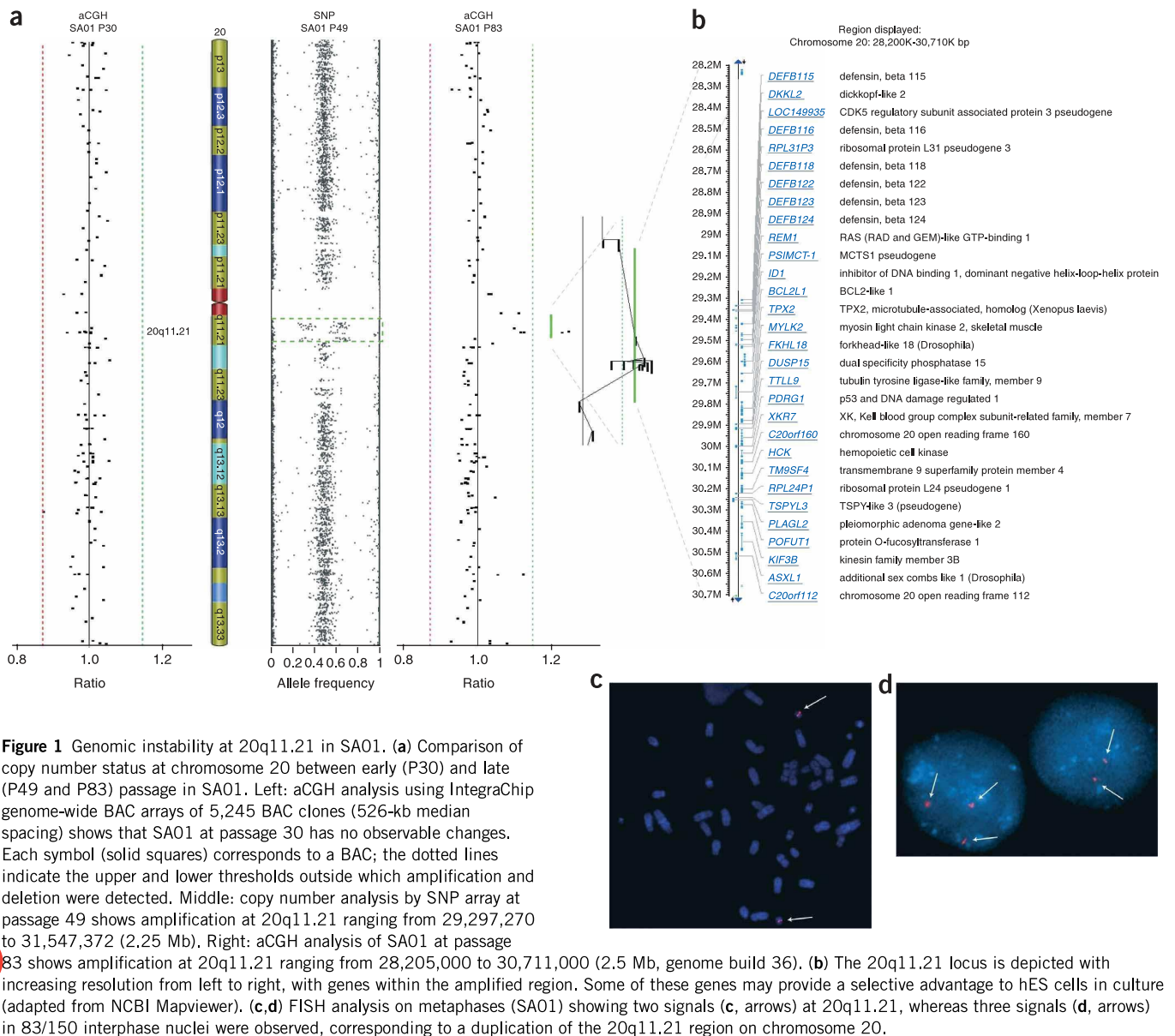
Lines	Source	Batch	Passage number	Technology	Gain of 20q11.21 <sup>a</sup>	Other karyotypic abnormalities
SA01	Cellartis	a	P30	aCGH	–	No
		a	P41	aCGH	–	No
	b	b	P21	FISH	–	nt
		b	P24	FISH	–	nt
		b	P32	aCGH	–	No
		b	P37	FISH	–	nt
		b	P49	SNP	Yes	No
		b	P56	FISH	Yes	nt
	c	P83	aCGH	Yes	No	
	VUB01	AZ-VUB	a	P80	FISH	–
a			P85	aCGH	–	No
a			P94	aCGH	–	No
a			P126	FISH	–	nt
b		P150	aCGH	–	Trisomy 12	
VUB05- AZ-VUB HD	a	a	P34	FISH	–	nt
		a	P39	aCGH	–	Trisomy 12
	b	b	P40	aCGH	–	Trisomy 12
		c	P94	SNP	–	No
		c	P98	FISH	–	nt
		c	P103	aCGH	Yes	No
c	P105	FISH	Yes	nt		
H9	WiCell	a	P34	aCGH	–	No
		a	P53	FISH	–	nt
		a	P55	FISH	–	nt
		a	P74	aCGH	–	No
		a	P76	FISH	Yes	nt
H1	WiCell	a	P24	FISH	Yes	nt
		a	P41	aCGH	Yes	No
		a	P53	aCGH	Yes	No
		a	P64	FISH	Yes <sup>b</sup>	nt

<sup>a</sup>“–” no gain of 20q11.21 detected by molecular karyotype (aCGH or SNP) or less than 1.5% of cells with three signals detected by FISH analyses. <sup>b</sup>Ins(1;20)(p36.3;q11.21). nt, not tested.

<sup>1</sup>INSERM/UEVE UMR-861, I-STEM, AFM, Institute for Stem cell Therapy and Exploration of Monogenic diseases, 5 rue Henri Desbrères, 91030 Evry cedex, France.

<sup>2</sup>Service de biologie et génétique de la reproduction, INSERM U782, Hôpital Antoine Bécère, Université Paris 11, Clamart, France. <sup>3</sup>INSERM U602/Université Paris-Sud 11, Hôpital Paul Brousse, Villejuif, France. Correspondence should be addressed to A.L.P. (aperrier@istem.genethon.fr).

Received 20 June; accepted 30 October; published online 23 November 2008; doi:10.1038/nbt.1509



oligonucleotide array-based SNP analysis and confirmed the presence of the 20q11.21 amplification in SA01 (**Fig. 1a,b**) but not in VUB05-HD. HES cell lines with the 20q11.21 amplification were not noticeably different from those without genomic alteration with respect to growth, morphology and the expression of canonical hES cell markers.

To estimate the proportion of cells affected during continued cell passage, we used FISH with BACs specific to the 20q11.21 region. In SA01, amplification of 20q11.21 was not seen at passages 21, 24 and 37 and was detected in 55% of the cells at passage 56 (**Fig. 1c,d**). In H9, the amplification was not found at passages 53 and 55 and was detected in 25% of the cells at passage 76 (whereas, using BAC aCGH, the amplification was not seen in this line up to passage 74). In H1, the amplification was detected in 24% and 47% of the cells at passages 24 and 64, respectively (**Supplementary Fig. 2** and **Supplementary Table 1** online). In VUB01, no amplification was seen at passages 80 and 126. Finally, in VUB05-HD, the amplification was not seen at passages 34 and 98 and was detected in 57% of the cells at passage 105. The extra copy of the 20q11.21 region was found inserted either at the

1p36.3 region (H1) or as a tandem or inverted repeat at 20q11.21 (SA01, H9, VUB05-HD).

Therefore, four of the five hES cell lines grown in our laboratory were found by at least one technique to have an amplified region localized to chromosome 20q11.21, ranging in size from 2.5 Mb to 4.6 Mb. It is unlikely that this amplification was due to a technical artifact related to culturing technique specific to our laboratory as one cell line (VUB01) cultured similarly did not show such an alteration. Neither is this genomic instability cell line-dependent as the same amplification has been observed by other authors in three other hES cell lines: VUB07 (*C. Spits et al.* 6<sup>th</sup> International Society for Stem Cell Research Meeting abstract), H7 (ref. 1) and HSF1 (ref. 5), although in the latter two cases it was considered a mutation<sup>1</sup> or a copy number variant<sup>5</sup> in the absence of data for the same cell lines at different passage numbers. Systematic analysis of several hES cell lines over long-term culture has thus allowed us to identify a region of genomic instability in the human genome. The amplified region encompasses about 23 genes (**Fig. 1b**) and a microRNA named hsa-miR-1825

located within *POFUT1*. This region corresponds to the mouse 2H region—syntenic to human 20q11-13—which has been considered 'hypermutable', as it is frequently involved in chromosomal rearrangements during the early stages of myeloid leukemia induction following ionizing radiation<sup>6</sup>. The high instability of microsatellite D2MIT140 marker, mapped to mouse chromosome 2H, is hypothesized to play a role in this phenomenon<sup>7</sup>. The 20q11.21 region is amplified in breast carcinomas<sup>8,9</sup>, lung cancer<sup>10</sup>, melanoma<sup>11</sup>, hepatocellular carcinoma<sup>12</sup>, bladder cancer<sup>13</sup> and early-stage cervical cancer<sup>14</sup>. All these data suggest that this region contains genes whose amplification provides a proliferative advantage, both for cancer progression and for hES cell growth. Of the ~23 genes contained in the smallest amplified region (Fig. 1b), several have been implicated in cell survival (*BCL2L1*, *PDRG1*), cell growth (*ID1*) or the cell cycle (*TPX2*, *KIF3B*). The miRNA hsa-miR-1825, located in the 7<sup>th</sup> exon of *POFUT1*, may be another good candidate as miRNAs are considered a novel class of genes contributing to tumorigenesis<sup>15</sup>. SNP and CGH data have been deposited in the GEO database under the accession number GSE13565.

Note: Supplementary information is available on the Nature Biotechnology website.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This study has been supported in part by additional grants from Medicein Paris Region (IngeCELL), EC (FP6, STEM-HD) and ANR (HESCREEN). The authors thank K. Sermon (AZ-VUB, Brussels) for kindly providing VUB cell lines.

#### AUTHOR CONTRIBUTIONS

N.L., M.P. and A.L.P. designed the study. N.L. carried out and analyzed CGH and SNP experiments. C.B. carried out the FISH experiments. N.L. and M.F. did all hES cell culture, except for that of HI cells, which were cultured by O.F. The FISH experiments were designed and analyzed by G.T., A.B.-G. and C.B. A.B.-G. and G.T. edited the paper. N.L., M.P. and A.L.P. contributed to writing the paper.

Published online at <http://www.nature.com/naturebiotechnology/>

Reprints and permissions information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>

1. Maitra, A. *et al. Nat. Genet.* **37**, 1099–1103 (2005).
2. Josephson, R. *et al. BMC Biol.* **4**, 28 (2006).
3. Baker, D.E. *et al. Nat. Biotechnol.* **25**, 207–215 (2007).
4. Loring, J.F. & Rao, M.S. *Stem Cells* **24**, 145–150 (2006).
5. Wu, H. *et al. Stem Cells* **26**, 1484–1489 (2008).
6. Rithidech, K., Bond, V.P., Cronkite, E.P., Thompson, M.H. & Bullis, J.E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 1152–1156 (1995).
7. Rithidech, K.N., Dunn, J.J., Gordon, C.R., Cronkite, E.P. & Bond, V.P. *Blood Cells Mol. Dis.* **23**, 99–109 (1997).
8. Tanner, M.M. *et al. Cancer Res.* **56**, 3441–3445 (1996).
9. Guan, X.Y. *et al. Cancer Res.* **56**, 3446–3450 (1996).
10. Tonon, G. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 9625–9630 (2005).
11. Koyanova, D.K. *et al. Melanoma Res.* **17**, 37–41 (2007).
12. Midorikawa, Y. *et al. Oncogene* **25**, 5581–5590 (2006).
13. Hurst, C.D. *et al. Oncogene* **23**, 2250–2263 (2004).
14. Scotto, L. *et al. Genes Chromosom. Cancer* **47**, 755–765 (2008).
15. Calin, G.A. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 2999–3004 (2004).



➤ **Article 3 :**

***Recurrent genomic instability of chromosome 1q in neural derivatives of human embryonic stem cells***

Christine Varela, Jérôme Denis, Jérôme Polentes, **Maxime Feyeux**, Sophie Aubert, Benoit Champon, Geneviève Piétu, Marc Peschanski, Nathalie Lefort

En parallèle des travaux qui ont fait l'objet de l'article 1 et dans le cadre de mon projet de recherche principal de ma thèse, j'ai développé un protocole permettant la dérivation de cellules souches neurales (NSC) à partir de cellules souches embryonnaires humaines (hESC). Ces NSC sont à la fois capables d'auto-renouvellement important et de différenciation en neurones post-mitotiques. Une des caractéristiques inquiétantes de ces cellules est leur capacité à se maintenir en prolifération en présence de FGF2 et EGF sans jamais sembler atteindre la sénescence. Cette particularité tranchait avec d'autres progénies des hESC manipulées au laboratoire. Nous avons pris conscience de l'importance de la vérification de l'intégrité génomique des ressources cellulaires à partir desquelles nous travaillions lors de l'étude dont les résultats ont été publiés dans l'article 2. Nous avons donc logiquement évalué l'intégrité génomique de nos cultures de NSC au cours du temps. La question de l'intégrité génomique des dérivés neuraux de hESC revêt au laboratoire une importance qui dépasse le cadre de la qualité des cultures utilisées pour la modélisation pathologique. Elle concerne en effet, de façon encore plus aigüe, les applications de thérapie cellulaire. Assurer l'intégrité du génome des cellules greffées est une condition préalable pour la sécurisation des applications thérapeutiques. Contrairement aux différenciations mésenchymateuse et kératinocytaire (atteignant la sénescence en une quinzaine de passages au maximum), la différenciation neurale des cellules pluripotentes humaines a produit de façon répétée, des populations de cellules souches neurales qui se propagent bien au-delà (> 30-50 passages) sans entrer en sénescence (soit environ 150 doublements). Certaines de ces lignées NSC non-sénescentes perdent leur capacité de différenciation neuronale (c'est-à-dire en cellules post-mitotiques exprimant la  $\beta$ -III tubuline), (VUB05-MH lot b, VUB01), mais pas de manière systématique (VUB03, VUB05-MH lot a). Nous avons démontré par BAC aCGH que cette immortalisation apparente était le plus souvent associée à une duplication/translocation du bras long du chromosome 1, qui était absente au stade pluripotent. Ce résultat a été confirmé par FISH. L'apparition la plus précoce de cette duplication/translocation du chromosome 1q a été détectée au passage dix des NSC dérivées de SA01 et au plus tard au passage 65 des NSC dérivées de VUB01. Cette anomalie chromosomique a été précédemment associée aux hémopathies malignes, cancers du sein, chordomes, carcinomes hépatocellulaires, rétinoblastomes et aux tumeurs cérébrales pédiatriques à pronostic clinique médiocre. Un lien de causalité entre l'instabilité génomique du chromosome 1q et l'immortalisation spontanée des dérivés de neuraux est fortement suggéré par l'association de cette anomalie avec des tumeurs malignes. Les sites chromosomiques accepteurs de la translocation sont variables : extrémités télomériques (1p, 4q, 5p, 8q, 10q, 13q, 17q), ou centromériques (13p, 15p, 21p, 22p). Globalement l'absence de spécificité du site « accepteur » (chromosomes 1, 4, 5, 8, 10, 13, 15, 17, 18, 21, 22, Y), suggère fortement que l'anomalie concerne principalement la région elle-même plutôt que le chromosome receveur. Il est intéressant de mentionner que le bras long du chromosome 1 est le plus grand bras chromosomique humain et

contient plus de 1700 gènes et 40 miARN (NCBI MapViewer). Nos résultats soulignent l'importance du suivi de l'intégrité du génome, non seulement des cellules souches pluripotentes indifférenciées, mais aussi de leurs dérivés.



# **Recurrent genomic instability of chromosome 1q in neural derivatives of human embryonic stem cells**

Christine Varela<sup>1</sup>, Jérôme Alexandre Denis<sup>2,3</sup>, Jérôme Polentes<sup>1</sup>, Maxime Feyeux<sup>2,3</sup>, Sophie Aubert<sup>1</sup>, Benoite Champon<sup>1</sup>, Geneviève Piétu<sup>2,3</sup>, Marc Peschanski<sup>2,3</sup>, Nathalie Lefort<sup>2,3\*</sup>

*1 CECS, AFM, Centre d'Etude des Cellules Souches, 5 rue Henri Desbruères, 91030 Evry cedex, France.*

*2 INSERM UMR-861, I-STEM, AFM, Institute for Stem cell Therapy and Exploration of Monogenic diseases, 5 rue Henri Desbruères, 91030 Evry cedex, France.*

*3 UEVE UMR-861, I-STEM, AFM, Institute for Stem cell Therapy and Exploration of Monogenic diseases, 5 rue Henri Desbruères, 91030 Evry cedex, France.*

\*Corresponding author: Dr Nathalie Lefort, INSERM/UEVE UMR-861, I-STEM, AFM, Institute for Stem cell Therapy and Exploration of Monogenic diseases, 5 rue Henri Desbruères, 91030 Evry cedex, France. Phone: +33169908517, Fax: +33169908521; [nlefort@istem.fr](mailto:nlefort@istem.fr)

The authors have declared no conflict of interest.

## **ABSTRACT**

Substitutive cell therapy using foetal grafts has demonstrated preliminary clinical success in patients with neurological diseases, but the logistics required for accessing foetal cells preclude its extension to the relevant population of patients. Human pluripotent stem cells offer a limitless cell source for regenerative medicine. Therefore neural derivatives of human embryonic stem cells are currently being used for cell therapy in three clinical trials. Ensuring genomic integrity of the grafted cells is a prerequisite for therapeutic applications. In contrast to other cell derivatives, neural differentiation of human embryonic stem cells systematically produced, in the 6 different cell lines tested, a neural stem cell population that could be propagated for more than 50 passages without entering senescence. This apparent spontaneous loss of evolution toward normal senescence of somatic cells was reproducibly associated with a jumping translocation of chromosome 1q. This chromosomal defect has previously been associated with hematologic malignancies and paediatric brain tumors with poor clinical outcome. A causative link between the genomic instability of chromosome 1q and the spontaneous loss of evolution toward senescence of the neural derivatives is strongly suggested by the association of this anomaly with malignancies. Our results call for additional quality controls to be implemented to ensure genomic integrity not only of undifferentiated pluripotent stem cells as currently enforced but also of derivatives that form cell therapy end products, in particular of the neural lineage.

## Introduction

Whether pluripotent stem cell derivatives can eventually be used widely for therapeutic purpose following the first ongoing clinical trials (1-4) will depend upon their capacity to pass strict quality controls. Among them a key issue is chromosomal and genomic integrity. Genomic instability has been demonstrated for pluripotent stem cells at the undifferentiated stage. Aneuploidies as well as more restricted abnormalities occur non-randomly in cultured human embryonic stem cells (hESCs). The most frequent alterations described are gains of whole or part of chromosomes 12 and 17, aneuploidy of chromosome X, or duplication of the 20q11.21 region (5-9). Human ESCs exhibit indefinite self-renewal and pluripotency, i.e. they have the ability to divide endlessly while maintaining their capacity to differentiate into all cell types of the organism. Embryonic stem cells are the only physiological cells of the human organism that can thus self-renew indefinitely in culture. They do not undergo senescence and can remain non-transformed over many passages. Nevertheless, genomic alteration may eventually appear and its probability tends to accrue over time in culture. Some of these changes likely provide a proliferative or survival advantage to their bearer cells, as indicated by the progressive domination of the original cell line by these altered cells. In contrast, it is expected that derivatives of hESCs should enter senescence after a finite number of doublings, as do any somatic cells (10). However, somatic cells maintained in culture occasionally acquire mutations that allow them to escape senescence (11). Loss of evolution toward senescence observed in hESCs derivatives may, therefore, reflect the presence of chromosomal changes.

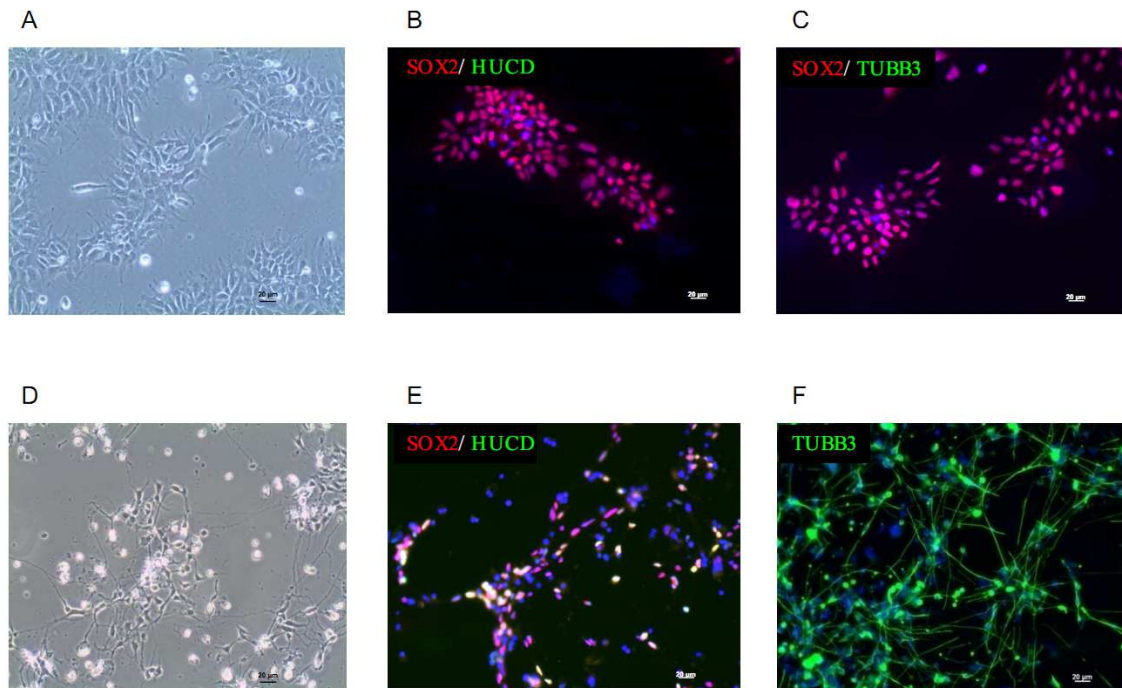
Within the framework of another research program using VUB03-DM1 hESC line, it occurred to us that neural derivatives had escaped senescence as they could be propagated over 34 passages (at least 100 doublings). This was specific to this cell population as intermediate precursors along other lineages, namely mesodermal and keratinocytic, systematically reached senescence before 15 passages, in keeping with known limits for somatic cells of about 50 doublings. We then examined neural derivatives of 5 other hESC lines and one human induced pluripotent stem (iPS) cell line that all showed similar spontaneous loss of a normal evolution toward senescence systematically associated with the alteration of chromosome 1 integrity.

## Results

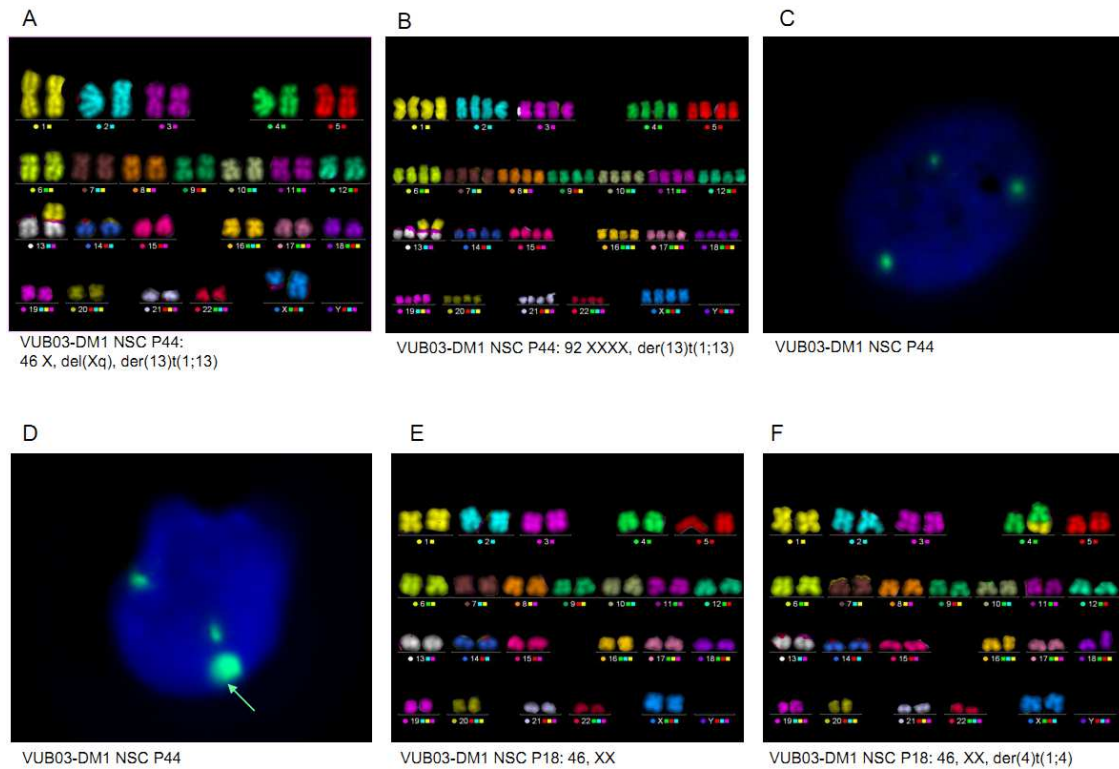
### Long term culture of neural stem cells derived from VUB03-DM1 hESC line reveals chromosome 1q duplication

Neural derivatives of VUB03-DM1 hESC line propagated over 34 passages (at least 100 doublings) did not reach senescence, while maintaining a normal phenotype (Figures 1A-1C) and the capacity to differentiate into post-mitotic neurons expressing  $\beta$ III-tubulin (Figures 1D-1F). Whereas no chromosomal abnormality was observed in hESCs at the undifferentiated stage (Figure 2A), neural stem cells (NSCs) derived from VUB03-DM1 propagated up to passage 34 exhibited an amplification of a segment of chromosome 1 in all but 1 mitosis analyzed. More specifically a portion of chromosome 1 was translocated onto the telomeric ends of chromosomes 5p (15.4%), 8q (3.8%) and 13q (23%), or else onto the centromeric region of chromosome 13p (53.8%) (Figures 2B and 2C, Table 1 and Supplemental Table1). At passage 44, this latter dominant clone was apparently selected since 100% of the cells exhibited the der(13)t(1;13) translocation, accompanied or not by additional chromosomal changes such as the loss of the long arm of chromosome X or polyploidy (Supplemental Figures 1A and 1B).

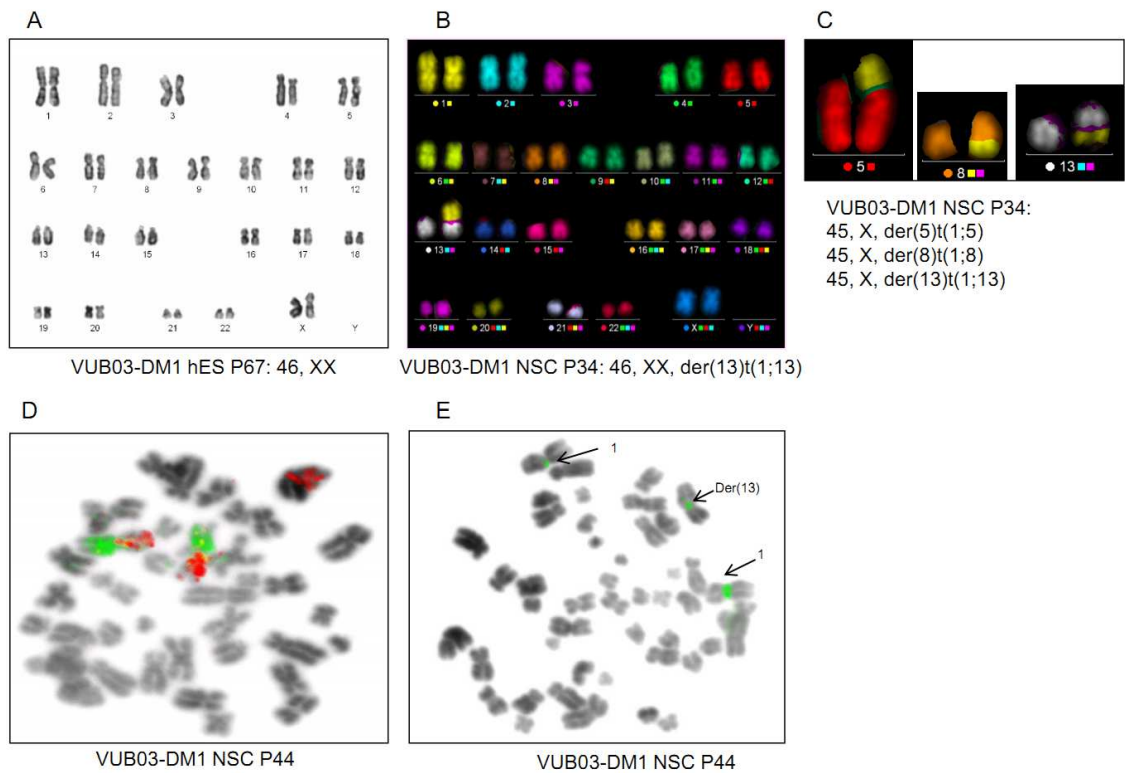
Further investigation using arm-specific chromosome painting showed that the duplicated arm was the long arm (1q, Figure 2D). Fluorescent in situ hybridization (FISH) with juxtacentromeric-specific probes which detected the 1q12 region revealed the presence of 3 juxtacentromeric regions of chromosome 1 in metaphases (Figure 2E) and in interphase nuclei (Supplemental Figures 1C and 1D). In some interphase nuclei, two types of hybridization signals were observed: condensed spots (Supplemental Figure 1C) and dispersed spots (Supplemental Figure 1D) corresponding to condensed and decondensed heterochromatin, respectively. Banked NSCs were thawed at earlier passages in order to estimate roughly the moment when the 1q duplication was first seen. Translocation of a segment of chromosome 1q onto the telomeric ends of chromosome 4q was observed in 7% of the mitoses at passage 18 (Supplemental Figures 1E and 1F).



**Figure 1: Characterization of the neural derivatives of VUB03-DM1 cell line.** (A) Morphological features of neural stem cells (NSC) at passage 48 derived from VUB03-DM1 cell line (NSC-VUB03-DM1 P48) (scale bar: 20 $\mu$ m). (B-C) NSC-VUB03-DM1 P48 expressing the neural marker SOX2. Note that cells do not express the neuronal markers HuCD and TUBB3 ( $\beta$ III-tubulin also known as TUJ1) (scale bar: 20 $\mu$ m). (D) Morphological features of neurons derived from NSC-VUB03-DM1 P48 (scale bar 20 $\mu$ m). (E-F) Neurons expressing the neuronal markers HuCD (E) and TUBB3 (F) generated after 20 days of differentiation from NSC-VUB03-DM1 at passage 48 (scale bar 20 $\mu$ m).



**Supplemental Figure 1: Karyotypic analysis of neural derivatives of VUB03-DM1 cell line.** (A) Multicolor FISH analysis of neural derivatives of VUB03-DM1 at passage 44 showing a segment of chromosome 1 translocated onto chromosome 13p (der(13)t(1;13)). (B) In some mitoses it was accompanied by additional chromosomal changes. (C and D) In situ hybridization of a juxtacentromeric-specific probe which detects the 1q12 region, showing two types of hybridization signal in the nuclei: condensed spots (C) and dispersed spots (green arrow, D). Nuclei are counterstained with DAPI (blue fluorescence). (E) mFISH analysis of neural derivatives of the VUB03-DM1 cell line. (F) At passage 18, a segment of chromosome 1 is translocated onto chromosome 4q in 7% of the mitoses (VUB03-DM1 NSC P18, 46, XX, der(4)t(1;4)).



**Figure 2: Control of genetic stability in VUB03-DM1 cell line.** (A) G-banding analysis of the undifferentiated cells. (B) Multicolor FISH analysis of neural derivatives of VUB03-DM1 at passage 34 showing a segment of chromosome 1 translocated onto chromosome 13p. (C) Partial karyotype showing a segment of chromosome 1 translocated onto chromosomes 5p, 8q and 13q. (D) Arm-specific chromosome painting reveals 2 copies of chromosome arms 1p (in green) and 3 copies of chromosome arm 1q (in red). (E) In situ hybridization of a juxtacentromeric-specific probe detecting the 1q12 region showing 3 signals on metaphases.

**Table 1: Summary of jumping translocations in neural derivatives of human pluripotent stem cell lines.**

Cell line		JT		Neuronal differentiation potential
		donor	acceptor	
VUB03-DM1	NSC P18	1q	4q	YES
	NSC P34	1q	13p, 13q, 5p, 8q	YES
	NSC P44	1q	13p	YES
SA001	NSC P15	1q	22p	nd
VUB05-HD*	NSC P38**	1q11.21q44	nd	nd
	NSC P53	1q	15p	NO
	NSC P32**	1q11.21q32.21	nd	nd
	NSC P59	1q	10q, Y	YES
VUB19-DM1	NSC P50	1q	1p, 5q, 18q	nd
H9	NSC P52	1q	17q, 21p, 22p	nd
VUB01	NSC P65	1q	22p	NO
IMR90	NSC P24	1q	17q	nd

\* At the undifferentiated stage, cells were carrying an amplification of the 20q11.21 region. The extra copy of the 20q11.21 region still remains present in the neural progenies. The analyses have been done on two batches of VUB05-HD NSC lines. The first batch (batch #a) corresponds to NSC P38 and NSC P53; the second batch (batch #b) corresponds to NSC P32 and NSC P59.

\*\* Karyotype performed using BAC-aCGH technology; consequently the recipient chromosome is unknown. nd: not determined. NSC: neural stem cells. P: passage. JT: jumping translocation.



**Supplemental Table 1: Summary of cytogenetic findings.**

cell lines	passage	batch	Karyotype [number of metaphases]
VUB03-DM1	hES P67		46, XX [20]
	NSC P18	#a	46,XX [25] 46, XX, der(4)t(1;4) [2] 46, XX, der(1)t(1;17) [1]
	NSC P34	#a	46, XX, der(13)t(1;13)[12] 45, X, der(13)t(1;13)[6] onto 13q 45, X, der(5)t(1;5) [4] 45, X, der(13)t(1;13) [2] 45, X, der(8)t(1;8) [1] 45, X [1]
	NSC P44	#a	46, X, del(Xq) der(13)t(1;13) [10] 46, XX, der(13)t(1;13) [6] 47, XX, +12, der(13)t(1;13) [1] 47, XX, +11, der(13)t(1;13) [1] 46, XX, der(13;1), der(6)t(3;6) [1] 46, X, del(Xq), der(13)t(13;1), der(8)t(8;11) [1] 60~68, XXXX, +1, +3, +4, +5, +6, +8, +10, +12, +14, +15, +16, +17, +18, +20, +21, +22, der(13)t(1;13) [cp2] 92, XXXX, der(13)t(1;13) [4] 92, XX, del(Xq)(x2), der(13)t(1;13) [5]
SA001	hES P20		46, XY [25]
	NSC P10	#a	46, XY [50]
	NSC P15	#a	46, XY [53] 46, XY, der(22)t(1;22) [2]
	NSC P31	#a	46, XY [34] 92, XXYY [9]
	hES P41*		46, XY, .arr (1-22)x2,(XY)x1
	NSC P34*	#b	46, XY, .arr (1-22)x2,(XY)x1
	NS P51	#b	46, XY [27] 46, XY, der(1)t(1;17) [3] 46, XY, der(Y)t(Y;1),t(9;13) [cp2]

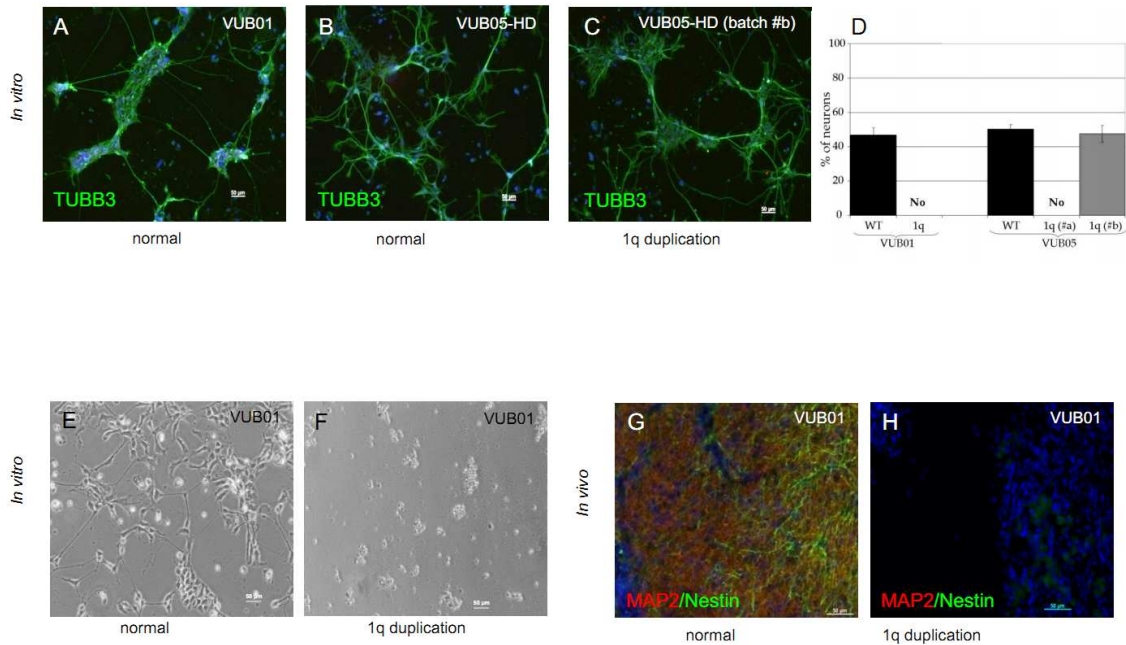
\* karyotype performed using BAC-aCGH. NSC: neural stem cells

cell lines	passage	batch	Karyotype [number of metaphases]
VUB05-HD	hES P103*		46, XY, dup(20)(q11.21).arr 20q11.21
	NSC P38*	#a	46,XY, dup(1)(q11.21q44).arr 1q11.21q44, dup(20)(q11.21).arr 20q11.21
	NSC P53	#a	46, XY, der(15)t(1;15) [20]
	hES P103*		46, XY, dup(20)(q11.21).arr 20q11.21
	NSC P32*	#b	46,XY, dup(1)(q11.21q32.21).arr 1q11.21q32.21, dup(20)(q11.21).arr 20q11.21
	NSC P59	#b	46, XY, der(10)t(1;10) [28] 46, XY, +5, + der(5), +7, der(10)t(1;10) [cp3] 46, XY, der(Y)t(Y;1),t(9;13) [cp2]
VUB19-DM1	hES P73		46, XX [25]
	NSC P22	#a	46, XX [22] 47, XXX, ins(1; 11) [cp2]
	NSC P50	#a	46, XX, der(1)t(1;1) [13] 46, XX, der(5)t(1;5) [1] 46, XX, der(18)t(1;18), dup(12) [1] 51~56, XX, +2, +3, -4, +5, +6, +8, +11, +12, +14, +15, +17, +19, +20, der(1)t(1;1) [cp3] 78, XX, der(1)t(1;1) [1] 80, XXX, +der(13)t(1;13) [1] 70~78, XXXX [4]
H9	hES P64		46, XX [28]
	NSC P52	#a	46, XX, der(17)t(1;17) [14] 46, XX, der(22)t(1;22) [2] 46, XX, der(21)t(1;21) [1]
VUB01	hES P94*	#a	46, XY, .arr (1-22)x2,(XY)x1
	NSC P21		46, XY [20]
	NSC P65		46, XY, der(22)t(1;22) [20]
IMR90	iPS P23	#a	46, XX [21]
	NSC P24		46, XX [13] 46, XX, der(17)t(1;17) [6]

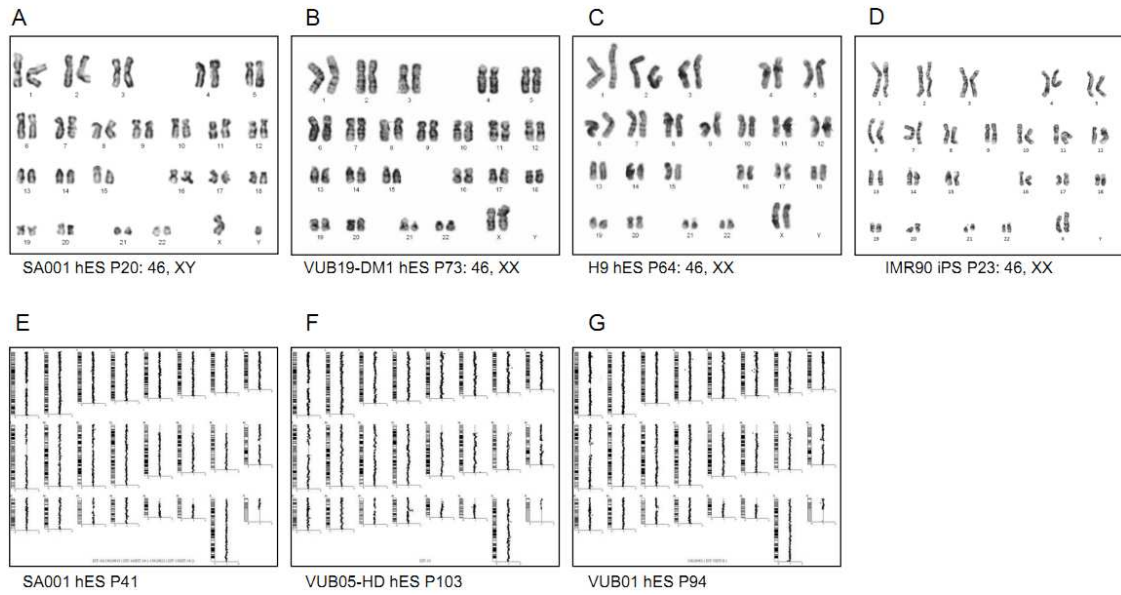
\* karyotype performed using BAC-aCGH. NSC: neural stem cells

### **Recurrence of 1q duplication in long term cultures of hESC-derived neural stem cell lines.**

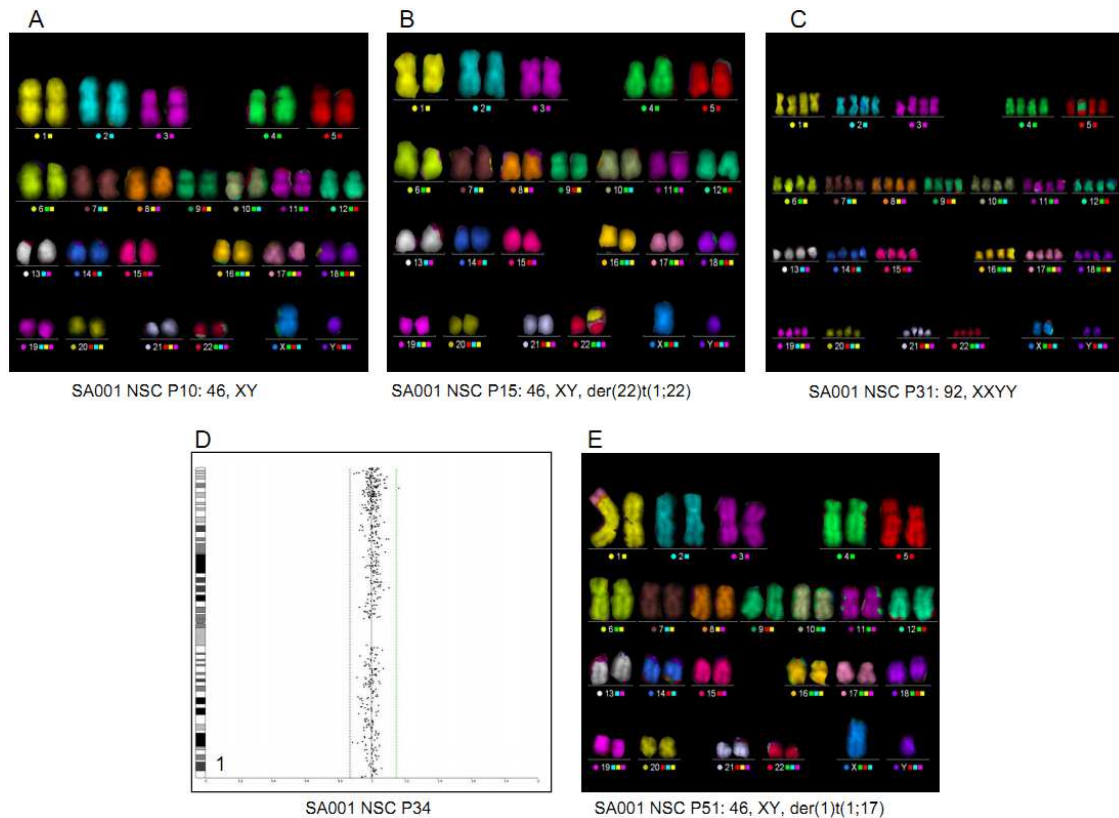
VUB03-DM1 originated from an embryo that carried a *DMPK* (Dystrophia Myotonica Protein Kinase) mutation associated with myotonic dystrophy type 1 (DM1). Lack of a relationship between this specific disorder and the observed translocation was obtained by analyzing other hESC lines that either did not carry a known disease-related mutation (SA001, VUB01 and H9 cell lines), carried another *DMPK* mutation (VUB19-DM1 cell line) or else carried a *HTT* (Huntingtin) mutation associated with Huntington's disease (HD) (VUB05-HD cell line). One human iPS cell line reprogrammed from IMR90 fibroblasts using a classical lentiviral technique (12) was also investigated. At the undifferentiated stage, all of these pluripotent stem cell lines exhibited a normal diploid karyotype, as analyzed using BAC-aCGH or G-banding technologies. In contrast, in neural derivatives, BAC aCGH and mFISH analyses systematically revealed an amplification of a segment of chromosome 1 in neural derivatives of SA001 at passage 15, of VUB05-HD at passages 38, 53 (batch #a) and 32 and 59 (batch #b), of VUB19-DM1 at passage 50, of H9 at passage 52, of VUB01 at passage 65 and of the iPS cell line at passage 23 (Supplemental Figures 3-5, Table 1 and Supplemental Table 1). These chromosomal changes were not found at earlier passages in neural derivatives of SA001 (passage 10) (Supplemental Figure 3A), of VUB19-DM1 (passage 22) and of VUB01 (passage 21). In neural derivatives of SA001, other abnormalities were observed in the absence of 1q duplication at later passages (31 and 51), namely polyploidy and translocation (Supplemental Figures 3C and 3E). Arm-specific chromosome painting showed that the duplicated part of chromosome 1 was always the long arm (Supplemental Figures 6A-C). FISH with the juxtacentromeric 1q12 probe revealed that the juxtacentromeric region of chromosome 1 was maintained when the fusion occurred with the p arm of acrocentric chromosomes (such as 13p, 15p, 21p and 22p), whereas it was either lost (fusion with chromosomes 1p and 17q) or maintained (fusion with chromosomes 10q and 22q) in other cases (Supplemental Figures 6D-K). The assessment of the organisation of the juxtacentromeric heterochromatin of chromosome 1 using the 1q12 probe demonstrated heterochromatin decondensation in two out of six NSC cell lines, namely VUB01 and VUB19-DM1. The capacity of the NSC lines carrying a duplication of 1q arm at terminal neuronal differentiation was altered in two cases (VUB01 and VUB05-HD batch #a) but not in others that were tested, including another batch (#b) of one of the two affected lines (VUB05-HD) (Figures 3A-F). Searching for long-term consequences of the 1q duplication, VUB01-NSCs carrying or not the defect were also implanted into the brain of 10 adult female Nude rats. Seven weeks following transplantation, non-affected grafted cells were recovered in all cases. In contrast, NSCs carrying the 1q duplication systematically failed to integrate and expand in the host brain (Figures 3G and 3H).



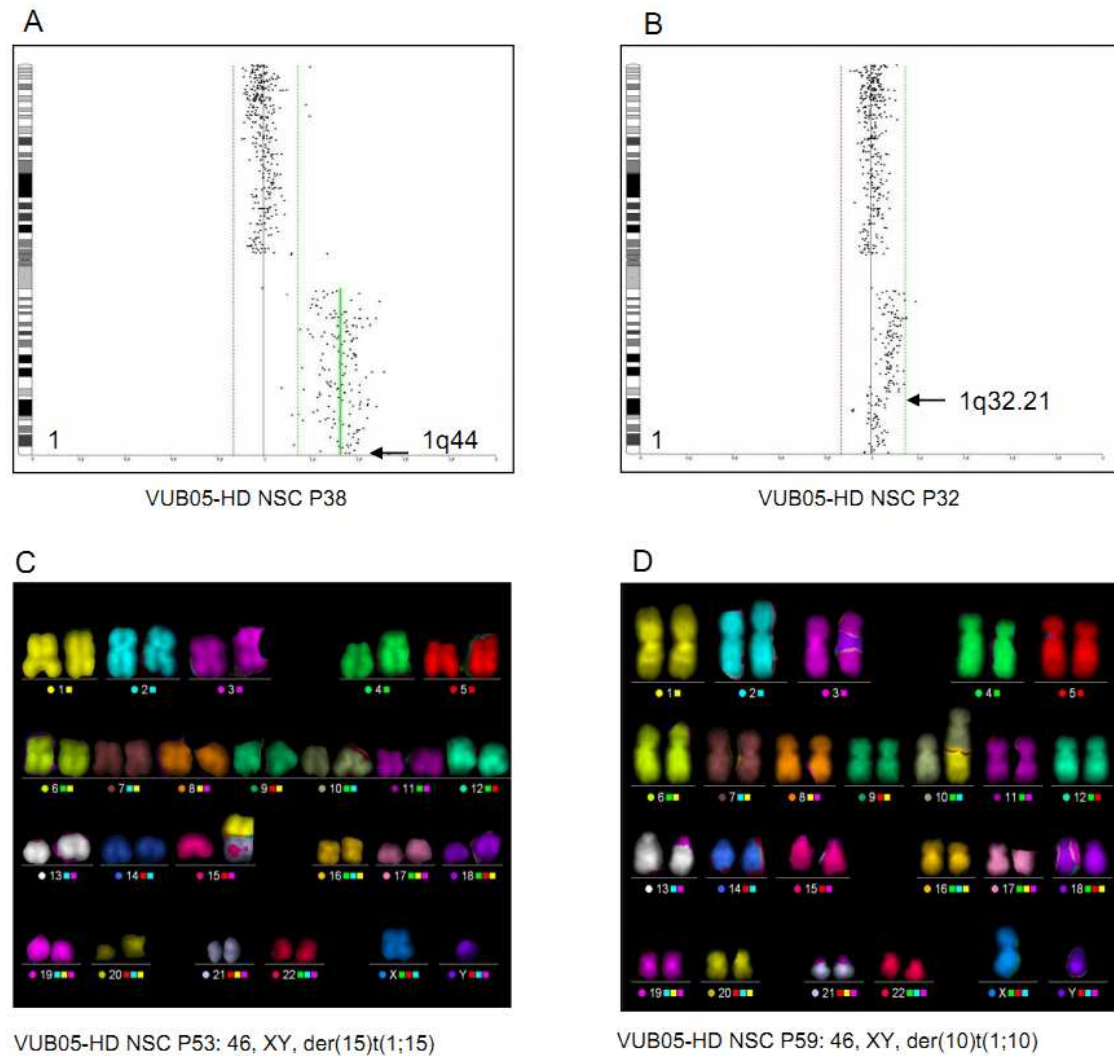
**Figure 3: In vitro neuronal differentiation potential (A-F).** Three weeks after growth factor withdrawal (A) normal VUB01, (B) normal VUB05-HD and (C) mutant VUB05-HD (batch #b) NSC lines, passages 18, 15 and 61 respectively, differentiated in vitro into TUBB3<sup>+</sup> neurons (scale bar: 50µm). The number of neurons generated with normal VUB01, VUB05 and mutant VUB05-HD (batch #b) NSC lines was determined using the neuronal nuclear marker HuCD. Samples of normal and mutant cell lines were differentiated in at least 3 independent experiments. The proportion of HuCD-positive cells was determined out of at least 1000 cells per sample in randomly picked fields. Proportions are indicated ± SEM. There was no difference between normal and mutant VUB05-HD (batch #b) NSC lines. (D). Two weeks after growth factor withdrawal normal VUB01 NSC passage 18 (E) differentiated in vitro into neurons whereas mutant VUB01 NSC passage 71 (F) failed to give rise to neurons and died. **In vivo differentiation potential (G-H).** Rat brain transplants of normal (G) and mutant (H) VUB01 NSC lines passages 21 and 74 respectively. Seven weeks after grafting of VUB01 NSC, human nestin (NES)- and MAP2-positive cells were observed when normal cells had been grafted (G) but not when grafts were performed with NSC carrying the 1q duplication (H) (scale bar: 50µm).



**Supplemental Figure 2: Genomic integrity control of pluripotent stem cells at the undifferentiated stage.** (A-D) G-banding analysis of SA001 P20 (A), VUB19-DM1 P73 (B), H9 P64 (C), IMR90 iPS P23 (D). (E-G) BAC aCGH analysis of SA001 P41 (E), VUB05-HD P103 (F) and VUB01 P94 (G). Note the absence of chromosomal abnormalities in cell cultures except for VUB05-HD showing duplication at 20q11.21.



**Supplemental Figure 3: Karyotypic analysis of neural derivatives of SA001 cell line.** mFISH analysis of neural derivatives of SA001 cell line (batch #a) at passage 10 (A), 15 (B) and 31 (C). At passage 10, there are no chromosomal abnormalities (A) whereas at passage 15 a translocation of a part of chromosome 1 onto chromosome 22p (SA001 NSC P15 der(22)t(1;22)) was observed in 3.6% of the mitoses (B). At passage 31 there were no more translocations of a segment of chromosome 1 onto chromosome 22 but around 20 % of the mitoses were tetraployploid (C). (D, E) BAC aCGH and mFISH analysis of neural derivatives of SA001 cell line (batch #b). At passage 34 no chromosomal abnormalities are detected using BAC aCGH technology. Chromosome 1 is depicted (D). At passage 51, 10% of the mitoses exhibited a translocation of a part of chromosome 17 onto chromosome 1p (der(1)t(1;17)) (E).

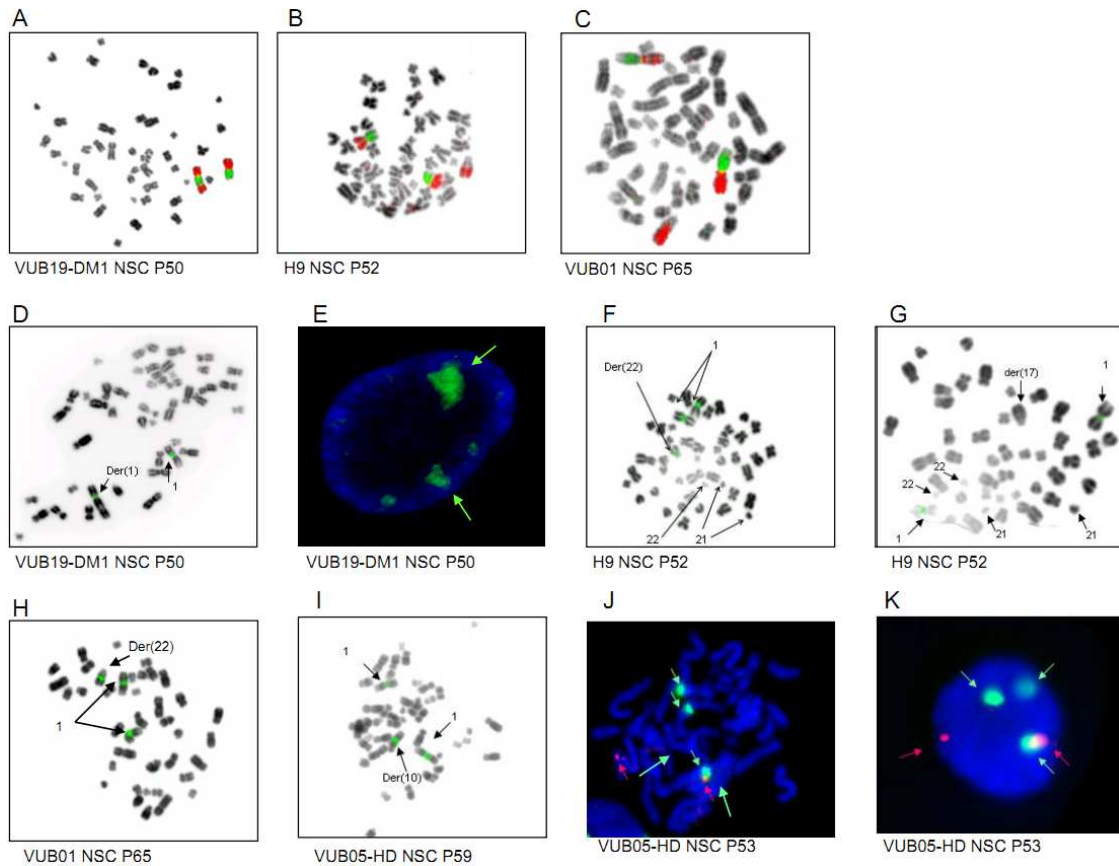


**Supplemental Figure 4: Karyotypic analysis of neural derivatives of VUB05-HD cell line.** At passage 38 (batch #a) and 32 (batch #b), BAC aCGH revealed a duplication of the whole arm of chromosome 1q (46,XY,dup(1)(q11.21q44).arr 1q11.21q44 ) (A: chromosome 1 is depicted) and a duplication of a part of chromosome 1q (46,XY,dup(1)(q11.21q32.21).arr 1q11.21q32.21 ), (B: chromosome 1 is depicted). At passage 53 (batch #a) and 59 (batch #b), mFISH analysis showed that the duplicated region translocated onto chromosome 15p (VUB05-HD NSC P53, 46, XY, der(15)t(1;15)) (C) and chromosome 10q (VUB05-HD NSC P59, 46, XY, der(10)t(1;10)) (D)



**Supplemental Figure 5: mFISH analysis of neural derivatives of pluripotent stem cell lines. VUB19-DM1 cell line (A-B).** (A) At passage 50, a segment of chromosome 1 translocated onto the short arm of chromosome 1 (VUB19-DM1 NSC P50, 46, XX, der(1)t(1;1)). (B) Additional abnormalities were observed in mitoses carrying the chromosome 1 arm duplication. H9 cell line (C-E). (C) NSC at passage 52 showing a translocation of a part of chromosome 1 onto chromosome 17q ( H9 NSC P52, 46, XX, der(17)t(1;17)), (D) chromosome 21p (H9 NSC P52, 46, XX, der(21)t(1;21)) and (E) chromosome 22p (H9 NSC P52, 46, XX, der(22)t(1;22)). VUB01 cell line (F). At passage 65, a segment of chromosome 1 translocated onto the long arm of chromosome 22 (VUB01 NSC P65, 46, XY, der(22)t(1;22)). IMR90 cell line (G). At passage 24, a segment of chromosome 1 translocated onto chromosome 17q ( IMR90-NSC P24, 46, XX, der(17)t(1;17))





**Supplemental Figure 6: NSC analysis with specific probes. Arm-specific chromosome painting (A-C).** Chromosome 1 painting using long arm (q, in red) or short arm (p, in green) specific probes. (A) NSC VUB19-DM1 at passage 50 showing two copies of the short arm (p, in green) and three copies of the long arm (q, in red). The third copy of chromosome 1q is translocated onto chromosome 1p. (B) NSC H9 at passage P52 showing two copies of the short arm (in green) and three copies of the long arm (in red). The third copy of chromosome 1q is translocated onto chromosome 17q. (C) NSC VUB01 at passage P65 showing two copies of the short arm (in green) and three copies of the long arm (in red). The third copy of chromosome 1q is translocated onto chromosome 22q. **FISH with centromeric probe specific for chromosome 1q12 region (D-I).** (D) NSC-VUB19-DM1 at passage 50 showing chromosome 1q arm translocated onto telomeric ends of chromosome 1p. There are 2 centromeres of chromosome 1 (the first one on chromosome 1 and the second one on der (1) chromosome) (metaphases analysed using inverted DAPI). (E) In situ hybridization on interphase nuclei from VUB19-DM1 cell line at passage 50. The depicted figure shows a polyploid nucleus as revealed by the 4 green spots. All nuclei analysed revealed two types of spots: condensed spots (corresponding to condensed heterochromatin) and dispersed spots corresponding to decondensed heterochromatin (green arrows). (F) NSC-H9 at passage 52 showing chromosome 1q arm translocated onto centromeric region of chromosome 22p. There are 3 centromeres of chromosome 1. (G) NSC-H9 at passage 52 showing chromosome 1q arm translocated onto telomeric ends of chromosome 17q. There are 2

centromeres of chromosome 1. (H) NSC-VUB01 at passage 65 showing chromosome 1q arm translocated onto telomeric ends of chromosome 22q. There are 3 centromeres of chromosome 1. (I) NSC-VUB05-HD (batch #b) at passage 59 showing 1q arm translocated onto telomeric ends of chromosome 10q. There are 3 centromeres of chromosome 1. **Centromeric probes specific for chromosome 1q12 region (in green) and for chromosome 15p11.1-q11.1 region (in red) (J-K).** (J) NSC-VUB05-HD (batch #a) at passage 53 showing 1q arm translocated onto centromeric region of chromosome 15p. There are 3 centromeres of chromosome 1 (in green) and 2 centromeres of chromosome 15 (in red), one of them colocalized with one of the chromosome 1 centromeres. (K) FISH on NSC-VUB05-HD P53 (batch #a) interphase nuclei with centromeric probes for chromosomes 1 and 15. There are 3 centromeres of chromosome 1 (in green) and 2 centromeres of chromosome 15 (in red), one of them is colocalized with one of the chromosome 1 centromere.

## Discussion

Altogether, our study has systematically registered a recurrent gain of chromosome 1q in all neural stem cell derivatives of pluripotent stem cell lines maintained in long-term culture. This 1q duplication was most often isolated when first observed, then cells acquired at later passages additional chromosomal abnormalities, among which aneuploidy and polyploidy. In NSC lines that exhibit the 1q duplication, cell behaviour may be heavily biased toward self-renewal since potential for neuronal differentiation may be altered. NSC may also fail to survive and/or differentiate following transplantation. Due to the relatively small number of cell lines assayed, it was not possible to us to determine whether these functional consequences related directly to the 1q the duplication or to its specific association with one or another chromosome. Indeed, both the size of the duplicated fragment and the recipient chromosomes differed between the 2 batches of mutant VUB05-HD NSC that exhibited different differentiation capacities. We could not exclude that the different ages of the control and mutant cells in the graft experiment could account for the failure of the mutant cells to engraft. Indeed, control cells never had more than 15-20 passages whereas homogeneous populations of mutant cells were always older. This technicality precluded a firm conclusion to be made on that issue. It is worth noting, however, that 1q translocation did not systematically hamper the differentiation of neural stem cells in neurons *in vitro* (Table 1). Whether the 1q translocation observed in NSCs derived from pluripotent stem cells may be consequential for tumorigenesis is another unsolved issue in the absence of affected cell survival in our transplantation assay. Nevertheless, chromosomal rearrangements, comprising both the duplication of a segment and its translocation onto different recipient chromosomes, have already been observed and called "Jumping Translocation" (JT) (13) (Supplemental Table 2). Acquired JT aberrations are seen mostly in hematological neoplasias in which they are associated with poor prognosis. The majority of published data concern hematological malignancies (14), which can explain why JT have mostly been observed in hematological neoplasias. However, duplication of the 1q arm has been also observed in solid tumors such as breast cancer, chordomas, hepatocellular carcinoma, retinoblastoma and pediatric brain tumors, suggesting that this defect may affect many cell phenotypes (Supplemental Table 2). In the case of paediatric brain tumors, the 1q gain correlates with a poor clinical outcome independent of tumor grade and histological type (15). JT recurrently involves chromosome 1q in these cases. This common specific alteration in NSCs derived from pluripotent stem cells that escape senescence in the present study and in all these malignancies, suggests that causal mechanisms and functional consequences may also be similar, and this calls for caution. 1q JT randomly occurred in the present study onto several recipient chromosomes (1, 4, 5, 8, 10, 13, 15, 17, 18, 21, 22, Y), strongly suggesting that the abnormality concerns primarily the 1q region itself rather than the recipient chromosome.

**Supplemental Table 2: Acquired 1q duplications observed in vivo cited in the article**

Acquired 1q duplications	Reference
Hematologic malignancies	Lejeune, J., <i>Ann Genet</i> , 1979. (9)
Acute lymphoblastic leukemia	Seghezzi, L. et al, <i>Cancer Genet Cytogenet</i> , 1995. (10)
Non-Hodgkin's lymphoma	Sawyer, J.R., <i>Cancer</i> , 1995. (11)
Multiple myeloma	Sawyer, J.R., <i>Blood</i> , 1998. (12)
Acute lymphoblastic leukemia	Jarvis, A., <i>Cancer Genet Cytogenet</i> , 1999. (13)
Non-metastasising primary breast carcinomas	Adeyinka, A., <i>Int J Cancer</i> 1999. (14)
Chordomas	Sawyer, J.R., <i>Neurosurg Focus</i> , 2001. (15)
Hepato cellular carcinomas	Wong, N., <i>Am J Pathol</i> 2001. (16)
Retinoblastoma	Mairal, A., <i>Genes Chromosomes Cancer</i> 2000. (17)
Acute lymphoblastic leukaemia	Wan, T.S.K., <i>Leukemia Research</i> 2004. (18)
Pediatric brain tumors	Faria, C., <i>J Neurosurg Pediatr</i> , 2010. (19)
Pediatric brain tumors	Miwa, T., <i>Neurosurgery</i> , 2010. (20)
B cell lymphoma	Fournier, A., <i>EMBO Mol Med</i> , 2010. (21)

How 1q JT is related to loss of evolution toward senescence, and whether this is a direct or indirect connection is beyond the scope of our study. It is interesting to note, however, that chromosome 1q is the longest human chromosome arm containing more than 1700 genes and 40 miRNA (NCBI Mapviewer). Some of these genes may be deregulated following duplication and translocation, as seen for instance with the BCR-Abelson translocation in chronic myeloid leukemia. Accordingly, a study by Fournier et al. identified 1q12 chromosome translocations in B-cell lymphoma and proposed that 1q12 rearrangements represent a new paradigm for long-range epigenetic deregulations in cancer (16).

In contrast to studies on undifferentiated pluripotent stem cells themselves (17-19), there has been few investigations of chromosomal abnormalities in their differentiated derivatives, although analyses of mouse ESC derivatives have reported chromosomal changes (20), in cultured mouse neurospheres and NSC lines (Supplemental Table 3). Quite interestingly, the human 1q chromosome arm corresponds to mouse chromosomes 1 and 3 and chromosome 1 is also the most affected site in the mouse neurospheres and NSC lines analyzed (Supplemental Table 3). Long-term cell culture of human NSC derived from foetal brain also revealed chromosomal abnormalities (21) (Supplemental Table 3). At odds with our results, however, are the results of two studies that reported a stable karyotype in neural derivatives of pluripotent stem cells that were extensively propagated (22, 23) (Supplemental Table 3). This discrepancy may reveal the capacity of some of the neural cell lines derived from ES or iPS cells to continue dividing over many more passages than other lineages, and it would be of major interest to seek phenotypic differences between NSC analyzed by those teams as compared to our group, potentially due to slight technical differences in differentiation protocols. High levels of antioxidants may, for instance, increase aneuploidy in stem cell cultures (24), and high levels of B27 were used in our study that may have exacerbated the genomic instability of the NSC. However, antioxidants induce a variety of chromosomal abnormalities (24), whereas in our study the chromosomal changes were clearly non-random. It would be necessary, also, to use common approaches for screening for chromosomal defects, as the two other studies relied on G banding karyotyping, whereas some –though not all- of the abnormalities required more detailed techniques to be revealed, namely mFISH or aCGH.

**Supplemental Table 3: Impact of long-term cell culture on chromosomal changes and differentiation potential (from the literature)**

NSC: neural stem cells; ND: not determined

Cell type	derived from	Chromosome abnormalities	Differentiation potential /in vitro	Overgrowth or tumor formation	ref
Neurospheres	Mouse adult cells	Chromosome marker (mostly 1)	Yes	No tumor growth	(22)
Neurospheres	Mouse fetal cells	Trisomies (mostly 1)	Declined ability to give rise to neurons	nd	(23)
NSC	Mouse ES or fetal cells	Trisomies (mostly 1 and 3)	Yes	No tumor growth	(24)
NSC	Human fetal cells	No	Yes	nd	(25)
Neural progenitors	Human ES cells carrying 20q11.21 duplication	20q11.21	nd	Tumor growth (subcutaneously injection)	(26)
NSC	Human ES cells	No	Yes	No tumor growth	(27)
NSC	Human fetal cells	Trisomies (mostly 7 and 19)	Yes	No tumor growth	(28)
NSC	Human iPS cells	No	Yes	nd	(29)
NSC	Human fetal cells	yes	nd	Tumor in 2/15 nude mice	(30)

Why the 1q region is especially prone to JT is a matter of speculation. Chromosome stability is regulated by constitutive heterochromatin (25). The presence of fragile sites *FRA1J* (1q12) and *FRA1F* (1q21) in the heterochromatic region may predispose to genomic instability of 1q arm. The other chromatin feature that may predispose to instability is its condensation state. It has been suggested that the first step in the chromosome 1q JT may be due to heterochromatic decondensation, leading to centromeric destabilization (26). A partial endoreduplication would then occur when heterochromatin is decondensed, thus facilitating the formation of a JT. This heterochromatin decondensation of chromosome 1q12, the largest heterochromatin site in the human genome, is characteristic of immunodeficiency, centromeric region instability and facial anomalies syndrome (ICF syndrome) (27). ICF syndrome is a rare autosomal disease mostly due to a mutated DNA methyltransferase gene (*DNMT3B*) (27). This recessive disease is characterized by decondensation of the juxtacentromeric heterochromatin of chromosome 1 and 16 which are then prone to breakage. This chromosomal instability is associated with demethylation of the juxtacentromeric regions of these chromosomes (27). The similarity of the centromeric instability observed in neural derivatives compared with that found in patients with JT or with ICF syndrome suggests a similar etiologic mechanism.

Altogether, our results advocate regular monitoring not only of human pluripotent stem cells – as explicitly requested by international guidelines (28) – but also of their progenies, in particular when these seem to avoid senescence. We propose checking chromosome 1q status as a regular control for genomic integrity in neural derivatives of pluripotent stem cells. Such controls will be particularly needed when neural derivatives are considered for cell therapy as this may compromise safety, and also for in vitro drug discovery and toxicology because JT would likely bias results.

## Methods

**Human pluripotent stem cell culture.** hESCs lines SA001 (obtained from Cellartis AB, Göteborg, Sweden), H9 and H1 (obtained from WiCell Research Institute Madison, WI, USA), VUB01, VUB03-DM1, VUB19-DM1 and VUB05-HD (obtained from AZ-VUB, Brussels, Belgium) were maintained on a layer of mitotically inactivated murine embryonic STO fibroblasts and cultured in DEM/F12 medium. See supplemental Methods for details. Human iPS cells, obtained from IGBMC, (Department of Cell Biology and Development, Illkirch, France), were generated from fetal lung fibroblasts IMR-90 and grown as previously described (29). Cultures were fed daily and manually passaged every 5-7 days.

**Human pluripotent stem cell derived-neural stem cells.** The protocol used to obtain NSC from hESC or iPS cells has two steps. The first one is the production of neuro-epithelial cells (NEP) from human pluripotent and the second the production of NSC from NEP. NEP are obtained after 8-10 days of differentiation in N2B27 medium containing neurobasal, DMEM/F12, N2 supplement, B27 supplement, 0.55 mM  $\beta$ -mercaptoethanol (all from Invitrogen) complemented with human recombinant noggin (300ng/mL, Preprotech) and SB431542 (20 $\mu$ M, Tocris). The medium was changed daily until the appearance of neural rosettes containing NEP after 8-10 days of differentiation. At this time, medium was replaced by the N2B27 medium supplemented by EGF (epidermal growth factor) (R&D Systems 10ng/mL), hFGF2 (Pre proTech 10ng/mL) and hBDNF (human brain-derived neurotrophic factor), (R&D Systems 10ng/mL). NSC are cultured during 3 to 5 days until confluence and passaged (dilution factor:  $\sim$ 1/3 to 1/5) using 0.05 trypsin/EDTA.

**Differentiation of neural stem cells to neurons.** NSCs were counted and seeded at a density of 50,000 cells/cm<sup>2</sup> on pre-coated Polyornithin/Laminin. The N2B27 medium was used in the presence of hBDNF but without hEGF and hFGF2. Medium was changed every 2 days until the appearance of neurons which were fully differentiated after 20 days. Phenotype was monitored based on the expression of specific markers by immunocytochemistry.

**Cell transplantation and tissue processing.** Adult female Nude rats (10 weeks old, weight 190–220 g at the time of grafting; Charles River Laboratories) were used. Animals were randomly allocated to 2 groups: 5 rats grafted with VUB01-NSC P21 without the 1q JT, 5 rats grafted with VUB01-NSC P74 carrying the 1q JT. All surgical procedures were carried out as previously described (30) under full anesthesia using a mixture of ketamine (15 mg/kg) and xylazine (3mg/kg; Bayer Health Care) and using a stereotaxic frame. Unilateral lesions were made by injecting 1 $\mu$ l of 80 nmol/ $\mu$ l quinolinic acid dissolved in 0.1 M PBS into the right striatum, according to the following coordinates (in mm): anteroposterior (A) -0.5; lateral (L) -2.7; ventral (V) -4.7 and tooth bar +3. One week after the lesion, rats received transplants of cells (100,000 in 2X 1 $\mu$ l of HBSS supplemented with 0.05% DNaseI; Invitrogen) (A= -0.5; L= -2.7; V= -5.7 and -4.7°. To ensure that the mutant grafted cells were still alive at the moment of the transplantation, a few cells that had undergone the same treatment as the grafted cells were successfully brought back into culture. Seven weeks after transplantation, rats were terminally



anesthetized with 150 mg/kg i.p. sodium pentobarbital (Ceva Sante' Animale), and their brains were fixed by transcardial perfusion with 700 µl of 0.1M PBS (pH 7.4), followed by 250 ml of buffered 4% paraformaldehyde (PFA). Brains were removed, postfixed overnight at 4°C in 4% PFA, and then cryoprotected in 30% sucrose solution at 4°C. Coronal brain sections (30 µm) were cut on a cryotome, collected serially and stored at -20°C in a cryoprotectant solution until analysis. Grafted cells were first searched at the coordinates used for the injection, i.e. bregma - 0.5 mm, according to cerebral structures localized on serial brain slices and the Paxinos-Watson Atlas. Grafts usually appeared on cresyl violet stained slices as a distinct pack of cells, darker than the rest of the parenchyma. If no graft was clearly identified, human specific labeling (HNA Millipore, MAB1281, 1/500) was used to reveal potentially scattered cells in the brain sections that contained the striatum.

**Immunocytochemistry and immunohistochemistry.** See Supplemental Methods for details.

**Assessment of copy number variation.** IntegraChip genome-wide BAC arrays of 5,245 BAC clones (526-kb median spacing) were hybridized by the manufacturer, IntegraGen (Evry, France). CGH data have been deposited in the GEO database under the accession numbers GSE13565 and GSE33708. The detailed protocol can be found in the Supplemental Methods.

**Harvest of pluripotent stem cells and their progenies for chromosome analysis.** Preparation of pluripotent stem cells and their progenies, detailed G-banding, mFISH, FISH with juxtacentromeric specific probes and arm-specific chromosome painting protocols can be found in the Supplemental Methods.

**Study approval.** All animal experiments were conducted in accordance with the Direction des Services Vétérinaires, Ministère de l'Agriculture of France, and with the European Communities Council Directive (86/609/EEC).

## Acknowledgements

This study has been supported in part by additional grants from Genopole, Medicen Paris Region (IngeCELL), ANR (He-Screen) and the European Commission (FP6, STEM-HD; FP7 NeuroStemCell). The authors thank Dr Alexandra Benchoua, Claire Boissard and Pauline Georges for the derivation of NSC from SA001 cell line, Pr Stephane Viville for providing the IMR90-reprogrammed iPS cell line and Pr Jean-Pierre Siffroi for cytogenetic expertise. We are grateful to Alexandra Plancheron, Marion Brenot and Catia Fonseca Bernardo for technical support, Dr Arturo Londono-Vallejo for helpful discussions, Drs Alexandra Benchoua and Cécile Martinat for critical reading of the manuscript and Susan Cure for assistance with the grammatical editing of the manuscript.

## References

1. Sub-retinal Transplantation of hESC Derived RPE(MA09-hRPE)Cells in Patients With Stargardt's Macular Dystrophy. <http://www.advancedcell.com>  
<http://www.clinicaltrials.gov/ct2/search. Study NCT01345006>. Updated November 7, 2011. Accessed November 14, 2011
2. Safety and Tolerability of Sub-retinal Transplantation of Human Embryonic Stem Cell Derived Retinal Pigmented Epithelial (hESC-RPE) Cells in Patients With Stargardt's Macular Dystrophy (SMD). <http://www.advancedcell.com>.  
<http://www.clinicaltrials.gov/ct2/search. Study NCT01469832>. Updated November 9, 2011. Accessed November 14, 2011
3. Safety and Tolerability of Sub-retinal Transplantation of hESC Derived RPE (MA09-hRPE) Cells in Patients With Advanced Dry Age Related Macular Degeneration (Dry AMD).  
<http://www.advancedcell.com>. <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/search. Study NCT01344993>. Updated November 9, 2011 . Accessed November 14, 2011
4. Safety Study of GRNOPC1 in Spinal Cord Injury. <http://www.geron.com>.  
<http://www.clinicaltrials.gov/ct2/search. Study NCT01217008>. Updated October 26, 2011
5. Draper, J.S., Smith, K., Gokhale, P., Moore, H.D., Maltby, E., Johnson, J., Meisner, L., Zwaka, T.P., Thomson, J.A., and Andrews, P.W. 2004. Recurrent gain of chromosomes 17q and 12 in cultured human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 22:53-54.
6. Inzunza, J., Sahlen, S., Holmberg, K., Stromberg, A.M., Teerijoki, H., Blennow, E., Hovatta, O., and Malmgren, H. 2004. Comparative genomic hybridization and karyotyping of human embryonic stem cells reveals the occurrence of an isodicentric X chromosome after long-term cultivation. *Mol Hum Reprod* 10:461-466.
7. Baker, D.E., Harrison, N.J., Maltby, E., Smith, K., Moore, H.D., Shaw, P.J., Heath, P.R., Holden, H., and Andrews, P.W. 2007. Adaptation to culture of human embryonic stem cells and oncogenesis in vivo. *Nat Biotechnol* 25:207-215.
8. Lefort, N., Feyeux, M., Bas, C., Feraud, O., Bennaceur-Griscelli, A., Tachdjian, G., Peschanski, M., and Perrier, A.L. 2008. Human embryonic stem cells reveal recurrent genomic instability at 20q11.21. *Nat Biotechnol* 26:1364-1366.
9. Lefort, N., Perrier, A.L., Laabi, Y., Varela, C., and Peschanski, M. 2009. Human embryonic stem cells and genomic instability. *Regen Med* 4:899-909.

10. Hayflick, L. 1965. The Limited In Vitro Lifetime Of Human Diploid Cell Strains. *Exp Cell Res* 37:614-636.
11. Wu, W., He, Q., Li, X., Zhang, X., Lu, A., Ge, R., Zhen, H., Chang, A.E., Li, Q., and Shen, L. 2011. Long-term cultured human neural stem cells undergo spontaneous transformation to tumor-initiating cells. *Int J Biol Sci* 7:892-901.
12. Yu, J., Vodyanik, M.A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J.L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G.A., Ruotti, V., Stewart, R., et al. 2007. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318:1917-1920.
13. Lejeune, J., Maunoury, C., Prieur, M., and Van den Akker, J. 1979. [A jumping translocation (5p;15q), (8q;15q), and (12q;15q) (author's transl)]. *Ann Genet* 22:210-213.
14. Mitelman, F., Johansson, B., and Mertens, F. 2004. Fusion genes and rearranged genes as a linear function of chromosome aberrations in cancer. *Nat Genet* 36:331-334.
15. Faria, C., Miguens, J., Antunes, J.L., Salgado, D., Nunes, S., Barroso, C., Martins Mdo, C., Nunes, V.M., and Roque, L. 2010. Pediatric brain tumors: genetics and clinical outcome. *J Neurosurg Pediatr* 5:263-270.
16. Fournier, A., McLeer-Florin, A., Lefebvre, C., Duley, S., Barki, L., Ribeyron, J., Alboukadel, K., Hamaidia, S., Granjon, A., Gressin, R., et al. 2010. 1q12 chromosome translocations form aberrant heterochromatic foci associated with changes in nuclear architecture and gene expression in B cell lymphoma. *EMBO Mol Med* 2:159-171.
17. Narva, E., Autio, R., Rahkonen, N., Kong, L., Harrison, N., Kitsberg, D., Borghese, L., Itskovitz-Eldor, J., Rasool, O., Dvorak, P., et al. 2010. High-resolution DNA analysis of human embryonic stem cell lines reveals culture-induced copy number changes and loss of heterozygosity. *Nat Biotechnol* 28:371-377.
18. Mayshar, Y., Ben-David, U., Lavon, N., Biancotti, J.C., Yakir, B., Clark, A.T., Plath, K., Lowry, W.E., and Benvenisty, N. 2010. Identification and classification of chromosomal aberrations in human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 7:521-531.
19. Laurent, L.C., Ulitsky, I., Slavin, I., Tran, H., Schork, A., Morey, R., Lynch, C., Harness, J.V., Lee, S., Barrero, M.J., et al. 2011. Dynamic changes in the copy number of pluripotency and cell proliferation genes in human ESCs and iPSCs during reprogramming and time in culture. *Cell Stem Cell* 8:106-118.
20. Conti, L., and Cattaneo, E. 2010. Neural stem cell systems: physiological players or in vitro entities? *Nat Rev Neurosci* 11:176-187.

21. Sareen, D., McMillan, E., Ebert, A.D., Shelley, B.C., Johnson, J.A., Meisner, L.F., and Svendsen, C.N. 2009. Chromosome 7 and 19 trisomy in cultured human neural progenitor cells. *PLoS One* 4:e7630.
22. Koch, P., Opitz, T., Steinbeck, J.A., Ladewig, J., and Brustle, O. 2009. A rosette-type, self-renewing human ES cell-derived neural stem cell with potential for in vitro instruction and synaptic integration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:3225-3230.
23. Nemati, S., Hatami, M., Kiani, S., Hemmesi, K., Gourabi, H., Masoudi, N., Alaie, S., and Baharvand, H. 2011. Long-term Self-Renewable Feeder-Free Human Induced Pluripotent Stem Cell-derived Neural Progenitors. *Stem Cells Dev*.
24. Li, T.S., and Marban, E. 2010. Physiological levels of reactive oxygen species are required to maintain genomic stability in stem cells. *Stem Cells* 28:1178-1185.
25. Senda, S., Blanche, S., Costagliola, D., Cibert, C., Nigon, F., Firtion, G., Floch, C., Parat, S., and Viegas-Pequignot, E. 2007. Altered heterochromatin organization after perinatal exposure to zidovudine. *Antivir Ther* 12:179-187.
26. Sawyer, J.R., Tricot, G., Mattox, S., Jagannath, S., and Barlogie, B. 1998. Jumping translocations of chromosome 1q in multiple myeloma: evidence for a mechanism involving decondensation of pericentromeric heterochromatin. *Blood* 91:1732-1741.
27. Ehrlich, M., Jackson, K., and Weemaes, C. 2006. Immunodeficiency, centromeric region instability, facial anomalies syndrome (ICF). *Orphanet J Rare Dis* 1:2.
28. Loring, J.F., and Rao, M.S. 2006. Establishing standards for the characterization of human embryonic stem cell lines. *Stem Cells* 24:145-150.
29. Lapillonne, H., Kobari, L., Mazurier, C., Tropel, P., Giarratana, M.C., Zanella-Cleon, I., Kiger, L., Wattenhofer-Donze, M., Puccio, H., Hebert, N., et al. Red blood cell generation from human induced pluripotent stem cells: perspectives for transfusion medicine. *Haematologica* 95:1651-1659.
30. Aubry, L., Bugi, A., Lefort, N., Rousseau, F., Peschanski, M., and Perrier, A.L. 2008. Striatal progenitors derived from human ES cells mature into DARPP32 neurons in vitro and in quinolinic acid-lesioned rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:16707-16712.

## SUPPLEMENTAL METHODS

**Human pluripotent stem cell culture.** hESCs lines SA001 (XY, passages 20-41, Cellartis AB, Göteborg, Sweden), H9 (XX, passages 64-70, WiCell Research Institute Madison, WI, USA), VUB01 (1) (XY, passages 94-100), VUB03-DM1 (1) (DM1 line, XY, passages 63-67 AZ-VUB, Brussels, Belgium), VUB19-DM1 (2) (DM1 line, XY, passages 72-73 AZ-VUB, Belgium) and VUB05-HD (1) (Huntington line, XY, passage 103-120, AZ-VUB, Belgium) were maintained on a layer of mitotically inactivated murine embryonic STO fibroblasts. The hESCs were cultured in DMEM/F12 glutamax supplemented with 20% knockout serum replacement, 1 mM nonessential amino acids, 1% penicillin/streptomycin, 0.55 mM  $\beta$ -mercaptoethanol and 10 ng/ml recombinant human FGF2 (fibroblast growth factor 2) (all from Invitrogen). Human iPS cells were generated from fetal lung fibroblasts IMR-90 and grown as previously described (3). Cultures were fed daily and manually passaged every 5-7 days.

**Immunohistochemistry.** Experiments were performed as previously described (4). Briefly, cells were incubated with MAP2 primary antibody (Sigma Aldrich, M1406; 1/1000) and Nestin (NES) (human specific) primary antibody (Millipore, AB5922; 1/2000) overnight at 4°C.

**Immunocytochemistry.** Immunocytochemistry experiments were performed as previously described (5). Cells were fixed with 4% PFA for 20 min at room temperature, rinsed with PBS and blocked with 1% BSA, 5% normal goat serum and 0.1% triton in PBS solution for 1 hour. Thereafter cells were incubated with beta III-tubulin (TUJ1) primary antibody (mouse IgG, MMS-435P, Covance, dilution 1/500<sup>e</sup>), SOX2 primary antibody (rabbit, polyclonal, Ab5603MI, Millipore, dilution 1/500e), HuCD primary antibody (mouse, monoclonal, A21271, Invitrogen, dilution 1/1000e) overnight at 4°C. Alexa-488 and alexa-555 labeled secondary antibodies were used at the dilution 1/1000e (Molecular probes). Then DAPI counterstain (2%g/mL, sigma) was applied.

**Assessment of copy number variation.** Genomic DNA was isolated from NSC using the Wizard<sup>®</sup> Genomic DNA Purification Kit (Promega, Charbonnieres, France). IntegraChip genome-wide BAC arrays of 5,245 BAC clones (526-kb median spacing) were hybridized by the manufacturer, IntegraGen as previously described (6, 7). The genomic positions of all clones on the array have been determined by BAC end sequencing. A genomic DNA labeling kit (Enzo) was used to label the sample DNA with Cy5 and the reference DNA with Cy3<sup>3</sup>. The labeled products were purified with QiaQuick polymerase chain reaction (PCR) purification kits (Qiagen). After addition of tRNA (48 mg) plus a quantity of human Cot DNA (Invitrogen) equal to 50 times the mass of the labeled DNAs, the resulting products were concentrated by vacuum centrifugation, resuspended in 43 mL of hybridization solution (Ambion) and deposited on the array under a coverslip. Hybridization in a sealed chamber (Corning Life Sciences) was for 66 hours at 55°C, and

posthybridization treatment was with minor modifications of a published protocol<sup>4</sup>. Slides were scanned (Agilent Technologies), data were extracted with GenePix 6 (Axon InstrumentseMolecular Devices), and copy number analysis was performed with GenoCensus (IntegraGen), which includes block Loess normalization.

**Harvest of hESCs, iPS cells and their progenies for chromosome analysis.** Preparation of hESCs, iPS cells and their progenies were done as previously described (8). Actively growing hESC colonies or NSC were treated with colchicine at 1 µg/mL (Eurobio) for 90 min at 37°C. After washing, cells were incubated in trypsin–EDTA 0.05% (Eurobio) for 2–3 min and then harvested. Cells were incubated in 0.075 M KCl (Sigma) for 10–18 min at 37°C, followed by fixation with 3:1 methyl alcohol/glacial acetic acid. Fixed cells were dropped on wet slides and dried at 37°C for G-banding and at room temperature for mFISH, FISH with centromeric-specific probes and arm-specific chromosome painting. **G banding** was performed by immersing slides in 0.05% trypsin–EDTA with two drops of 0.4 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> for 2 to 10 s, rinsed in distilled water with 2% SVF and stained with Giemsa (Merck) for 5 min, rinsed in distilled water and airdried. Twenty to 50 metaphases were captured using a Zeiss Z1 microscope equipped with an AxioCam camera and ×20 and ×63 plan-apo objectives. Images were analysed, and at least 10 metaphases were fully karyotyped using the MetaSystems Ikaros software (MetaSystems). **For mFISH**, fixed and denatured metaphase chromosomes were hybridised overnight at 37°C with a denatured “cocktail painting mFISH” probe (MetaSystems). Slides were washed in successive baths of 0.4 × SSC and 2 × SSC, 0.05% Tween20, and nuclei were stained with DAPI. Seventeen to 55 metaphases were captured using a Zeiss Z1 fluorescence microscope equipped with a UV HBO 100-W lamp coupled to an AxioCam camera and ×20 and ×63 objectives. At least 10 analysed metaphases were karyotyped using the MetaSystems Isis software. **FISH with centromeric specific probes for chromosome 1 and chromosome 15:** The centromeric probe specific for human chromosome 1 corresponds to region 1q12 (Locus D1Z1, DNA class: satellite III, reference : LPE 01G (Cytocell) and the centromeric probe specific for human chromosome 15 corresponds to region 15p11.1-q11.1 (Locus D15Z4, DNA class: a satellite, reference: CEP15, Vysis® Abbott Molecular Inc). The centromeric probe for chromosome 1 is labelled with FITC fluorochrome and the centromeric probe for chromosome 15 is labelled with Spectrum Orange. Fixed and denatured metaphase chromosomes and interphase nuclei were hybridised overnight at 37°C with a denatured fluorescently labelled chromosome 1 DNA probe (and fluorescently labelled chromosome 15 DNA probe for NSC-VUB05-HD passage 53). Slides were washed in successive baths of 0.25 ×SSC and 2 ×SSC, 0.05% Tween20 and nuclei were stained with DAPI. 50 interphase nuclei and 10 metaphases were captured using a Zeiss Z1 fluorescence microscope equipped with a UV HBO 100-W lamp coupled to an AxioCam camera and x20 and x63 objectives. Interphase nuclei and metaphases were analysed using the Metasystems Isis software. **Arm-specific chromosome painting:** Fixed and denatured metaphase chromosomes were hybridised overnight at 37°C with denatured painting probes specific for short arm 1p directly labelled with FITC and long arm 1q directly labelled with TexasRed®

(Metasystems' probes). Slides were washed in successive baths of 1xSSC and 2 x SSC, 0.05% Tween20 and nuclei were stained with DAPI. Ten to 20 metaphases were captured using a Zeiss Z1 fluorescence microscope equipped with a UV HBO 100-W lamp coupled to an AxioCam camera and x20 and x63 objectives. Interphase nuclei and metaphases were analysed using the Metasystems Isis software.

## References

1. Mateizel, I., De Temmerman, N., Ullmann, U., Cauffman, G., Sermon, K., Van de Velde, H., De Rycke, M., Degreef, E., Devroey, P., Liebaers, I., et al. 2006. Derivation of human embryonic stem cell lines from embryos obtained after IVF and after PGD for monogenic disorders. *Hum Reprod* 21:503-511.
2. Mateizel, I., Spits, C., De Rycke, M., Liebaers, I., and Sermon, K. Derivation, culture, and characterization of VUB hESC lines. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 46:300-308.
3. Lapillonne, H., Kobari, L., Mazurier, C., Tropel, P., Giarratana, M.C., Zanella-Cleon, I., Kiger, L., Wattenhofer-Donze, M., Puccio, H., Hebert, N., et al. Red blood cell generation from human induced pluripotent stem cells: perspectives for transfusion medicine. *Haematologica* 95:1651-1659.
4. Aubry, L., Bugi, A., Lefort, N., Rousseau, F., Peschanski, M., and Perrier, A.L. 2008. Striatal progenitors derived from human ES cells mature into DARPP32 neurons in vitro and in quinolinic acid-lesioned rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:16707-16712.
5. Denis, J.A., Rochon-Beaucourt, C., Champon, B., and Pietu, G. Global Transcriptional Profiling of Neural and Mesenchymal Progenitors Derived from Human Embryonic Stem Cells Reveals Alternative Developmental Signaling Pathways. *Stem Cells Dev.*
6. Struski, S., Helias, C., Gervais, C., Leymarie, V., Audhuy, B., Moskovtchenko, P., Lutz, P., Gaub, M.P., and Lessard, M. 2007. Confirmation of a novel recurrent association: BCR-ABL t(9;22) and t(19;21). *Cancer Genet Cytogenet* 179:127-131.
7. Guillaud-Bataille, M., Valent, A., Soularue, P., Perot, C., Inda, M.M., Receveur, A., Smaili, S., Roest Crolius, H., Benard, J., Bernheim, A., et al. 2004. Detecting single DNA copy number variations in complex genomes using one nanogram of starting DNA and BAC-array CGH. *Nucleic Acids Res* 32:e112.
8. Tropel, P., Tournois, J., Come, J., Varela, C., Moutou, C., Fagner, P., Cailleret, M., Laabi, Y., Peschanski, M., and Viville, S. High-efficiency derivation of human embryonic stem cell lines following pre-implantation genetic diagnosis. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 46:376-385.

9. Lejeune, J., Maunoury, C., Prieur, M., and Van den Akker, J. 1979. [A jumping translocation (5p;15q), (8q;15q), and (12q;15q) (author's transl)]. *Ann Genet* 22:210-213.
10. Seghezzi, L., Addis, P., Giglio, S., Invernizzi, R., and Maserati, E. 1995. Jumping translocations in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 80:80-81.
11. Sawyer, J.R., Swanson, C.M., Koller, M.A., North, P.E., and Ross, S.W. 1995. Centromeric instability of chromosome 1 resulting in multibranching chromosomes, telomeric fusions, and "jumping translocations" of 1q in a human immunodeficiency virus-related non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer* 76:1238-1244.
12. Sawyer, J.R., Tricot, G., Mattox, S., Jagannath, S., and Barlogie, B. 1998. Jumping translocations of chromosome 1q in multiple myeloma: evidence for a mechanism involving decondensation of pericentromeric heterochromatin. *Blood* 91:1732-1741.
13. Jarvis, A., Sharma, P., Watson, N., and Smith, A. 1999. Two children with acute lymphoblastic leukemia and "jumping" translocations: both involve 1q23 as the donor breakpoint. *Cancer Genet Cytogenet* 114:112-116.
14. Adeyinka, A., Mertens, F., Idvall, I., Bondeson, L., Ingvar, C., Mitelman, F., and Pandis, N. 1999. Different patterns of chromosomal imbalances in metastasising and non-metastasising primary breast carcinomas. *Int J Cancer* 84:370-375.
15. Sawyer, J.R., Husain, M., and Al-Mefty, O. 2001. Identification of isochromosome 1q as a recurring chromosome aberration in skull base chordomas: a new marker for aggressive tumors? *Neurosurg Focus* 10:E6.
16. Wong, N., Lam, W.C., Lai, P.B., Pang, E., Lau, W.Y., and Johnson, P.J. 2001. Hypomethylation of chromosome 1 heterochromatin DNA correlates with q-arm copy gain in human hepatocellular carcinoma. *Am J Pathol* 159:465-471.
17. Mairal, A., Pinglier, E., Gilbert, E., Peter, M., Validire, P., Desjardins, L., Doz, F., Aurias, A., and Couturier, J. 2000. Detection of chromosome imbalances in retinoblastoma by parallel karyotype and CGH analyses. *Genes Chromosomes Cancer* 28:370-379.
18. Wan, T.S., Ma, S.K., Chow, E.Y., Li, Y.H., Lin, S.Y., and Chan, L.C. 2004. Pathogenesis of jumping translocations: a molecular cytogenetics study. *Leuk Res* 28:1075-1079.
19. Faria, C., Miguens, J., Antunes, J.L., Salgado, D., Nunes, S., Barroso, C., Martins Mdo, C., Nunes, V.M., and Roque, L. 2010. Pediatric brain tumors: genetics and clinical outcome. *J Neurosurg Pediatr* 5:263-270.
20. Miwa, T., Hirose, Y., Sasaki, H., Ezaki, T., Yoshida, K., and Kawase, T. 2011. Single-Copy Gain of Chromosome 1q Is a Negative Prognostic Marker in Pediatric Nonependymal, Nonpilocytic Gliomas. *Neurosurgery*.



21. Fournier, A., McLeer-Florin, A., Lefebvre, C., Duley, S., Barki, L., Ribeyron, J., Alboukadel, K., Hamaidia, S., Granjon, A., Gressin, R., et al. 2010. 1q12 chromosome translocations form aberrant heterochromatic foci associated with changes in nuclear architecture and gene expression in B cell lymphoma. *EMBO Mol Med* 2:159-171.
22. Foroni, C., Galli, R., Cipelletti, B., Caumo, A., Alberti, S., Fiocco, R., Vescovi, A. 2007. Resilience to transformation and inherent genetic and functional stability of adult neural stem cells *ex vivo*. *Cancer Research*
23. Vukicevic, V., Jauch, A., Dinger, T.C., Gebauer, L., Hornich, V., Bornstein, S.R., Ehrhart-Bornstein, M., and Muller, A.M. 2010. Genetic instability and diminished differentiation capacity in long-term cultured mouse neurosphere cells. *Mech Ageing Dev* 131:124-132.
24. Diaferia, G.R., Conti, L., Redaelli, S., Cattaneo, M., Mutti, C., Deblasio, P., Dalpra, L., Cattaneo, E., and Biunno, I. 2011. Systematic Chromosomal Analysis of Cultured Mouse Neural Stem Cell Lines. *Stem Cells Dev*.
25. Sun, Y., Pollard, S., Conti, L., Toselli, M., Biella, G., Parkin, G., Willatt, L., Falk, A., Cattaneo, E., and Smith, A. 2008. Long-term tripotent differentiation capacity of human neural stem (NS) cells in adherent culture. *Mol Cell Neurosci* 38:245-258.
26. Werbowetski-Ogilvie, T.E., Bosse, M., Stewart, M., Schnerch, A., Ramos-Mejia, V., Rouleau, A., Wynder, T., Smith, M.J., Dingwall, S., Carter, T., et al. 2009. Characterization of human embryonic stem cells with features of neoplastic progression. *Nat Biotechnol* 27:91-97.
27. Koch, P., Opitz, T., Steinbeck, J.A., Ladewig, J., and Brustle, O. 2009. A rosette-type, self-renewing human ES cell-derived neural stem cell with potential for in vitro instruction and synaptic integration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:3225-3230.
28. Sareen, D., McMillan, E., Ebert, A.D., Shelley, B.C., Johnson, J.A., Meisner, L.F., and Svendsen, C.N. 2009. Chromosome 7 and 19 trisomy in cultured human neural progenitor cells. *PLoS One* 4:e7630.
29. Nemati, S., Hatami, M., Kiani, S., Hemmesi, K., Gourabi, H., Masoudi, N., Alaie, S., and Baharvand, H. 2011. Long-term Self-Renewable Feeder-Free Human Induced Pluripotent Stem Cell-derived Neural Progenitors. *Stem Cells Dev*.
30. Wu, W., He, Q., Li, X., Zhang, X., Lu, A., Ge, R., Zhen, H., Chang, A.E., Li, Q., and Shen, L. 2011. Long-term cultured human neural stem cells undergo spontaneous transformation to tumor-initiating cells. *Int J Biol Sci* 7:892-901.



## **Summary**

Huntington disease (HD) is a devastating inherited neurodegenerative disease with late clinical onset that is caused by the expansion of a CAG/ glutamine tract in the *Huntingtin* gene (*HTT*). To help decipher HD pathological mechanisms a number of genetic animal or cellular models have been created and extensively explored during the past 15 years. Nonetheless, ensuing mechanistic and drug discovery studies have failed to produce clinically-approved treatment beneficial to HD patients. Available drugs, while useful, currently only serve to manage symptoms, but fail to address patient inevitable death. One possible weakness of existing model could be that they fall short of fully replicating early pathological pathways such as abnormal transcription in early HD. This pathological feature is considered as one of the likely causative event of HD, but it has remained essentially unexplored during the pre-symptomatic period in human due to the lack of proper models. Taking advantage of the progressive availability of several human embryonic stem cell lines isolated from human embryos genetically diagnosed with HD (HD-hESC) to modelize HD pathology. I hypothesized that HD-hESC and their derivatives could be uniquely suited to decipher pathological or corrective mechanisms occurring during development and early adulthood in HD cells.

During my PhD, I developed neural differentiation protocols, cellular and molecular tools to promote the use of HD and control hESC lines as cellular model of HD. I used these cultures to explore transcriptional dysregulation in immature neural HD cells. Using of a whole genome transcriptomic approach combined with gain and loss of function strategies on HD-hESC neural and neuronal progenies, I identified a collection of early developmental biomarkers of the mutation responsible for adult HD pathology. Interestingly none of these genes had previously been linked to this disorder even in study based on samples from HD patient's brain. These results may point to the existence of different molecular impacts of the HD mutation during early developmental (pre-symptomatic) phases as compared to later symptomatic defined ones. Overall, these findings may end-up providing original targets for pre-symptomatic pharmacologic intervention.

## Résumé

La maladie de Huntington (MH) est une maladie neurodégénérative héréditaire et dévastatrice. Elle est causée par l'expansion d'un motif CAG qui code pour une séquence de poly-glutamine (polyQ) dans le gène *huntingtine* (*HTT*). La survenue des symptômes de la maladie est tardive. Pour comprendre les mécanismes pathologiques de la MH, un grand nombre de modèles génétiques animaux et cellulaires ont été utilisés au cours des 15 dernières années. Néanmoins, les études mécanistiques et pharmacologiques ne se sont pas traduites en traitement bénéfique de façon durable pour les patients atteints de la MH. Les médicaments disponibles, bien que utiles, ne servent actuellement qu'à gérer les symptômes de la maladie, et n'ont pas d'effet sur le pronostic léthal. Une des faiblesses des modèles existants pourrait être leur incapacité à répliquer pleinement les premières étapes précoces de la maladie, notamment les premières anomalies transcriptionnelles. Ce phénomène est considéré comme une cause possible de la maladie, mais a peu été exploré chez les sujets pré-symptomatiques porteurs de la mutation à cause du manque de modèles appropriés. J'ai tiré profit de la disponibilité progressive de plusieurs lignées de cellules souches isolées à partir d'embryons humains issus d'un diagnostic préimplantatoire (DPI) de la MH (hESC-MH) pour modéliser la MH. J'ai émis l'hypothèse que les hESC-MH et leurs descendances pourraient être particulièrement adaptées au déchiffrement des mécanismes pathologiques ou correcteurs impliqués dans la MH, durant la phase pré-symptomatique au sens large, du développement embryonnaire à la vie adulte.

Durant ma thèse, j'ai développé des protocoles de différenciation cellulaire ainsi que des outils cellulaires et moléculaires pour promouvoir l'utilisation des lignées de hESC mutantes et normales comme modèle cellulaire de la MH. Puis j'ai utilisé ces cultures pour explorer la dérégulation transcriptionnelle dans les cellules neurales immatures porteuses de la mutation causale de la MH. Notre choix s'est porté sur une approche transcriptomique, combinée avec les stratégies de surexpression de *HTT* mutante tronquée et de perte d'expression de la *HTT* totale sur des cellules neurales et neuronales dérivées de hESC-MH. Ces études m'ont permis d'identifier une collection de nouveaux biomarqueurs cellulaires précoces associés à la mutation causale de la MH. De manière intéressante, la majorité des gènes identifiés n'a jamais été précédemment associée à la maladie, pas même dans les études réalisées à partir d'échantillons de cerveau de patients.

Ces résultats suggèrent l'existence de mécanismes moléculaires encore inconnus et spécifiques des phases les plus précoces de la maladie. Ces découvertes pourraient fournir des cibles originales pour une intervention pharmacologique pré-symptomatique.