



**HAL**  
open science

# Rôle de FOXO3 dans la régulation des phases précoces de la maladie de Huntington lors de la différenciation neuronale

Jessica Voisin

## ► To cite this version:

Jessica Voisin. Rôle de FOXO3 dans la régulation des phases précoces de la maladie de Huntington lors de la différenciation neuronale. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2016. Français. NNT : 2016PA066613 . tel-01884404

**HAL Id: tel-01884404**

**<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01884404>**

Submitted on 1 Oct 2018

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

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

**Thèse de Doctorat de**  
**L'Université Pierre et Marie Curie**

*Ecole Doctorale n°158 : Cerveau, cognition et comportement*

*Spécialité : Neurosciences*

*Equipe : Biologie et Pathologie du Neurone*

**Rôle de FOXO3 dans la régulation des phases précoces de la  
maladie de Huntington lors de la différenciation neuronale**

Par

**Jessica Voisin**

Thèse soutenue à Paris le 29 septembre 2016

Devant le Jury Composé de :

Mme le Dr Karine Mérienne,	en qualité de rapporteur
M. le Dr Emmanuel Brouillet,	en qualité de rapporteur
M. le Dr Frédéric Devaux,	en qualité d'examineur
Mme le Dr Lisa Ellerby	en qualité d'examineur
M. le Dr Christian Neri,	en qualité de directeur de thèse



# Résumé

FOXO3 est un facteur de transcription important pour la réponse au stress, la régulation de la différenciation et de la survie cellulaires qui a des effets neuroprotecteurs dans plusieurs modèles de maladies neurodégénératives, dont la maladie de Huntington (MH). Les effets neuroprotecteurs de FOXO3 sont cependant réprimés dans la MH par une activité anormale de Ryk, un récepteur Wnt important pour la neurogenèse. Cet effet est médié par une augmentation du domaine intracellulaire de Ryk (Ryk-ICD) qui se lie à la  $\beta$ -caténine, un co-facteur de FOXO3, et perturbe l'activité transcriptionnelle de FOXO3. Les cibles et les mécanismes engagés par FOXO3 pour réguler l'homéostasie des cellules humaines au cours de la différenciation et de la maintenance neuronales sont inconnus. L'objectif principal de ce travail est d'étudier les effets de la huntingtine mutée (mHTT) sur le répertoire des cibles directes humaines de FOXO3 à l'aide d'un modèle des phases développementales de la MH, à savoir des cellules souches neurales isogéniques (NSC-MH) dérivées de cellules souches pluripotentes induites. En préalable, nous avons étudié le mode de liaison du fragment Ryk-ICD au complexe FOXO3/ $\beta$ -caténine pour observer que ce fragment forme un complexe protéique avec FOXO3 et la  $\beta$ -caténine, ce qui suggère que le fragment Ryk-ICD est un co-régulateur de FOXO3 dans des conditions normales ou pathologiques. L'analyse des cibles directes de FOXO3 dans les cellules souches neurales qui expriment la huntingtine normale ou mutée, avec ou sans inhibition de *RYK*, montre une reprogrammation de ces cibles avec des pertes et des gains dans des voies de signalisation qui sont connues pour leur rôle dans la MH, notamment les voies de régulation de la prolifération cellulaire. Ces effets seraient favorisés par une plus forte liaison de FOXO3 dans les régions promotrices et amplificatrices, et ils sont partiellement dépendants de Ryk. Ces résultats montrent que la régulation des gènes par FOXO3 est fortement modifiée dans les cellules qui expriment la huntingtine mutée et ils suggèrent un modèle dans lequel FOXO3 perd et gagne des propriétés biologiques qui au tout, pourraient favoriser la différenciation des neurones bien qu'ils soient fragilisés de façon constitutive par la huntingtine mutée. Ces résultats ouvrent la voie à une étude approfondie des mécanismes d'homéostasie cellulaire sous contrôle de FOXO3 dans les neurones en différenciation et de leur impact sur l'activité des neurones adultes. Plus largement, ces résultats permettent de mieux comprendre la dynamique moléculaire de la MH et les effets de reprogrammation moléculaire sur la différenciation et l'activité neuronale.

**MOTS CLES** : Maladie de Huntington, phases précoces, réponse adaptative, FOXO3, cellules souches humaines

# Abstract

FOXO3 is an important transcription factor for stress response, the regulation of differentiation and cell survival that has neuroprotective effects in several models of neurodegenerative diseases, including Huntington's disease (HD). The neuroprotective effects of FOXO3 in HD are repressed by abnormal signaling from the Wnt receptor Ryk. This effect is mediated by nuclear increase of the Ryk intracellular domain (Ryk-ICD) that binds to  $\beta$ -catenin, a co-factor of FOXO3, and disrupts the transcriptional activity of FOXO3. Targets and mechanisms involved by FOXO3 to regulate human cellular homeostasis during neuronal differentiation and maintenance are remain unknown. The aim of this work was to explore the effect of the mutant huntingtin (mHTT) on the repertoire of direct FOXO3 targets (F3Ts) using a model of developmental stage of HD, namely HD isogenic Neural Stem cells (NSC-MH) derived from Huntington's Induced Pluripotent Stem cells. First we investigated the binding mode of the Ryk-ICD to  $\beta$ -catenin/FOXO3 complex to observe that this fragment forms a protein complex together with FOXO3 and  $\beta$ -catenin, suggesting that Ryk signaling is a co-regulator of FOXO3 under normal or pathological conditions. Analysis of direct FOXO3 targets in neural stem cells that express the normal or mutated huntingtin, with or without inhibition of *RYK* shows reprogramming of these targets with losses and gains in signaling pathways that are known to role in HD, including regulatory pathways of cell proliferation. These effects are promoted by a stronger FOXO3 link to the promoter and enhancer regions, and are partially dependent on Ryk. These results show that gene regulation by FOXO3 is heavily modified in cells expressing the mutant huntingtin and suggest a model in which FOXO3 can loose and gain biological properties that could promote neuronal differentiation although they are vulnerable constitutively by mutant huntingtin. These results open the way for a comprehensive study of cellular homeostasis mechanisms under the control of FOXO3 in neural differentiation and their impact on the activity of adult neurons. More broadly, these results provide insight into the molecular dynamics of MH and the effects of molecular reprogramming in differentiation and neuronal activity.

**KEY WORDS:** Huntington Disease, early stage, adaptive response, neuroprotection, FOXO3, neural stem cells

# Remerciements

Au terme de ce travail, je tiens à remercier l'ensemble des personnes qui ont pu contribuer de près ou de loin à son aboutissement.

Je souhaite au préalable remercier Madame Karine Mérienne et Monsieur Emmanuel Brouillet d'avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse. Je vous remercie pour le temps que vous avez accordé à sa relecture. Je remercie vivement Monsieur Frédéric Devaux pour la disponibilité et l'intérêt accordé à mon travail. Je remercie Madame Lisa Ellerby d'être venue jusqu'en France pour assister à ma soutenance.

Je souhaite remercier l'Association Huntington France qui m'a permis de bénéficier d'une bourse de thèse.

Je remercie mon directeur de thèse, Christian Neri de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et formé au fil du temps. Merci de m'avoir donné l'opportunité de travailler sur ce projet, de m'avoir fait confiance et m'avoir soutenu.

Je souhaite remercier aussi les membres de mon équipe sans qui tout cela ne serait pas devenu réalité :

- Francesca, merci pour tout. Tu as été un réel pilier pour moi tout au long de cette thèse et je te remercie pour tout ce que tu m'as appris et tous ces moments qu'on a pu passer ensemble en salle de culture, au microscope et en révélation notamment.

- Lucie, je te remercie de m'avoir aidée dès que tu le pouvais, pour ces heures de relecture à corriger les fautes encore et encore. Merci les filles pour tous ces débriefings autour de western blot, de qRT-PCR et de cellules souches. J'ai adoré travailler avec vous.

- François-Xavier et Satish merci pour toutes ces heures d'analyses informatiques. C'était un vrai plaisir de passer autant de temps au A5 avec vous.

Merci aux autres membres présents ou partis : Frédéric, Florian, Julien, Rafaël, Helissande, Erwan. Merci à mon équipe pour tous les moments partagés ensemble. Vous avez rendu cette thèse encore plus belle.

Merci à Lisa Ellerby de m'avoir gentiment accueillie au sein de son laboratoire et formée pendant ces 3 mois sur les cellules souches. Je remercie également Mahru, Ningzhe, Francesco et Dorina qui m'ont aidée pendant cette formation.

Je voudrais aussi remercier les habitants du bâtiment B 6 pour leur bienveillance.

- Pauline et Julie je vous remercie pour toutes ces pauses déjeuners, cafés, au soleil, sous la pluie à midi ou à 16h00.

- Merci à Josquin, Philippe, Eric, Benjamin, Maxime, Elodie, Ségolène pour ces moments partagés à l'arraché dans les couloirs.

Je souhaite remercier également mes amis et ma famille qui m'ont soutenue pendant toute la durée de ma thèse.

- Morane, c'est à mon tour de te remercier, merci pour tous ces moments qu'on a pu partager et qu'on va encore partager.

- Thomas, Lili, Maxime, la fine équipe. Merci pour tous nos moments le week-end quand je rentre à la maison et que vous êtes là. Vous avez réussi à me supporter et pour cela, chapeau bas.

- Danielle et Gilles, merci d'avoir toujours été là pour moi.

Merci à mes parents de m'avoir toujours soutenue dans mes choix. Merci pour ces samedis soir de détente dans le jardin, merci pour votre aide. Je n'aurais pas pu aller aussi loin sans vous. Vous avez et vous serez toujours là pour nous. Cette thèse, c'est un peu la nôtre au final.

Je remercie chaleureusement tout le reste de ma famille et amis qu'ils soient présents ou absents. Vous avez été là à un moment ou un autre : Tiphaine, Yasmine, Marion, Adèle, Barbara, Mikhaïl, Stéphane, Léa, Fanny, Cassandre, Philippe, Sabine, Colette, Jean.

J'ai sûrement oublié quelques personnes, mais c'est l'émotion qui me fait perdre la tête, sur ce, je vous souhaite une bonne lecture ou une bonne présentation.

# Table des matières

Résumé .....	3
Remerciements .....	5
Abréviations .....	8
Figures et Tableaux .....	9
Avant-Propos .....	11
<b>PARTIE I : Introduction Générale</b> .....	<b>12</b>
<b>Chapitre 1 - Maladie de Huntington</b> .....	<b>15</b>
1. Historique .....	16
2. Caractéristiques générales de la maladie de Huntington .....	18
3. Neuropathologie .....	21
<b>Chapitre 2 - Pathogénèse de la MH : Stress Cellulaire et Huntingtine</b> .....	<b>28</b>
1. Fonctions de la huntingtine normale .....	29
2. Huntingtine et répétitions CAG .....	35
3. Huntingtine normale <i>versus</i> huntingtine mutée .....	39
<b>Chapitre 3 - FOXO3 et Homéostasie Cellulaire</b> .....	<b>61</b>
1. <i>Forkhead</i> : Facteur de transcription hautement conservé .....	62
2. Facteurs de transcription FOXO3 .....	67
3. Régulation des FOXO par la voie Ryk .....	88
<b>Chapitre 4 - Cellules Souches Humaines et Modèle Neurodéveloppemental</b> .....	<b>98</b>
1. Cellules souches .....	100
2. Cellules souches pluripotentes induites ou iPSC .....	104
3. iPSC : modèle neurodéveloppemental .....	115
<b>PARTIE II : Etude de la voie Wnt/Ryk dans les phases précoces de la MH</b> .....	<b>120</b>
Introduction .....	121
Article 1 : The Wnt Receptor Ryk Reduces Neuronal and Cell Survival Capacity by Repressing FOXO Activity During the Early Phases of Mutant Huntingtin Pathogenicity. Cendrine Tourette, Francesca Farina, Rafael P. Vazquez-Manrique, Anne-Marie Orfila, <b>Jessica Voisin</b> et al., Plos Biol, 2014 .....	124
Discussion .....	143
<b>PARTIE III : Etudes des cibles transcriptionnelles de FOXO3</b> .....	<b>146</b>
Introduction .....	147
Article 2 : Reprogramming of FOXO3 targets in Huntington's disease neural stem cells alters the regulation of genes involved in cell cycle and neuronal differentiation. <b>Jessica Voisin</b> et al., .....	149
Discussion .....	184
<b>Discussion générale</b> .....	<b>190</b>
<b>Conclusion et perspectives</b> .....	<b>195</b>
<b>Références Bibliographiques</b> .....	<b>197</b>

# Abréviations

## Liste des abréviations récurrentes

<b>ADN</b>	Acide DésoxyriboNucléique
<b>ADNmt</b>	ADN mitochondrial
<b>AMPK</b>	AMP-activated protein Kinase
<b>ARN</b>	Acide Ribonucléique
<b>ARNm</b>	ARN messenger
<b>BDNF</b>	<i>Brain-Derived Neurotrophic Factor</i>
<b>Bim</b>	<i>Bcl-2-interacting mediator of cell death protein</i>
<b>CK1</b>	<i>Casein Kinase 1</i>
<b>CREB</b>	<i>c-AMP Responsive Element Binding protein</i>
<b>DDB1</b>	<i>Damage-specific DNA binding protein 1</i>
<b>FBHE</b>	<i>Forkhead Binding element</i>
<b>FKH</b>	<i>Forkhead</i>
<b>FOXO</b>	<i>Forkhead box protein subclass O</i>
<b>HAP1</b>	<i>HTT Associated Protein 1</i>
<b>HEAT</b>	Huntingtine, Facteur d'Elongation 3, Sous-unité régulatrice A de la protéine phosphatase 2A et TOR1
<b>HSB</b>	<i>Huntingtin Stress Bodies</i>
<b>HSP</b>	<i>Heat Shock Protein</i>
<b>HTT</b>	Protéine huntingtine
<b>IIS</b>	<i>insulin/IGF-1 signalling pathway</i>
<b>iPSC</b>	<i>Induced Pluripotent Stem cell</i> , Cellule souche pluripotente induite
<b>IRE1<math>\alpha</math></b>	<i>Inositol-requiring enzyme 1<math>\alpha</math></i>
<b>IT 15</b>	<i>Interesting Transcript 15</i>
<b>JNK</b>	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
<b>MA</b>	Maladie d'Alzheimer
<b>MFN2</b>	<i>Mitofusin 2</i>
<b>MH</b>	Maladie de Huntington
<b>mHTT</b>	Protéine huntingtine mutée
<b>MP</b>	Maladie de Parkinson
<b>MPT</b>	Modification post-traductionnelle
<b>MSN</b>	<i>Medium Spiny neurons</i> , neurones épineux moyens
<b>mTOR</b>	<i>mammalian Target Of Rapamycin</i>
<b>NES</b>	Signal d'Export Nucléaire
<b>PCr</b>	Créatine kinase / phosphocréatine
<b>PINK1</b>	<i>PTEN-induced kinase 1</i>
<b>polyP</b>	PolyProlines
<b>polyQ</b>	Polyglutamines
<b>Ryk</b>	<i>Receptor Tyrosine Kinase-related</i>
<b>Ryk-ICD</b>	<i>Ryk-Intra cellular Domain</i>
<b>SIR2</b>	<i>Silent Mating Type Information Regulation 2</i>
<b>SIRT1</b>	<i>SIR2 homolog</i>
<b>TCF</b>	Facteur de Lymphocyte

# Figures et Tableaux

## Listes des Figures

<b>Figure 1</b> : Danse de Saint Guy par Hendrik Hondius .....	16
<b>Figure 2</b> : George Huntington (1850-1916) .....	17
<b>Figure 3</b> : Représentation anatomique des ganglions de la base .....	23
<b>Figure 4</b> : Image macroscopique d'une tranche de cerveau issue d'un patient atteint de la maladie de Huntington (gauche) à côté d'un contrôle sain (droite).....	24
<b>Figure 5</b> : Représentation schématique des voies directes et indirectes des Ganglions de la Base ..	25
<b>Figure 6</b> : Image illustrant la structure de la protéine huntingtine .....	30
<b>Figure 7</b> : Représentation schématique des sites de modifications post-traductionnelles de la HTT..	32
<b>Figure 8</b> : Relation entre les répétitions du triplet CAG et l'âge d'apparition des premiers symptômes neurologiques dans la maladie de Huntington.....	35
<b>Figure 9</b> : Dérégulation des voies de transcription CREB et REST-NRSF .....	44
<b>Figure 10</b> : Résumé des principaux mécanismes par lesquels la mHTT provoque un dysfonctionnement mitochondrial.....	45
<b>Figure 11</b> : Schéma des mécanismes d'insuffisance métabolique et énergétique dans la MH.....	48
<b>Figure 12</b> : Perturbation du transport axonal dans la maladie de Huntington .....	50
<b>Figure 13</b> : Exemple d'altération synaptique dans la maladie de Huntington .....	56
<b>Figure 14</b> : Altération de l'autophagie dans la maladie de Huntington.....	58
<b>Figure 15</b> : Modèle pour la régulation de l'autophagie dans les protéinopathies .....	59
<b>Figure 16</b> : Structure tridimensionnelle du domaine <i>Forkhead</i> .....	63
<b>Figure 17</b> : Arbre phylogénétique partiel des facteurs de transcription FOX chez les chordés .....	64
<b>Figure 18</b> : Représentation de l'implication des facteurs de transcription FOXO .....	73
<b>Figure 19</b> : Equilibre pour le maintien des niches de cellules souches.....	75
<b>Figure 20</b> : Schéma représentant la voie ATM-FOXO3 dépendante .....	80
<b>Figure 21</b> : Régulation des voies apoptotiques par FOXO3.....	83
<b>Figure 22</b> : Mécanismes autophagiques dépendants de FOXO .....	86
<b>Figure 23</b> : Voies de signalisation Wnt. ....	91
<b>Figure 24</b> : Voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine canonique .....	93
<b>Figure 25</b> : Structure du récepteur Ryk .....	95
<b>Figure 26</b> : Différents stades de potence cellulaire. ....	102
<b>Figure 27</b> : Protocole de reprogrammation des fibroblastes humains.....	106
<b>Figure 28</b> : « Menu » de reprogrammation.....	112
<b>Figure 29</b> : Morphologie des différents types de cellules souches pluripotentes .....	114
<b>Figure 30</b> : Diagrammes de Venn des données d'expression des sites de liaison dans les cellules souches neurales humaines .....	185
<b>Figure 31</b> : Représentation des familles de motifs dans les cellules souches humaines .....	186
<b>Figure 32</b> : Modèle prédictif de la répression de la sénescence par des cibles directes de FOXO3. 193	

-----

**Tableaux:**

**Tableau 1** : Répartition de l'expression de la huntingtine dans les tissus nerveux et les tissus périphériques ..... 31

**Tableau 2** : Différents partenaires protéiques de la huntingtine ..... 34

**Tableau 3** : Diversité fonctionnelle retrouvée dans la famille des protéines FOX ..... 66

-----

**Liste des Boîtes:**

**Boîte n°1**: Perturbation du système des ganglions de la base dans la Maladie de Huntington..... 25

**Boîte n°2** : Modifications post-traductionnelles de la huntingtine..... 32

# Avant-Propos

« Aujourd'hui, en France, plus de 850 000 personnes sont touchées par la maladie d'Alzheimer ou une maladie apparentée, plus de 150 000 sont touchées par la maladie de Parkinson et plus de 85 000 par la sclérose en plaques. La prévalence de plus d'un million de personnes malades en France et la gravité de l'impact de ces maladies sur la qualité de vie des personnes malades et de leurs aidants, imposent une forte mobilisation ».

Ces phrases issues du plan Maladies Neurodégénératives mis en place en 2014 démontrent l'importance des maladies neurodégénératives dans notre société. Ces pathologies sont caractérisées par un dysfonctionnement progressif dû à des conjonctures sporadiques et/ou héréditaires. Parmi ces maladies, on trouve entre autre la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, la sclérose en plaques, la sclérose latérale amyotrophique, la maladie de Huntington et des maladies à prion. On estime que ces maladies touchent plus de 7 millions de personnes en Europe. Etroitement lié au vieillissement de la population et à l'allongement de la durée de vie moyenne pour la plupart, le nombre de personnes atteintes devrait doubler tous les 20 ans. Il en coûte actuellement près de 130 milliards d'euros par an pour prendre soin des personnes atteintes à travers l'Europe, soulignant le fait que les maladies neurodégénératives liées à l'âge représentent un challenge médical et sociétairer auquel nous devons faire face.

La recherche des causes et des mécanismes potentiels dérégulés dans les maladies neurodégénératives connaît un essor exponentiel encouragé par le développement de la génétique et des modèles d'études. Maladie neurodégénérative héréditaire, la maladie de Huntington est devenue un modèle d'étude pour comprendre la physiopathologie des maladies du cerveau associées à la production de protéines mal conformées et la physiopathologie de la neurodégénérescence.

Bien que de nombreux processus aient été mis en évidence, notamment plusieurs en commun avec les maladies de Parkinson et d'Alzheimer, ceux déterminant la dynamique des processus de dysfonction et de neurodégénérescence nous sont encore inconnus. De plus, nous ne savons toujours pas comment le cerveau parvient à résister aussi longtemps à la production de protéines mal conformées. Est-ce au travers de protéines présentant une toxicité modérée ? Est-ce que le cerveau présente des capacités de compensation et de résilience considérable ?

Il est donc important de comprendre quels sont les processus qui contribuent à la résistance neuronale et permettent aux neurones de faire face au stress induit par l'accumulation de protéines mal conformées.

## **PARTIE I : Introduction Générale**

La maladie de Huntington est une affection neurodégénérative à caractère autosomique dominant, caractérisée par des troubles moteurs, cognitifs et psychiatriques qui s'aggravent au cours du temps, jusqu'au décès, inévitable, de l'individu. Maladie rare, elle a un impact sociétal et humain conséquent. Bien que la mutation à l'origine de la maladie a été séquencée en 1993, il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement. De nombreux groupes de recherche de par le monde étudient les mécanismes à l'origine de la maladie ainsi que les éventuels traitements qui pourraient, tout du moins, ralentir l'évolution de la maladie.

Le but de ma thèse est de participer à l'amélioration de la compréhension des mécanismes biologiques et cellulaires dû à la présence de la huntingtine mutée. L'expansion de polyglutamines dans le gène qui code pour la protéine huntingtine est à l'origine de nombreux dysfonctionnements biologiques au travers notamment de la perturbation de l'interactome de la huntingtine et d'altérations transcriptionnelles ce qui peut conduire, entre autres à des altérations de l'autophagie, du transport axonal, de la fonction mitochondriale, de la transmission cortico-striatale ou encore la réponse au stress cellulaire.

Notre hypothèse au sein du laboratoire est qu'il existerait un équilibre entre mécanismes compensatoires et protéotoxicité ; plus précisément, les mécanismes de réponse au stress seraient déployés par la cellule pour contrecarrer le stress protéotoxique généré par la présence de la huntingtine mutée. Cet équilibre aurait un impact sur l'âge d'apparition de la maladie et la progression des symptômes. Des gènes modificateurs peuvent participer au maintien de cet équilibre. En effet, une forte hétérogénéité interindividuelle est retrouvée chez les patients Huntington : pour un même nombre de répétitions CAG, l'âge d'apparition de la maladie peut fortement varier. Cette variation est due à la présence de gènes modificateurs qui pourraient rendre certains individus très résistants au stress protéotoxique. Il est donc fortement intéressant de comprendre quels peuvent être les gènes qui participent à renforcer la capacité de résistance au stress protéotoxique des neurones dans la maladie de Huntington et notamment comment ils sont régulés. Cette altération de la réponse au stress se produirait bien avant l'apparition des premiers symptômes, très tôt dans la maladie, au cours notamment de la différenciation neuronale et aurait un impact sur le neurone adulte. Pour tester cette hypothèse, je me suis donc focalisée sur l'étude de FOXO3, un facteur de transcription et de réponse au stress impliqué dans la survie cellulaire et la longévité des tissus, et de ses cibles transcriptionnelles dans un modèle de la maladie de Huntington basé sur l'utilisation de cellules souches neurales humaines.

Dans un premier temps, je décrirai les caractéristiques générales de la maladie afin de replacer dans un contexte pathologique, à l'échelle de l'individu, les effets de la

huntingtine mutée. Nous y verrons les atteintes cognitives, motrices et psychiatriques dont souffrent les patients. Je décrirai également la neurodégénérescence qui touche le système nerveux central à l'origine des symptômes fondamentaux de la maladie, et également les atteintes non-neurales qui touchent l'ensemble de l'organisme.

Dans un second temps, nous irons cette fois-ci à l'échelle cellulaire et je passerai en revue certains des principaux mécanismes altérés dans la maladie et qui vont être à l'origine, entre autres, de la perturbation de l'homéostasie cellulaire.

Ensuite, nous verrons l'importance de la famille des facteur de transcription *Forkhead* et plus particulièrement celui de FOXO3 dans la régulation de l'homéostasie cellulaire afin de mieux cerner l'impact que représenterait l'altération des cibles transcriptionnelles de FOXO3 dans la MH. En effet, FOXO3 participe à la régulation de nombreux processus cellulaires tels que la régulation du cycle cellulaire, de la réponse antioxydante, de l'apoptose, de l'autophagie et de la synapse ; une reprogrammation éventuelle de ses cibles pourrait avoir des effets majeurs dans les cellules souches neurales humaines.

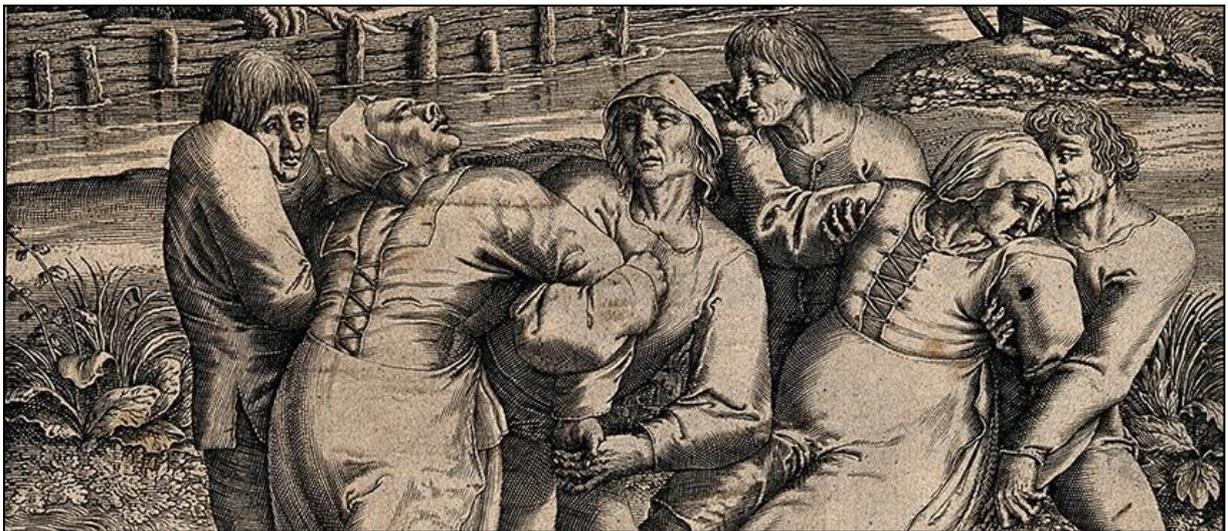
Enfin, dans la dernière partie de cette introduction, je présenterai le modèle cellulaire que j'ai utilisé durant ma thèse pour établir un répertoire des cibles humaines de FOXO3, à savoir des cellules souches neurales humaines dérivées de cellules souches pluripotentes induites elles-mêmes issues d'un patient atteint de la maladie de Huntington.

# **Chapitre 1 - Maladie de Huntington**

# 1. Historique

## 1.1. De Saint Vitus à Paracelse

Danse de Saint Guy ou encore Chorée, la maladie de Huntington (MH) est une des maladies rares les plus répandues en France. Les premiers faits relatés la concernant remontent à Saint Vitus, ou Saint Guy, qui selon la légende, aurait supplié Dieu d'épargner de toute affection choréique ou convulsante, les individus qui célébreraient l'anniversaire de sa mort. Devenu Saint Patron de Bohème grâce à Charles IV, Saint Vitus fut donc classé parmi les 14 saints à implorer lorsque l'on était malade. Son culte fut associé à un rituel de purification par le feu qui n'est pas sans rappeler Salem, sa chasse aux sorcières et ses bûchers subis par les personnes possédées.



**Figure 1 : Danse de Saint Guy par Hendrik Hondius** (D'après l'œuvre de Pieter Breughel-Wellcome Library, London; CC BY).

La véritable histoire médicale de la MH commence au début du deuxième millénaire, lorsqu'en Rhénanie Germanique apparaît un mal étrange caractérisé par un besoin impérieux et irrésistible de danser (**Figure 1**). De nombreux épisodes épidémiques s'en suivirent, notamment celui qui se produisit à Aix la Chapelle en 1374 où d'immenses processions de « danseurs » allaient d'une ville à l'autre. Depuis, il a été admis que ces manifestations n'étaient pas fondées sur une base biologique mais seraient dues à un phénomène d'hystérie générale. Issu du latin « chorus » et du grec « choros » Paracelsus (1493-1541) fut le premier à utiliser le terme de « chorée » pour désigner ces mouvements involontaires et imprévisibles semblables à des danses, qui parcouraient un individu, tout en suggérant une origine du système nerveux centrale (SNC).

## 1.2. De George Huntington à Nancy Wexler

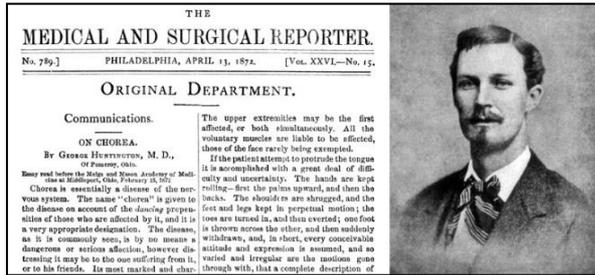


Figure 2 : George Huntington (1850-1916).

La première description médicale a été réalisée en 1872 par un jeune médecin américain, George Huntington (**Figure 2**). Fraîchement diplômé, le Dr Huntington décrit, dans son manuscrit *On Chorea* (Huntington, 1967) les différentes manifestations choréiques qui lui ont été données d'observer ; et notamment une chorée qu'il qualifie de « chorée héréditaire » et qu'il expose en trois points :

- 1) **La maladie est génétique et héréditaire** : Lorsqu'une personne est atteinte, elle transmettra la maladie à sa descendance. De plus, le Dr Huntington souligne le caractère dominant de la maladie puisque celle-ci ne peut sauter une génération.
- 2) **Le malade présente des désordres d'ordre psychiatrique et cognitif**. Le Dr Huntington fait état dans son rapport de patients présentant des signes de désinhibition, de démence et de tendance suicidaire qui s'aggravent au cours du temps.
- 3) **La maladie se déclare à l'âge adulte par une atteinte motrice** : Le Dr Huntington rapporte que la maladie se déclare toujours entre 30 et 40 ans et que tous les patients présentent des mouvements involontaires qui touchent graduellement tous les muscles du corps jusqu'à la mort du patient.

George Huntington a mis ainsi en relief au cours du 19ème siècle les trois composantes essentielles de la MH : génétique, motrice et cognitive.

Il faudra ensuite attendre plus d'un siècle pour déterminer l'origine génétique de la MH. C'est dans les années 1950 que le Dr Amerigo Regrette diagnostiqua près du lac Maracaibo au Venezuela une large communauté de personnes atteintes de la MH. En analysant les marqueurs génétiques de ces familles, Nancy Wexler et le groupe de James Gusella déterminèrent, en 1983, que le gène impliqué dans la MH se situait sur l'extrémité du bras court du chromosome 4 (Gusella et al., 1983).

Il faudra 10 années supplémentaires pour qu'en 1993 *The Huntington Disease Collaborative Research Group* (HDCRG) identifie le fragment 4p16.3 comme le site de la mutation. Ce nouveau gène, *IT15* (*Interesting Transcript 15*), présentait un polymorphisme

au niveau des répétitions CAG ainsi qu'une région codante plus ou moins grande et instable, et était présent sur au moins un des chromosomes des 75 familles examinées. Le locus du gène responsable de la MH long de 180kb, constitué de 67 exons et codant pour une protéine encore inconnue, d'environ 350 Kba, la huntingtine (HTT) venait d'être percé à nu (HDCRG, 1993).

## **2. Caractéristiques générales de la maladie de Huntington**

A l'heure actuelle, la MH est un modèle pour l'étude des maladies neurodégénératives. C'est une maladie monogénique à pénétrance complète héréditaire. Progressive, elle est caractérisée génétiquement par un nombre élevé et anormal de répétitions CAG dans l'exon 1 du gène qui code pour la huntingtine et conduit à la production de huntingtine mutée avec un domaine polyglutamine (polyQ) de longueur anormalement élevée qui perturbe la maturation, la fonction et la dégradation de la protéine. La neurodégénérescence, qui est restreinte à quelques catégories de neurones du système nerveux central dans la MH, se traduit par une importante atrophie du striatum. Cette neurodégénérescence entraîne des symptômes moteurs, psychiatriques et cognitifs très invalidants qui apparaissent à l'âge adulte et aboutissent invariablement à la mort après une évolution d'une durée moyenne de quinze à vingt ans. Au cours des prochains paragraphes, nous tâcherons de développer les principales composantes décrites par George Huntington qui caractérisent la MH.

### **2.1. Manifestation et diagnostic**

La prévalence de la maladie apparaît assez hétérogène à travers le monde. Elle est de 5,70 pour 100 000 individus en Amérique du Nord, en Europe et en Australie contre 0,40 pour 100 000 en Asie. La différence géographique dans la prévalence peut être largement expliquée par l'accès au soin ou les haplotypes des gènes (Pringsheim et al., 2012).

La MH peut se déclarer à n'importe quel âge mais la plupart des patients déclarent la maladie entre 35 et 55 ans. L'âge d'apparition est inversement proportionnel à la longueur de l'expansion CAG, avec des formes juvéniles pour les plus grandes longueurs. Il existe par ailleurs des phénomènes d'anticipation, avec une augmentation de la longueur des répétitions CAG au cours des générations. La condition du malade progresse et empire pendant environ 10 à 25 ans jusqu'au décès, inévitable. Le diagnostic d'un individu ayant un parent atteint de la MH est établi rapidement au travers des symptômes et des signes cliniques, même si un tableau symptomatique non spécifique peut être trompeur. Seuls les critères cliniques sont nécessaires pour établir le diagnostic ; ils comprennent les

changements de comportements (cognitifs, psychiatriques et moteurs) recoupés avec l'histoire familiale.

Cependant si les parents ne sont pas reconnus comme étant porteur de la mutation ou sont décédés avant l'apparition des symptômes à un plus jeune âge d'une toute autre cause, le tableau clinique peut être difficile à reconnaître. Il est alors nécessaire de réaliser un test génétique montrant une répétition des polyQ supérieur à 36 sur le chromosome 4 pour valider le diagnostic. Ce test peut être effectué à différents stades de la vie de l'individu avec des critères d'exclusion (individu âgé de moins de 18 ans, atteinte psychiatrique ou pression extérieure subi par l'individu) au vu de l'issue fatale de la maladie (Maat-Kievit et al., 1999).

Les nombreux symptômes sont classés en 3 catégories que nous allons détailler brièvement dans les paragraphes suivant.

## **2.2. Symptômes moteurs**

Les symptômes physiques sont généralement les premiers à être remarqués puisque les symptômes psychiques et cognitifs ne sont généralement pas assez graves pour être reconnus lors des phases précoces. Le symptôme le plus caractéristique et le plus invalidant de la maladie est la chorée. La *World Federation of Neurology* la définit comme la «succession de mouvements spontanés excessifs, abrupts, imprévisibles et irréguliers». Ce sont des mouvements anormaux et involontaires qui s'apparentent à une simple exagération des gestes en début de maladie avant d'évoluer vers des mouvements continus violents et handicapants. Elle est aggravée, comme la majorité des symptômes neurologiques, par la fatigue, le stress, l'émotion et la fièvre. A ces mouvements imprévisibles et explosifs s'associent d'autres troubles moteurs tels qu'une perte du contrôle des muscles faciaux, des parties distales des membres, puis du thorax (Folstein 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. Après une phase croissante puis un plateau, l'atteinte choréique décline face à la lenteur inégale des mouvements (bradykinésie), aux contractions musculaires involontaires (dystonie) et à 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 (dysphagie) et de diction (dysarthrie). Ces difficultés, combinées à un désordre métabolique, causent une forte perte de poids qui évoluera vers la cachexie.

### **2.3. Symptômes cognitifs**

Chez les patients encore asymptomatiques, le déclin cognitif précède d'au moins 15 ans l'apparition des premiers symptômes moteurs (Lemiere et al., 2002; Paulsen, 2011). La détérioration cognitive est d'abord discrète puis s'enrichit de nombreux symptômes dont l'évolution est patient-dépendant (Ho et al., 2003). La MH ne perturbe pas les fonctions intellectuelles mais perturbe les fonctions cognitives qui se retrouvent diminuées progressivement. Durant les phases précoces de la maladie, des dysfonctions cognitives au niveau de l'attention, la concentration, la visualisation spatiale, le contrôle des émotions et de la mémoire, deviennent de plus en plus apparents (Montoya et al., 2006).

Un déclin des fonctions exécutives est observé : altération de la conscience de soi, de la hiérarchisation et de l'organisation des idées et des actes. Les fonctions exécutives ont un impact dans la vie quotidienne des patients qui éprouvent alors des difficultés à planifier leurs activités, à s'adapter à des changements imprévus et à interagir avec les autres individus. Les malades éprouvent des difficultés à vivre une gamme d'émotions subtiles, à avoir un autre point de vue, à percevoir leurs erreurs et être conscients de leur handicap ce qui impacte fortement sur leurs capacités à créer des relations sociales et personnelles. L'évolution de la maladie instaure par la suite des troubles mnésiques affectant les mémoires à court terme, à long terme, autobiographique, procédurale et de travail (Montoya et al., 2006). Les troubles cognitifs ont tendance à s'aggraver au fil du temps, conduisant finalement à la démence.

### **2.4 Symptômes psychiatriques**

A l'inverse des troubles moteurs et cognitifs, les troubles psychiatriques sont rarement inauguraux mais fluctuent et peuvent apparaître à n'importe quel moment pendant l'évolution de la maladie. Les patients MH présentent, par période, des troubles du comportement caractérisés par une impulsivité (exhibitionnisme), irritabilité, agressivité qui sont à l'origine de problèmes relationnels. Ces troubles s'accompagnent d'une apathie générale modifiant leur personnalité et rendant l'aide de leurs proches d'autant plus difficile. En parallèle, les patients souffrent fréquemment de dépression (Paulsen et al., 2005). Cet état dépressif s'accompagne souvent d'anxiété et de troubles du sommeil qui se transforment en mélancolie, conduisant parfois au suicide. Enfin, la démence choréique fait suite aux troubles mnésiques, à la perte de concentration, aux troubles de jugement et s'accompagne d'une recherche perpétuelle de nourriture (boulimie).

### 3. Neuropathologie

La neurodégénérescence est un processus qui est précédé par des phénomènes de dysfonction neuronale et qui conduit à l'involution lente des neurones avec une perte progressive des synapses, des épines dendritiques, des branches dendritiques, des segments axonaux et des ressources cytoplasmiques tels que les mitochondries et les organites impliqués dans la biosynthèse, la modification, le transport et la dégradation des molécules cellulaires. Le processus de neurodégénérescence se termine par la mort cellulaire, et les neurones morts ou mourants *in situ* peuvent provoquer des réactions inflammatoires locales et éventuellement aggraver les conditions dans leur voisinage immédiat. Parce que le neurone existe pour en influencer un autre, ainsi que sa périphérie, le processus de neurodégénération peut affecter profondément les réseaux neuronaux ainsi que les aspects neurochimiques, électrophysiologiques et trophiques qui régissent la communication et la régulation neuronale qui assure la fonction neuronale et *a fortiori* neurologique.

L'évolution progressive des symptômes dans la MH est clairement causée par l'effet d'une neurodégénérescence localisée et sélective dans une région particulière. Il est de tradition d'attribuer l'ensemble des symptômes neurologiques de la MH à la dégénérescence neuronale qui survient dans le circuit des ganglions de la base (GB) et plus particulièrement au niveau du striatum (Ferrante et al., 1997). Et bien que l'atrophie du striatum soit sans aucun doute à l'origine des premiers symptômes de la MH (chorée), une perte neuronale marquée est observée dans d'autres régions du cerveau et est à relier aux phénotypes connus de la MH. Les techniques de neuro-imagerie actuelles ont montré une atrophie corticale précoce, hétérogène, progressive et fortement corrélée aux symptômes de la maladie (Rosas et al., 2002; Rosas et al., 2005). En fait, les phénomènes d'atrophie existent avant l'apparition des principaux symptômes de la maladie (Paulsen, 2010), et il est de plus en plus probable que des symptômes plus discrets et plus difficiles à diagnostiquer, notamment sur un plan cognitif voire métabolique ou affectif, soient associés aux phénomènes de dysfonction des neurones et des réseaux neuronaux, avant ou en même temps que la neurodégénérescence (Duff et al., 2010).

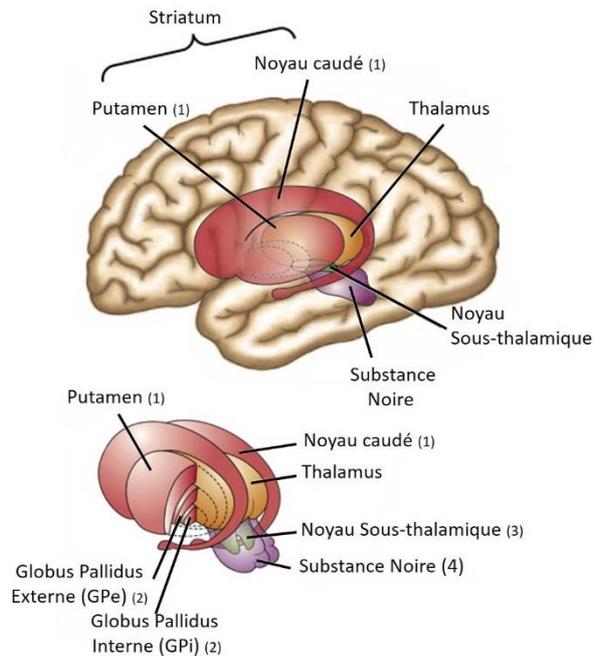
Afin de bien positionner le rôle de la neurodégénérescence dans la déclaration de la MH, les paragraphes suivants décrivent l'organisation structurale des GB, la fonction du striatum au sein des GB et enfin la corrélation entre symptômes et perte neuronale.

### 3.1. Anatomopathologie

La partie du cerveau la plus affectée par la MH est un groupe de cellules nerveuses situées à la base du cerveau appelé communément les ganglions de la base. Le système des GB interviendrait pour la programmation et le contrôle des mouvements et joue un rôle dans la cognition, l'humeur et les comportements non moteurs.

Les GB sont constitués du striatum (noyau caudé et putamen) et le globus pallidus (subdivisé en un segment interne (GPi) et un segment externe (GPe)). Deux autres structures sont étroitement associées aux fonctions motrices des GB : le noyau sous-thalamique (NST) ainsi que la substance noire *pars compacta* (SNc) et *pars reticulata* (SNr). Ces différentes régions sont interconnectées par de multiples boucles complexes et étroitement reliées au cortex et au thalamus (**Figure 3**).

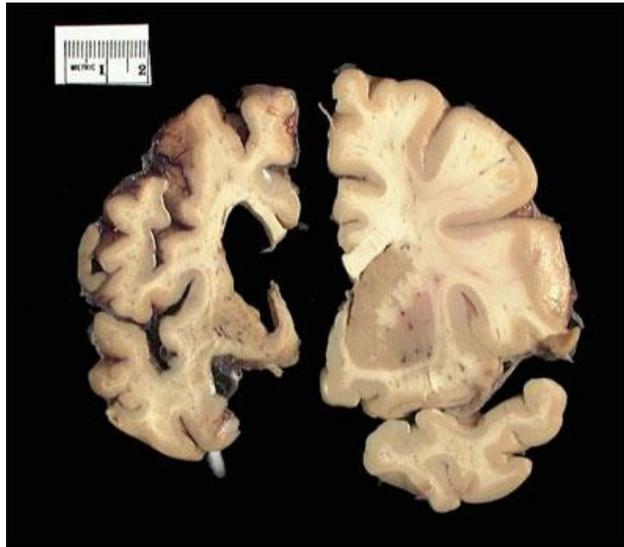
C'est la perte graduelle des neurones GABAergiques épineux moyes ou *Medium Spiny* (MSN) du neostriatum, accompagnée de l'atrophie progressive du striatum (**Figure 4**) et du GPe, qui est la caractéristique la plus précoce et la plus marquée de la MH (Bamford et al., 1995). La dégénération des neurones striataux suit un ordre anatomique précis : la dégénération commence dans la queue du noyau caudé, s'étend au niveau de la tête pour terminer vers le putamen. La neurodégénérescence évolue progressivement et touche, aux stades tardifs de la maladie, le cortex cérébral, au niveau des couches III, V et VI, dont les neurones se projettent sur le striatum (Hedreen et al., 1991; Peschanski et al., 1995). La dégénérescence neuronale conduit chez les patients MH à une diminution du volume cérébral d'environ 20 à 30%. Les techniques d'imagerie cérébrales ont permis de détecter une atrophie du striatum et du cortex précédant parfois l'apparition des premiers signes cliniques (Aosaki et al., 1994; Vonsattel and DiFiglia, 1998). Notamment, l'étude TRACK-HD, réalisé sur 3 ans, a permis le suivi de patients Huntington et montre précisément l'évolution de la maladie en fonction du nombre de CAG et de l'âge (Tabrizi et al., 2011; Tabrizi et al., 2012; Tabrizi et al., 2013).



**Figure 3 : Représentation anatomique des ganglions de la base.** (1) Le striatum constitué du noyau caudé et du putamen, (2) les globus pallidus interne (GPI) et externe (GPe), (3) le noyau sous thalamique, (4) la substance noire (Modifié à partir de Principles of Animal Communication, par Jack W. Bradbury & Sandra L. Vehrencamp).

De nombreuses données suggèrent aussi un rôle de la glie dans les mécanismes pathogéniques de la MH. En effet, une réactivation des microglies, qui peut contribuer à la mort neuronale dans le cadre des maladies neurodégénératives, apparaît dans le striatum et dans le cortex pendant les phases précoces et les phases tardives de la maladie, réactivation non retrouvée dans les analyses de cerveau d'individus sains *post-mortem* (Sapp et al., 2001). Les microglies activées sont aussi présentes dans le GP et la matière blanche attenante dans le cerveau. De plus on observe une augmentation des astrocytes et oligodendrocytes activés dans le striatum (Vonsattel et al., 1985; Rajkowska et al., 1998).

Le système de classement le plus couramment utilisé pour évaluer la gravité de la dégénérescence dans la MH est basé sur des critères macroscopiques et microscopiques développés par Jean Paul Vonsattel en 1985. Il est fondé sur la dégénérescence striatale dans les tissus *post-mortem* et classe les cas de MH en cinq classes de gravités différentes allant de 0, en tant que neuropathologie non discernable, à 4, avec 95% de perte neuronale dans le noyau caudé (Vonsattel et al., 1985; Squitieri et al., 2000).



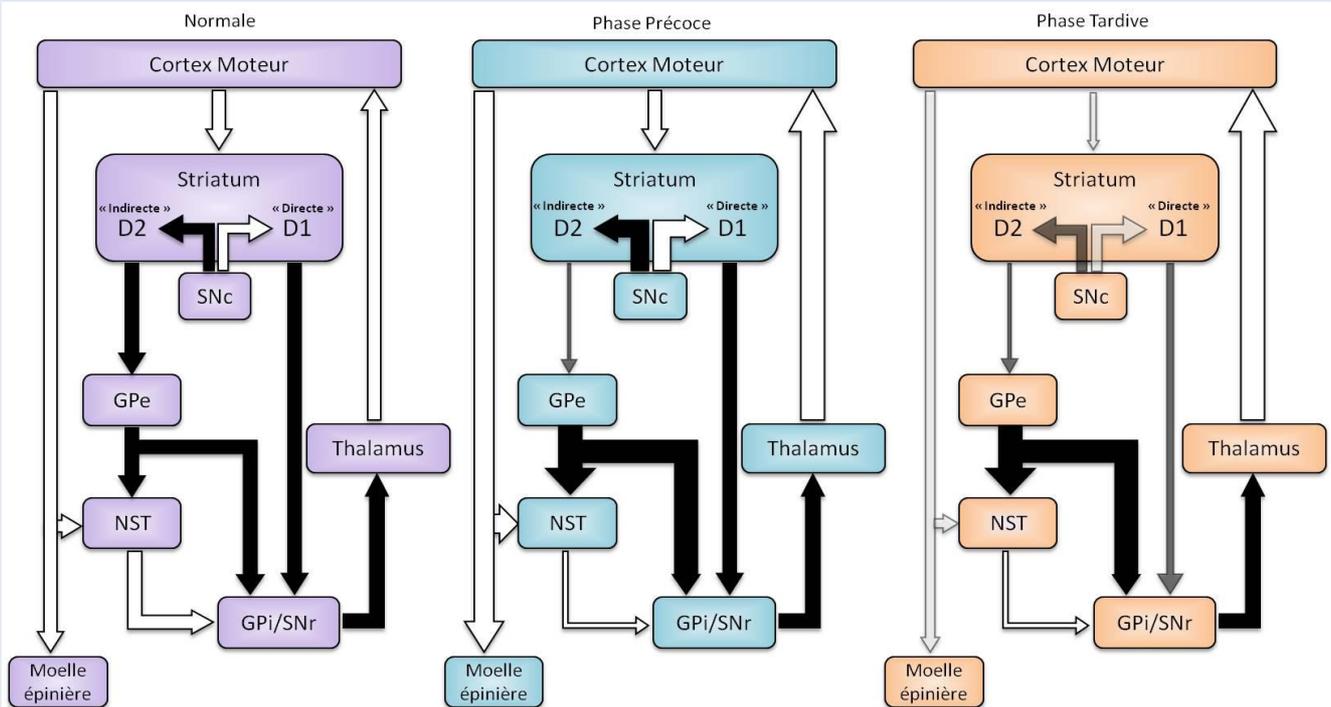
**Figure 4 : Image macroscopique d'une tranche de cerveau issue d'un patient atteint de la maladie de Huntington (gauche) à côté d'un contrôle sain (droite).** On peut noter la sévère atrophie du striatum chez le patient MH ainsi qu'une atrophie du cortex cérébral (Source : Harvard Brain Tissue Resource Center).

### **3.2. Dégénérescence du striatum et symptômes moteurs**

Le striatum représente l'entrée principale du système des ganglions de la base qui comme nous l'avons vu participent à la programmation et au contrôle du mouvement entre autre. Une étude approfondie révèle que la neurodégénérescence striatale n'est pas homogène. En effet, le striatum est composé à 95% de MSN, des neurones inhibiteurs GABAergiques de deux types en fonction des différents peptides qu'ils contiennent : MSN de type D1 et MSN de type D2. Il y a d'une façon certaine une dégénérescence sélective des MSN qui apparaissent comme les neurones les plus sensibles à la pathologie (McGeer et al., 1977; Graybiel, 1995; Rajkowska et al., 1998; Nopoulos et al., 2010) en comparaison aux larges interneurones cholinergiques striataux et les interneurones GABAergiques non épineux (somatostatine, neuropeptide Y, NADPH-diaphorase), largement minoritaires dans le tissu et qui semblent, au moins transitoirement, épargnés (Beal et al., 1993; Schmid et al., 1994; Xu et al., 1994; Rajkowska et al., 1998).

Dans la MH, ce sont les neurones MSN de type D2 qui dégèrent les premiers et conduisent à une augmentation des mouvements involontaires (hyperkinesie - chorée). Puis, progressivement, les neurones de type D1 dégèrent à leur tour, conduisant à l'hypokinésie que l'on retrouve aux stades tardifs de la maladie (Voir la **Boîte n°1** pour plus de détails sur ce mécanisme).

### Boîte n°1: Perturbation du système des Ganglions de la Base dans la Maladie de Huntington



**Figure 5 : Représentation schématique des voies directes et indirectes des Ganglions de la Base chez un individu sain et chez un patient atteint de la maladie de Huntington.** Les flèches blanches symbolisent les voies excitatrices et les flèches noires, les voies inhibitrices (D'après Current Opinion in Neurology, 1998).

Les principales afférences du striatum sont issues du cortex, du thalamus et de la substance noire *pars compacta*. Les afférences corticales sont issues des régions associatives frontales et pariétales (cortex secondaire) et sont excitatrices glutamatergiques (Graybiel et al., 1994). Les afférences thalamiques sont issues principalement des noyaux intralaminaires et de natures glutamatergiques (Aosaki et al., 1994; Warby et al., 2005). Les afférences modulatrices provenant de la substance noire *pars compacta* sont de natures dopaminergiques (Glass et al., 2000; Warby et al., 2005).

La conception actuelle du circuit moteur dans les GB fait état de deux voies distinctes et antagonistes selon leur cible et leur sensibilité à la dopamine. On distingue la **voie directe** de la **voie indirecte**. La **voie directe** implique les MSN de type D1 et sert à lever l'inhibition tonique des neurones moteurs corticaux ou colliculaires. Elle relie les MSN du noyau caudé et du putamen au GPi et à la SNr. Cette voie est activatrice par désinhibition du thalamus. La **voie indirecte** sert, quant à elle, à augmenter le niveau de l'inhibition tonique. Elle relie les MSN de type D2 au GPe. Ce dernier projette à la fois sur le GPi et le noyau sous-thalamique (neurones excitateurs) qui projette en retour sur le GPi et la SNr. La voie indirecte freine les effets normaux de la voie directe (**Figure 5**).

### 3.3. Au-delà du cerveau : les atteintes non neurales

La majorité des recherches concernant la maladie de Huntington sont focalisées sur l'étude des effets de la HTT mutée sur le cerveau pour des raisons évidentes : les symptômes fondamentaux tels que les déficits moteurs, cognitifs et psychiatriques sont liés au dysfonctionnement et à la neurodégénérescence des structures cérébrales décrites précédemment.

Cependant, la HTT est une protéine ubiquitaire exprimée dans l'ensemble de l'organisme et des études récentes ont montré que de nombreux symptômes comme la perte de poids ou la perte des muscles squelettiques, que l'on pensait secondaire à la MH (Sturrock and Leavitt, 2010), ou alors conséquent à la dégénérescence neuronale, sont en réalité causés par un effet direct de la mHTT dans les tissus périphériques. Le système immunitaire périphérique semble tout particulièrement affecté, comme l'indique la présence de perturbations mitochondriales dans les lymphocytes et la suractivité des monocytes après stimulation (Kwan et al., 2012).

De nombreux marqueurs de l'inflammation tels que des cytokines pro-inflammatoires ou encore des chimiokines sont présents dans les échantillons de sang issus de patients (Bjorkqvist et al., 2008). Fait intéressant, quand on greffe la moelle osseuse d'une souris non malade vers une souris MH irradiée, qui permet de remplacer efficacement le système immunitaire, on peut observer une légère amélioration de la pathologie dans le cerveau ainsi qu'une normalisation des niveaux de cytokines périphériques (Kwan et al., 2012). Ces informations confirment l'aspect cellule autonome de la mHTT dans les cellules du système immunitaire, et dans bien d'autres types de population.

Les perturbations transcriptionnelles et énergétiques qui sont caractéristiques des neurones dans la MH sont aussi retrouvées dans la plupart des types cellulaires, ce qui suggère que la MH n'est pas seulement une maladie du cerveau mais aussi une maladie 'systémique'. La HTT apparaît essentielle pour de nombreux tissus. Chez des souris *knock-out*, l'absence de HTT conduit à des défauts au sein des trois feuilletts embryonnaires et mène à une létalité embryonnaire (Zeitlin et al., 1995). Il n'est donc pas étonnant de constater que la présence de la mHTT dans les tissus non neuronaux entraîne de graves défauts systémiques. On peut donc lister les anomalies suivantes : perte de poids (conduisant à la cachexie) (Sanberg et al., 1981; Stoy and McKay, 2000; Robbins et al., 2006), atrophie des muscles squelettiques, insuffisance cardiaque, atrophie testiculaire, ostéoporose, dysfonctions métaboliques et endocriniennes, aberrante migration des cellules immunitaires.

Il ne serait pas étonnant que certaines perturbations des tissus périphériques comme la perte de poids ou bien les altérations que l'on retrouve dans le système circulant puissent être utilisées un jour comme des biomarqueurs de la maladie. En effet, à l'inverse de certaines maladies neurodégénératives, chaque patient porteur de la mutation développera la maladie, ce qui laisse supposer que ces altérations offrent une possibilité de détecter les premiers changements qui se produisent au cours de la MH. On voit là l'importance d'une caractérisation clinique fine de la maladie, à l'aide d'échelles validées et précises.

La MH est une maladie qui atteint principalement le système nerveux central. La mHTT perturbe notamment l'équilibre physiologique des neurones, et modifie leur capacité à répondre au stress cellulaire, conduisant progressivement à la mort neuronale. De plus, comme nous venons de le voir, la mutation de la protéine Huntingtine peut affecter l'ensemble de l'organisme et entraîner des aberrations cellulaires et tissulaires.

## **Chapitre 2 - Pathogénèse de la MH : Stress Cellulaire et Huntingtine**

Une grande majorité des recherches concernant la MH est centrée sur l'étude des effets de la mHTT sur le cerveau. La HTT est une protéine ubiquitaire qui est retrouvée dans l'ensemble de la cellule et de l'organisme. A la fois présente dans le cytoplasme, le noyau, la membrane cellulaire, ses fonctions sont multiples et variées : apoptose, développement embryonnaire, trafic vésiculaire, régulateur transcriptionnel, grand nombre de ses fonctions sont altérées suite à l'apparition de répétitions polyQ au sein de sa structure.

La maladie de Huntington fait partie de la grande famille des maladies à répétition de triplets nucléotidiques. Ce sont des maladies génétiques dues à une expansion de séquences répétées de triplets nucléotidiques au-delà d'un seuil caractérisant le nombre maximal de répétitions trouvées dans la population normale. Ces mutations, qui ont la particularité d'être instables, ont été décrites dans la chorée de Huntington (triplet CAG), le syndrome de l'X fragile (triplet CGG), la dystrophie myotonique de Steinert (triplet CTG), la maladie de Friedreich (triplet GAA), l'atrophie spinobulbaire de Kennedy (triplet CAG), les ataxies spino-cérébelleuses autosomiques dominantes (triplet CAG) et l'atrophie dentatorubro-pallido-luysienne (triplet CAG) (Budworth and McMurray, 2013).

Pourquoi des protéines avec répétition de polyglutamines entraînent-elles une toxicité systémique ? Pourquoi tuent-elles préférentiellement les neurones dans des régions particulières du cerveau, et est-ce lié à l'interactome de ces protéines mutées ? Comment le cerveau et l'organisme s'adaptent-t-ils au stress protéotoxique, et quelles en sont les grandes lois et les grands effets ? La pathogenèse de la MH est-elle un processus programmé, dès le développement du cerveau avec des effets persistants qui seraient au cœur des phases adultes ? Des questions encore peu résolues mais à l'origine de nombreux travaux de recherches en modélisation informatique et biologique qui informent sur leurs effets sur la synapse, le trafic vésiculaire, le métabolisme énergétique ou encore et pour ce qui nous concerne la dynamique de la réponse au stress.

Dans le paragraphe suivant, nous décrirons les fonctions de la huntingtine, normale et mutée, et comment la présence de l'expansion CAG perturbe la physiologie cellulaire.

## **1. Fonctions de la huntingtine normale**

### **1.1. Etude de la structure**

La huntingtine pleine longueur est une protéine de haut poids moléculaire (348 kDa - 3144 acides aminés en comptant 23 répétitions CAG). De par sa grande taille, il est à l'heure actuelle impossible de générer une analyse cristallographique de la HTT pleine longueur. Bien que la structure de nombreux de ces domaines ait été décrite, peu de motifs connus



Région	Niveau d'expression
<b>Cerveau</b>	
Cervelet	Elevé
Cortex	Elevé
Substantia Nigra Pars compacta	Moyen
Putamen	Faible
Noyau Caudé	Faible
Thalamus	Faible
<b>Tissus Périphériques</b>	
Testicules	Elevé (surtout spermatogonies immatures)
Colon	Faible
Foie	Faible
Pancréas	Faible

**Tableau 1 : Répartition de l'expression de la huntingtine dans les tissus nerveux et les tissus périphériques.**

De nombreuses modifications post-traductionnelles (PTM) peuvent affecter la HTT et réguler sa stabilité, sa localisation ou encore sa fonction. On liste des sites de clivages protéolytiques, l'ubiquitylation la phosphorylation, la sumoylation, l'acétylation et la palmitoylation (Voir Box 2) fragments N-terminaux, portant le domaine de répétitions polyQ, issus des divers clivages, sont retrouvés dans les agrégats et on leur confère un caractère toxique supérieur à la mHTT non clivée (Kuhn et al., 2007; Tebbenkamp et al., 2011).

De ce point de vue, on peut considérer que la MH est causée par un gain de fonction toxique par rapport à la HTT non mutée, les agrégats constituant une réponse cellulaire à la toxicité des fragments de mHTT (Zuccato et al., 2010; Labbadia and Morimoto, 2013). Néanmoins, on ne peut exclure la perte de fonction normale de la protéine normale comme mécanisme conduisant à la MH (Schulte and Littleton, 2011) (voir le paragraphe Gain de propriétés toxiques).

## Boîte n°2 : Modifications post-traductionnelles de la huntingtine

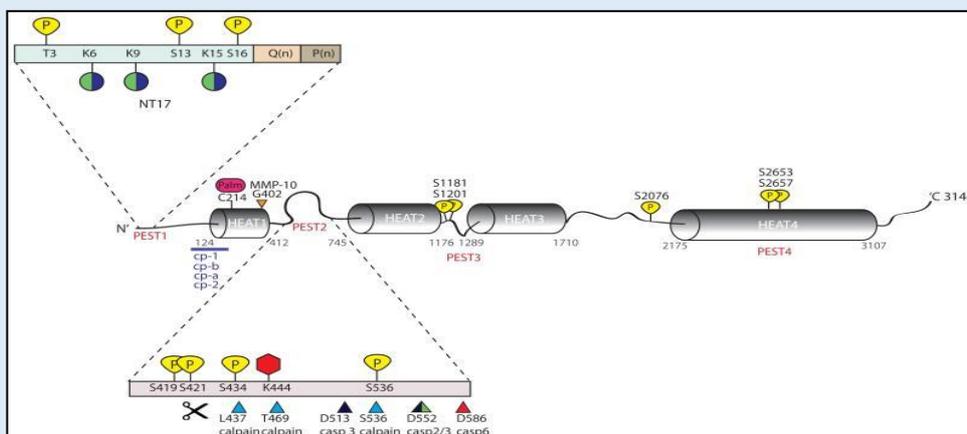


Figure 7 : Représentation schématique des sites de modifications post traductionnelles de la HTT.

**Les sites de clivage protéolytique** génèrent des fragments N-terminaux de tailles différentes. Les cibles de ces sites de clivages sont des protéases telles que des caspases (caspases 2,3 et 6) (Wellington et al., 1998; Wellington et al., 2000; Kim et al., 2001; Hermel et al., 2004), des calpaïnes (Gafni and Ellerby, 2002) et des metalloprotéinases matricielles (MMP10) (Miller et al., 2010). La HTT non mutée et la mutée sont les cibles de ces caspases bien que la mHTT semble plus sensible aux clivages et que ses fragments se retrouvent dans le noyau et dans le cytoplasme ; fragments qui sont maintenant associés au développement progressif de la MH.

**L'ubiquitinylation** se fait sur les lysines de la partie N-terminale K6, K9 et K15 ; et conduit à la dégradation de la protéine par le protéasome (Kalchman et al., 1996; DiFiglia et al., 1997) L'ubiquitinylation contrôle la stabilité, la fonction et la localisation intracellulaire de la HTT ce qui contribue à maintenir l'homéostasie de la HTT dans la cellule. Quand la HTT est mutée, ce processus est altéré induisant une dysfonction du protéasome et une accumulation de fragments de HTT qui deviennent toxiques pour le neurone.

**La phosphorylation** intervient sur la sérine 421 (par AKT et par la protéine kinase B) et les sérines -431 -1181 et -1201 (par CDK5) (Humbert et al., 2002; Rangone et al., 2004) qui réduit le clivage de la HTT par les caspases et atténue la formation d'agrégats et la toxicité (Luo et al., 2005).

**La sumoylation** des 3 lysines K6 K9 K15 situées dans la partie N-terminale de la HTT, renforce la neurodégénération dans le modèle drosophile de la MH (Steffan et al., 2004).

**L'acétylation** de la HTT a été identifiée sur la sérine 444 et influence directement la HTT en facilitant son transport au travers des autophagosomes ce qui améliore la clairance autophagique de la mHTT et contrebalance l'effet de la mHTT dans les cultures de neurones striataux et corticaux primaire (Jeong et al., 2009).

**La palmitoylation** de la HTT s'effectue sur la cystéine C214 par les palmitoyl S-acyltransférases HIP14 et HIP14L (Yanai et al., 2006; Huang et al., 2010). Une étude récente montre que la HTT agit comme un modulateur de l'activité de HIP14 et en présence de la mHTT, HIP14 est moins actif. L'expansion CAG de la mHTT diminue l'interaction entre la HTT et HIP14/HIP14L résultant en une diminution de la palmytoylation des substrats de HIP14/HIP14L, une augmentation des inclusions et un renforcement de la toxicité neuronale

## 1.2. Interactome de la huntingtine

De par son implication dans de nombreux processus cellulaires, la HTT interagit avec un certain nombre de partenaires protéiques. La liste de ses partenaires ne cesse de s'allonger et plus de 200 ont été identifiés à ce jour. Ces partenaires peuvent être regroupés en plusieurs familles fonctionnelles : les protéines intervenant dans la régulation de la transcription, le transport, ou la signalisation intracellulaire ce qui nous donne un aperçu des fonctions de la HTT (**Tableau 2**). La majorité des partenaires protéiques de la HTT se lient au niveau de son domaine N-terminal qui contient en plus d'une région HEAT et la répétition

polyQ , une répétition de prolines (polyP) suggérant un rôle clé en tant que protéine d'échafaudage dans la coordination de nombreux complexes protéiques (Kim, 2013) et une fonction essentielle à de nombreux mécanismes tels que la régulation transcriptionnelle, l'organisation cellulaire et le transport vésiculaire notamment (Harjes and Wanker, 2003).

Les études de l'ensemble de ces protéines partenaires (ou interactome) montrent que la répétition de polyQ modifie la composition de cet interactome de manière significative, à la fois en terme de nombre de partenaires et en terme de fonction biologique (Ratovitski et al., 2012; Shirasaki et al., 2012). Par rapport à la huntingtine non mutée, la mHTT interagit avec des protéines impliquées dans la production d'énergie et la mitochondrie, mais aussi la réparation de l'ADN (Ratovitski et al., 2012), des chaperons, des protéines de signalisation 14-3-3, et le transport intracellulaire (Shirasaki et al., 2012).

	Nom	Fonction	Région de liaison à la HTT	Effet de l'expansion polyQ
Transcription	CA150	Activateur	inconnue	Aucune
	CBP	Activateur	aa 1–588	Augmente
	CtBP	Répresseur	Inconnue	Diminue
	HYP-A, B	Facteur d'épissage de l'ARN	polyP	Augmente
	HYP-C	Facteur de Transcription	polyP	Augmente
	NcoR	Répresseur	aa 1–171	Augmente
	NF-κB	Facteur de Transcription	Répétitions HEAT	Inconnue
	SP1	Activateur	aa 1–171	Augmente
	TAFII130	Activateur	aa 1–480	Aucune
	TBP	Facteur de base de la transcription	Inconnue	Inconnue
	P53	Facteur de Transcription	polyP	Aucune
	REST–NRSE	Suppresseur	aa 1–548	Diminue
	Transport intracellulaire et endocytose	HAP1	Trafic, endocytose	aa 1–230
HIP1		Endocytose, pro-apoptotique	aa 1–540	Diminue
HIP14		Trafic, endocytose	aa 1–550	Diminue
PACSIN1		Endocytose	polyP	Augmente
PSD-95		Morphologie synaptique	Inconnue	Diminue
Signalisation	AKT/PKB	Kinase	S421	aucune
	Calmoduline	Liaison au calcium	Inconnue	Augmente
	Calpaïnes	Clivage Potéiques	aa 430-550	Augmente
	Caspases (2, 3, 6, 7)	Clivage Potéiques	aa 500-600	Augmente (Caspase 2)
	CIP-4	Voie de signalisation cdc 42	aa 1–152	Augmente
	FIP2 (HYP-L)	Partenaire de la GTPase Rab8	aa 1–550	Inconnue
	GRb2	Voie de signalisation de l'EGF	polyP	Inconnue
	IP <sub>3</sub> 1	Canal de libération du Calcium	aa 1–158	Augmente
	SH3GL3	Endocytose et recyclage des vésicules	polyP	Augmente
	RasGAP	Activation de la RAS-GTPase	polyP	Inconnue
Métabolisme	Cystathionine β-synthase	Enzyme métabolique	aa 1–171	Aucune
	GAPDH	Enzyme glycolitique	polyP	Augmente
	HIP2	Enzyme de conjugaison de l'Ubiquitine	aa 1–540	Aucune

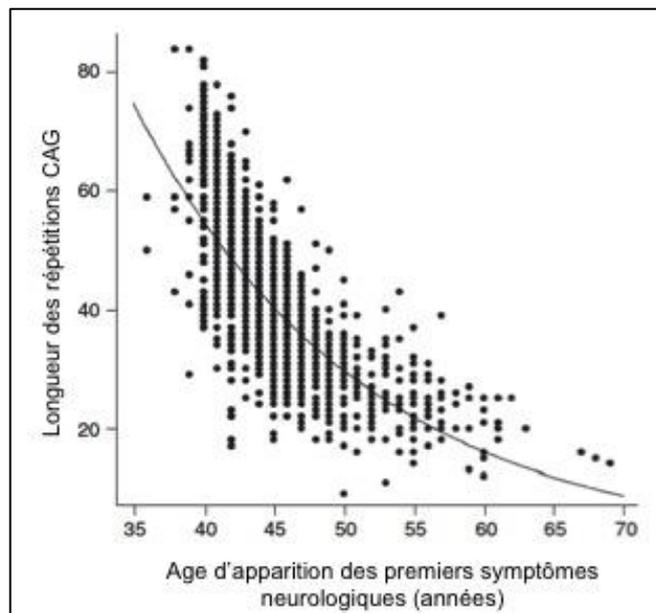
**Tableau 2 : Différents partenaires protéiques de la huntingtine.** Les partenaires protéiques de la HTT peuvent être regroupés selon leur fonction : transcription, transport intracellulaire et endocytose, signalisation et métabolisme. Le tableau indique la fonction de la protéine, la région de la HTT qui interagit avec ses partenaires et l'effet de l'expansion CAG sur cette interaction : Elle peut être renforcée ou affaiblie lorsque la HTT est mutée. Ce tableau a été adapté et complété d'après (Li and Li, 2004; Zheng and Diamond, 2012).

## 2. Huntingtine et répétitions CAG

### 2.1. Longueur des polyQ et âge d'apparition

Les premières études de la huntingtine ont démontré que les répétitions du triplet CAG dans le gène *IT15* sont polymorphiques dans la population générale avec des répétitions variant de 9-11 CAG à 34-37 CAG (avec une moyenne de 17-20 CAG) et que des répétitions supérieures à 37 CAG étaient associées à la MH (Read, 1993). Les études suivantes affinèrent ce concept et établirent, d'une part, que les individus portant de 36 à 39 répétitions étaient à risque de développer la maladie (pénétrance réduite) (Rubinsztein et al., 1996; McNeil et al., 1997); et que d'autre part, il était possible de développer la maladie tardivement malgré une répétition polyQ inférieure à 35 CAG (de 19 à 24) (Brinkman et al., 1997; Kenney et al., 2007; Andrich et al., 2008).

Cependant il est maintenant très clair qu'il existe une corrélation inverse entre le nombre de répétitions CAG dans le gène et l'âge d'apparition de la maladie (Andrew et al., 1993; Snell et al., 1993; Brinkman et al., 1997) (**Figure 8**).



**Figure 8 : Relation entre les répétitions du triplet CAG et l'âge d'apparition des premiers symptômes neurologiques dans la maladie de Huntington.** Il y a une forte corrélation entre le nombre de répétitions CAG et l'âge d'apparition de la maladie : plus le nombre de répétitions CAG est élevé, plus tôt se déclareront les premiers symptômes (Gusella and MacDonald, 2009).

Il apparaît que les répétitions CAG sont des éléments très instables. Dans la plus grande majorité des cas (>80%), la transmission à la descendance ne varie que d'un voir quelques CAG, leur nombre diminuant s'il s'agit d'une transmission maternelle ou

augmentant s'il s'agit d'une transmission paternelle (Duyao et al., 1993). Toutefois, dans le cas de certaines transmissions paternelles, le nombre de CAG peut augmenter de manière dramatique et on parle alors d'anticipation paternelle, phénomène qui tend à diminuer l'âge d'apparition de la maladie au fil des générations (Vonsattel and DiFiglia, 1998). Il s'avère aussi que des pères non porteurs de la maladie peuvent transmettre la mutation dû à la forte instabilité méiotique du triplet CAG au cours de la spermatogénèse (Myers, 2004).

Cette instabilité génétique se retrouve aussi dans les cellules somatiques et mène progressivement à une augmentation du nombre de répétitions au sein de l'organisme. Des analyses de tissus issus de patients MH, montrent un mosaïsme des répétitions CAG à travers l'organisme ; le nombre de répétitions le plus élevé se retrouvant dans le sperme et le cerveau et en particulier dans les régions où la neuropathologie est la plus prononcée (Telenius et al., 1994; De Rooij et al., 1995).

Bien que la majorité des patients développent la maladie entre 35 et 55 ans, il existe aussi des formes juvéniles et des formes tardives de la MH qui se déclenchent très tôt ou très tard dans la vie de l'individu et qui présentent un tableau clinique et une espérance de vie différents.

### **Formes juvéniles**

La forme juvénile de la maladie représente 8 à 10 % des cas de MH et se déclare avant l'âge de 20 ans. Elle évolue d'une manière plus rapide avec des signes cliniques particuliers et conduit irrémédiablement, en une dizaine d'années, au décès du patient. Elle correspond à un nombre élevé de répétitions du triplet CAG (supérieurs à 60). Les patients présentent une dystonie, une lenteur d'initiation des mouvements (akinésie) et une bradykinésie particulièrement précoce et une chorée de faible durée, voire absente. Ces patients sont également sujets à des crises d'épilepsie et des tremblements du tronc et des jambes (Nance and Myers, 2001). Enfin, la dégénérescence du cerveau est beaucoup plus importante et rapide que chez les patients MH « classiques », suggérant l'existence de mécanismes pathologiques additionnels dans ces formes juvéniles de la maladie (Squitieri et al., 2000; Squitieri et al., 2006).

### **Formes tardives**

Dans un peu plus de 10% des cas, la MH se déclare après l'âge de 60 ans. Le processus pathologique de ces formes tardives évolue lentement et se traduit par des symptômes atténués par rapport aux formes communes de la MH. Les symptômes cognitifs et choréiques sont toujours présents, mais la dysphagie est moindre et les troubles psychiatriques parfois inexistant.

Elle se caractérise par des troubles moteurs comprenant une akinésie précoce, une hyper-réflexie, une hypertonie (augmentation du tonus musculaire), une dysarthrie et ne comporte une chorée que de faible durée, voire absente.

## **2.2. Gain de propriétés toxiques de la mHTT**

Il est admis que les polyQ mutées confèrent aux protéines un gain de propriétés toxiques. Ainsi les modèles transgéniques ou *knock-in* chez la souris, le rat, la drosophile ou le nématode récapitulent les effets des polyQ mutées sur le dysfonctionnement ou, pour certains d'entre eux (très grande longueur de polyQ), la perte neuronale. Les polyQ mutées confèrent donc aux protéines un caractère toxique pour la cellule. L'hypothèse d'un gain de propriétés toxiques a été explicitement démontrée par l'insertion d'une expansion CAG dans le gène *Hprt* (*Hypoxanthine phosphoribosyl transferase*), un gène qui n'est pas relié aux maladies à polyQ. A la suite de cette insertion, les souris développent un phénotype neurologique et meurent prématurément, alors que les souris ayant subi l'inactivation du gène *Hprt* ne présentent pas ce phénotype (Ordway et al., 1997). Les polyQ mutées modifient le repliement des protéines et elles sont capables d'induire ainsi la formation d'agrégats protéiques, notamment des inclusions nucléaires retrouvées dans le cerveau de patients atteints de maladie à polyQ et également dans les modèles animaux et les modèles cellulaires de ces pathologies.

La présence d'agrégats nucléaires et cytoplasmiques dans les neurones est une des caractéristiques communes des maladies à polyQ (Davies et al., 1997; DiFiglia et al., 1997). Ces observations suggèrent que l'agrégation des protéines est responsable, du moins en partie, de la pathogénicité des maladies à polyQ (Hackam et al., 1998).

Cependant, l'hypothèse selon laquelle l'agrégation des polyQ est toxique, est sujette à caution (Arrasate et al., 2004). Les agrégats de la HTT, bien que perturbateurs de certaines fonctions cellulaires, n'entraînent pas une mort cellulaire massive. Par ailleurs, leur pathogénicité dépendrait des épitopes qui sont exposés à la surface des agrégats (Yamanaka et al., 2008). Les agrégats exerceraient une action protectrice pour la cellule en séquestrant les fragments de HTT qui sont sous formes d'oligomères ou de monomères, ces derniers étant très toxiques. Les oligomères sont des intermédiaires entre les monomères de fragments HTT et les agrégats (Ross and Poirier, 2004). Dans leur étude, Bodner et collègues ont montré que les neurones traités par une molécule favorisant la formations d'agrégats sont protégés de la mort cellulaire (Bodner et al., 2006). Outre la séquestration de protéines toxiques, la formation des agrégats aurait aussi une activité protectrice en stimulant la macroautophagie (Ventruti and Cuervo, 2007). Le dynamisme des mécanismes

moléculaires modulés au cours du temps par la mHTT renforce d'autant plus la question de connaître l'utilité des agrégats dans la MH.

Une des questions principales concernant les maladies à polyQ est de savoir comment et par quels mécanismes le domaine polyQ de la protéine conduit au dysfonctionnement puis à la perte neuronale. Dans la MH, le point de départ est le clivage de la HTT et sa transformation en conformères mal repliés, suivis par de nombreuses agrégations intermédiaires comme les oligomères, assemblément en protofibrille puis finalement en fibrille. L'hypothèse émise est que l'agrégation des fragments de la mHTT, qui est aussi bien toxique que protectrice, dépend de la présence et de l'interaction avec des protéines chaperons ou bien des composants du complexe ubiquitine-protéasome (Sherman and Goldberg, 2001; Venkatraman et al., 2004). Bien que ces protéines soient supposées éliminer les différents conformères agrégés de mHTT, ces processus peuvent ne pas être suffisant pour éliminer les agrégats et conduisent au déclenchement du processus autophagique, ce qui peut renforcer le dysfonctionnement neuronale (Hara et al., 2006).

Dans le cadre de nombreuses maladies neurodégénératives, le mauvais repliement ou l'accumulation des protéines est à l'origine de l'activation du système de réponse au stress cellulaire qui comprend l'HSF (*Heat shock factor* - La réponse au choc thermique), l'UPR<sup>er</sup> et l'UPR<sup>mt</sup> (*unfolded protein response endoplasmic reticulum / mitochondrial* - réponse du réticulum endoplasmique - mitochondriale) et l'autophagie. Nath et collègues ont étudié l'implication de ces agrégats dans le métabolisme cellulaire. Ces agrégats se forment à la suite de l'arrêt du recyclage des protéines et du trafic des endosomes. Les domaines critiques associés à cette réponse sont localisés dans deux régions de la HTT proche de la partie polyQ dans la partie N-terminale et les cellules exprimant la mHTT présentaient un défaut dans la capacité à se remettre de la réponse au stress cellulaire (Nath et al., 2015). En effet, la formation d'agrégats détournerait rapidement l'énergie cellulaire qui est nécessaire pour le trafic vésiculaire, trafic important au cours de la réponse au stress. Ce détournement mobiliserait la réponse au stress sans un mécanisme énergétique accru, et les cellules auraient donc besoin d'un temps plus long pour se remettre de la réponse au stress comparé aux cellules exprimant la HTT normale. Cette étude suggère que la HTT normale a un rôle dans la pathogénèse de la MH.

### **2.3. Effet des RAN**

Un autre effet de la présence de répétitions CAG a été mis en évidence : l'effet des RAN (*Repeat Associated Non-ATG Translation Initiation*). Les chercheurs ont examiné les cerveaux de 12 adultes et jeunes patients atteint de la maladie de Huntington et ils ont

trouvé de nouvelles protéines qui sont abondantes dans les régions du cerveau de patients présentant mort cellulaire, perte neuronale et autres signes de la maladie, y compris la neuro-inflammation. De manière intéressante des motifs d'ARN répétés peuvent participer à l'initiation de la traduction en l'absence d'un codon d'initiation AUG à travers une grande variété de contextes de séquence, et les produits de ces événements d'initiation de traduction atypiques contribuent à la toxicité neuronale.(Banez-Coronel et al., 2015; Green et al., 2016). Cette toxicité résulte à la fois des altérations des fonctions natives de la protéine dans laquelle la séquence répétée réside ainsi que la toxicité indépendante du contexte de la protéine, liée à des perturbations dans protéostasie neuronale. Les expansions répétées situées à l'extérieur des ORF codant pour des protéines connues peuvent provoquer des changements dans l'expression du gène dans lequel elles résident, ce qui conduit à l'expression réduite ou augmentée au niveau transcriptionnel et de protéique (Todd et al., 2013). De telles séquences répétées non codantes peuvent également induire une toxicité sous forme d'ARN en se liant à des protéines et séquestrant l'ARN spécifiques par la présence du motif répété (Mohan et al., 2014).

Il n'est pas encore élucidé pourquoi ces protéines s'accumulent dans le cerveau, cependant il a été montré que les RAN s'accumulent dans le striatum, et également dans le cortex, le cervelet et la substance blanche des régions frontales du cerveau (Banez-Coronel et al., 2015). Il y'a une possibilité que les protéines RAN soient impliquées dans d'autres maladies neurodégénératives comme, notamment l'atrophie musculaire spinobulbaire et plusieurs types d'ataxie spino-cérébelleuse, qui sont également provoquées par une augmentation anormale du nombre de CAG (Banez-Coronel et al., 2015).

Il est important de comprendre comment ces protéines sont produites sans que les signaux cellulaires normaux soient présents et si des stratégies peuvent être élaborées pour bloquer leur production. Outre la possibilité de nouvelles thérapies, la détection de ces protéines peut-être utile pour prédire l'apparition de la maladie.

### **3. Huntingtine normale *versus* huntingtine mutée**

#### **3.1. Perturbation de l'homéostasie protéique**

Le cycle de vie des protéines est étroitement régulé par la cellule afin de maintenir un équilibre homéostatique. Tout déséquilibre dans la composition protéique intracellulaire doit être rapidement corrigé, soit par élimination des protéines surabondantes ou détériorées, soit par ralentissement de la production de celles-ci. Le mécanisme de contrôle de la composition protéique, dénommé protéostasie, est composé de plusieurs éléments

intervenant tout au long du cycle de vie d'une protéine. L'une des ultimes étapes de ce cycle est la dégradation et le recyclage des protéines (Labbadia and Morimoto, 2013).

Dans des conditions normales, l'intégrité du protéome est maintenue par le réseau protéique, les principaux effecteurs en sont des chaperons moléculaires impliqués dans le repliement des protéines et les mécanismes de la clairance protéique (Balch et al., 2008). Curieusement, l'expression chronique des répétitions polyQ entraîne une perturbation de manière âge dépendant de la protéostase comme en témoigne l'augmentation de l'agrégation et la mauvaise localisation de la protéine métastable (Gidalevitz et al., 2006; Gupta et al., 2011).

Une analyse protéomique de l'interactome HTT a révélé que les protéines chaperons telles que HSP90, TCP-1, HSP70 et DnaJ sont toutes liées à la HTT (Shirasaki et al., 2012). Les niveaux protéiques de HSP70 et DnaJ sont progressivement réduits dans les tissus cérébraux de souris MH par une combinaison de séquestration et dérégulation transcriptionnelle (Hay et al., 2004; Yamanaka et al., 2008). La perturbation de la protéostase se produit également avec la protéine SOD1 mutée (*super-oxyde dismutase 1*), une protéine sujette à l'agrégation qui est la première cause d'apparition de la SLA familiale, et l'expression d'amyloïdes synthétiques formants des peptides, ce qui suggèrent que la perturbation de la protéostase peut être une caractéristique générale des troubles de protéines sujettes à l'agrégation (Gidalevitz et al., 2009; Olzscha et al., 2011). Ces observations corroborent un modèle où l'expression chronique de protéines sujettes à l'agrégation, comme la mHTT, perturbent les interactions des protéines chaperons avec leurs cibles et conduit à une perturbation globale de la protéostase. La surexpression de protéines chaperons ou l'induction des voies de régulation des chaperons suppriment la toxicité induite par la mHTT en inhibant la formation d'agrégat, en favorisant la dégradation de la mHTT et en répartissant la mHTT dans des structures moins toxiques (Muchowski and Wacker, 2005).

La HTT peut interagir également avec des éléments impliqués dans la dégradation des protéines soit par le protéasome, soit par l'autophagie (Vilchez et al., 2014). Compte-tenu de l'implication de la HTT dans l'autophagie sélective (Rui and Le, 2015), l'effet perturbateur de la mHTT a un impact encore plus fort sur l'accumulation de protéines mal conformées. Dans ces conditions, les cellules ne parviennent plus à réguler correctement l'homéostasie cellulaire, et accumulent des déchets protéiques.

Il apparaît aussi que des voies de repliement des protéines peuvent influencer la toxicité des polyQ telle que la sous classe des chaperons DJNAB indépendamment de HSP70 (Hageman et al., 2010; Labbadia et al., 2012) ou encore le gène moag-4 (codant

pour une petite protéine de fonction inconnue). Identifié chez *C. elegans*, il influence l'agrégation des protéines mal conformées indépendamment du protéasome ou de l'autophagie et sans activation des voies de réponse au stress ou à la régulation des chaperons moléculaires (van Ham et al., 2010).

L'altération de ces deux étapes clefs du cycle de vie des protéines peut rapidement aboutir à un effondrement de la protéostase dans la cellule et conduire à un renforcement du stress protéotoxique.

### **3.2. Dérégulation transcriptionnelle**

Les phénomènes de dérégulation transcriptionnelle dans la maladie de Huntington ont été décrits dans de nombreux modèles de la maladie, notamment les modèles cellulaires et les modèles souris ou encore les modèles invertébrés, ainsi que dans le striatum et le cortex humain en *post-mortem*.

L'expression de la mHTT a des effets globaux sur le transcriptome suggérant que la dérégulation de la transcription est une caractéristique clé de la pathogenèse de la MH. La mHTT interagit et perturbe les principaux composants de la machinerie transcriptionnelle générale, affectant à la fois l'accessibilité aux promoteurs et le recrutement de l'ARN polymérase II (Seredenina and Luthi-Carter, 2012).

De nombreuses analyses réalisées à l'aide de puces à ADN effectuées sur des modèles souris MH ont fourni un ensemble de milliers de gènes à étudier ainsi qu'une vue génomique globale du dysfonctionnement striatal qui se produit au cours de la MH. De ces analyses, il a été montré que de nombreux récepteurs aux neurotransmetteurs, des enzymes, des protéines impliquées dans la structure des neurones, la réponse au stress, et le transport axonal sont fortement dérégulés dans la MH (Cha et al., 1998; Luthi-Carter et al., 2000; Luthi-Carter et al., 2002; Sugars and Rubinsztein, 2003; Kuhn et al., 2007; Runne et al., 2007). Ces études mettent en lumière une reprogrammation profonde de l'expression des gènes, et une variabilité significative d'un modèle à l'autre, notamment lorsque l'on compare un modèle précoce à un modèle plus tardif. Néanmoins, de grandes tendances ressortent comme la dérégulation de gènes développementaux et de gènes importants pour l'activité neuronale, la transmission synaptique ou la réponse au stress.

Il est aussi important de retenir que plus de 81% des gènes enrichis dans le striatum (gènes présentant une expression relative plus élevée dans le striatum que dans d'autres régions du cerveau) ont une expression qui est réduite dans les modèles de souris MH et dans le noyau caudé de patients MH (Desplats et al., 2006). De nouveaux gènes enrichis

dans le striatum impliqués dans le transport vésiculaire, le métabolisme du tryptophane et la neuro-inflammation sont également dérégulés à la fois dans le striatum de souris et dans le noyau caudé de patients MH (Mazarei et al., 2010). La dérégulation transcriptionnelle se produit dans de grandes régions génomiques d'une manière coordonnée et est associée à la progression de la maladie. L'analyse du profil d'expression du génome issu du sang de patients MH a révélé des différences significatives chez les patients symptomatiques, mais pas chez les patients à des stades modérés (Runne et al., 2007).

La HTT est capable d'interagir avec de nombreuses protéines, et parmi celles-ci, des composants moléculaires nécessaires à la transcription, impliqués dans la production d'ARN messenger (ARNm), des facteurs de transcription impliqués dans le recrutement des ARN polymérase tel que CBP (*CREB Binding protein*) (Bakker et al., 2007), mais aussi des protéines modificateuses de l'état de la chromatine.

Récemment il a été démontré que l'activation/inactivation de la transcription régulée par l'acétylation de la chromatine est altérée dans la MH. Des protéines modificateuses de la chromatine peuvent être séquestrées dans les agrégats, entravant ainsi la formation du complexe de transcription et donc l'expression de gènes cibles. L'acétylation et la dé-acétylation des histones sont assurées par des enzymes opposées : respectivement les histones acétyl-transférase (HAC) et les histones dé-acétylases (HDAC) (Li et al., 2007a; Bannister and Kouzarides, 2011). Par exemple, la mHTT, en se liant anormalement avec CBP (*CREB-Binding Protein*) ou en promouvant sa dégradation inhibe son activité histone acétyltransférase provoquant une hypoacétylation des histones, un défaut subséquent de remodelage de la chromatine et donc une altération de la transcription dépendante de CREB (*cAMP-Response Element Binding Protein*) (Kazantsev et al., 1999; Steffan et al., 2000; Steffan et al., 2001; Bannister and Kouzarides, 2011). Il faut souligner que les niveaux d'histones acétylés ne sont pas diminués globalement dans des modèles de souris MH, mais plutôt de manière sélective au niveau des gènes spécifiquement négativement dérégulés dans la MH.

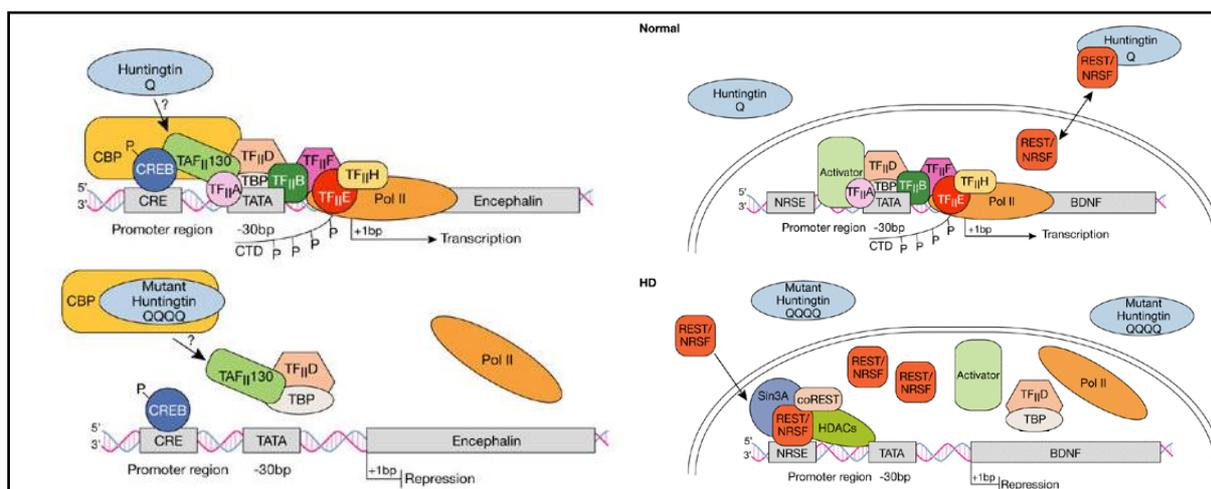
Des études indiquent que dans les souris MH (R6/1 et R6/2) il existe pour les gènes dérégulés, des profils d'expression, au niveau des histones, particuliers (Vashishtha et al., 2013; Achour et al., 2015b). Les gènes sous-exprimés dans le cerveau de ces souris, y compris dans le striatum, sont associés à un profil épigénétique particulier : H3K4me3 marquent les sites d'acétylation et H3K27ac marquent les régions promotrices dites « *enhancer* ». Les gènes qui présentent ce modèle particulier ont été enrichis dans les fonctions et les voies liées à l'activité neuronale, ce qui indique que les profils large

H3K4me3 et H3K27ac marquent également des gènes qui définissent l'identité et la fonction des tissus. (Vashishtha et al., 2013; Achour et al., 2015b).

La machinerie transcriptionnelle et notamment la liaison à l'ADN de l'ARN polymérase II (ou RNA POL II) qui est présente aussi bien dans les séquences codantes des gènes activement transcrits (régions amplificatrices ou *enhancer*) que sur les promoteurs correspondants est perturbé dans la MH. Les gènes qui sont sous exprimés dans le striatum de souris MH présentent une variation de la quantité de la RNA POL II dans le promoteur ou la séquence codante avec notamment une diminution de la RNA POL II dans la région promotrice. (Achour et al., 2015b). L'intégration de ces deux profils épigénétiques montre une corrélation entre la diminution de la marque d'activation de la chromatine (K3K27ac), une diminution de la quantité de ARN POL II et une diminution de la quantité de transcrits des gènes correspondants établissant un lien entre dérégulation de l'expression et modification de la chromatine dans le contexte de la MH chez les souris R6/1 (Achour et al., 2015b).

La mHTT et les fragments N terminaux accumulés dans le noyau peuvent perturber l'activité transcriptionnelle de nombreux facteurs de transcription comme SP1 (*specificity protein 1*), TAFII130 (*transcription initiator factor TFIID subunit*) ou NRF/REST (*Nuclear respiratory factor/RE1-Silencing Transcription factor*) (Zuccato et al., 2001; Zuccato et al., 2011). Tous ces gènes étant des éléments clés pour l'accessibilité aux régions promotrices et à l'initiation de la transcription de gènes spécifiques, leur liaison avec la mHTT conduit à une forte dérégulation transcriptionnelle et à la perturbation de processus cellulaires nombreux (Dunah et al., 2002; Jiang et al., 2003).

Enfin, il est intéressant de noter que la HTT peut se lier à l'ADN directement en tant que co-facteur, soit par l'intermédiaire d'un facteur de transcription et ainsi occuper des régions génomiques impliquées dans l'activation ou l'inhibition de l'expression de gènes (Benn et al., 2008). La mHTT est donc capable de modifier l'expression des gènes directement en dérégulant leur transcription, ou bien indirectement en altérant l'état de la chromatine et en perturbant le fonctionnement des mécanismes de régulation épigénétiques (Lee et al., 2013). Le phénomène de dérégulation transcriptionnelle est désormais bien connu (Seredenina and Luthi-Carter, 2012; Valor, 2015) (**Figure 9**).



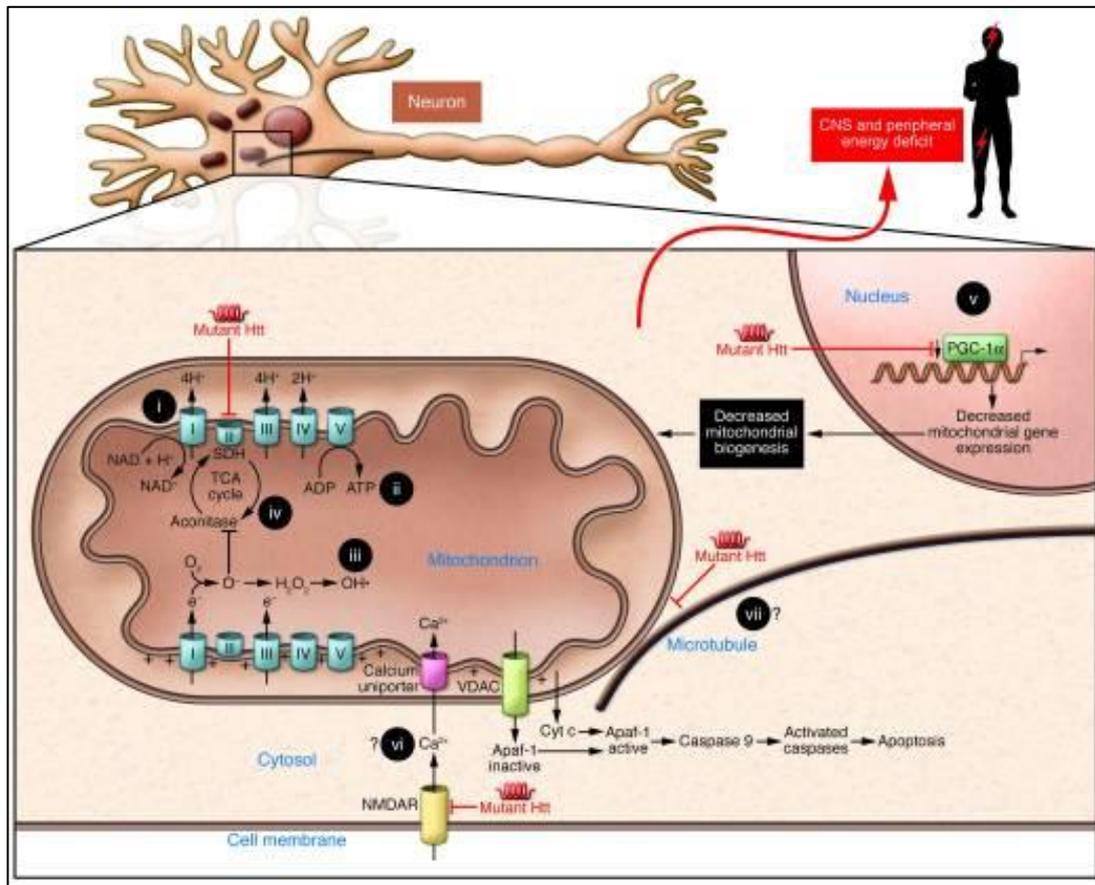
**Figure 9 : Dérégulation des voies de transcription CREB et REST-NRSF dans la maladie de Huntington. A)** La mHTT perturbe la transcription médiée par la CRE en interagissant directement ou en séquestrant CPB, et peut-être TAFII130 dans les agrégats nucléaires. La mHTT empêche CBP et TAFII130 de se lier aux régions CRE au niveau des promoteurs ce qui perturbe la machinerie de recrutement de la RNA Pol II qui n'est pas correctement liée au promoteur et perturbe donc l'activation de la transcription **B)** La mHTT agit comme un régulateur de la transcription du BDNF en empêchant la liaison du complexe REST/NRSF à son élément de réponse à l'ADN (Landles and Bates, 2004).

### 3.3. Dysfonction mitochondriale

Le stress oxydatif joue un rôle important dans les maladies neurodégénératives et la principale source de stress oxydatif, médié par les espèces réactives de l'oxygène (ROS), est liée aux mitochondries comme source endogène. La fonction des mitochondries est fortement associée au stress oxydatif ; et elles y sont très sensibles. Lors d'un stress oxydatif les mitochondries produisent des espèces réactives de l'oxygène et leur ADN n'étant pas protégé par des histones, est inefficacement réparé suite à l'oxydation par les ROS, ce qui peut conduire à un taux mutationnel élevé de l'ADNmt. Les mutations acquises au cours du vieillissement de l'ADNmt contribueraient au déclin physiologique survenant avec l'âge et sont liées à la neurodégénérescence (Lin and Beal, 2006).

La production énergétique par la mitochondrie est perturbée dans la MH. Plus précisément, bien qu'il n'y ait pas d'interaction fonctionnelle directe, l'expression de la mHTT peut conduire à l'expression de différentes enzymes mitochondriales (Mochel and Haller, 2011) (Damiano et al., 2010) ; Yao et al., 2014) qui sont susceptibles de créer des pertes de potentiel membranaire et des déséquilibres calciques auxquels les MSN sont particulièrement vulnérables. Le mécanisme liant les défauts mitochondriaux à la sensibilité particulière des MSN n'est pas encore totalement élucidé, et peut être multifactoriel ; il ressort que les altérations mitochondriales dues à la mHTT peuvent être exacerbées par

d'autres mécanismes comme la dérégulation transcriptionnelle ou l'excitotoxicité (Zuccato et al., 2010).



**Figure 10 : Résumé des principaux mécanismes par lesquels la mHTT provoque un dysfonctionnement mitochondrial.** Ces mécanismes se traduisent par une diminution de la biogenèse mitochondriale, une augmentation du stress oxydatif, un déficit en ATP, une augmentation de l'apoptose, et, finalement, un déficit énergétique central et périphérique (Mochel and Haller, 2011).

Le dernier fait intéressant concerne la capacité respiratoire mitochondriale (*mitochondrial spare respiratory capacity – SRC*). La SRC est une mesure de la capacité des mitochondries à produire de l'énergie au-delà de ce qui est requis pour maintenir les besoins métaboliques de base des cellules, et est importante pour le maintien de l'homéostasie et la survie des neurones. Une réduction significative de la SRC a été montrée dans des fibroblastes humains de patients MH et dans les cellules STHdhQ111/Q111 en comparaison aux cellules STHdhQ7/Q7 (Siddiqui et al., 2012). La réduction de la SRC et la production d'ATP sont également présentes dans des cellules souches pluripotentes induites issues de patients MH (Duan et al., 2014). Ces éléments renforcent l'hypothèse d'une forte perturbation bioénergétique mitochondriale dans la MH et soutient le rôle toxique de la mHTT.

Nous allons décrire dans les paragraphes qui suivent quelques exemples de perturbations mitochondriales qui altèrent l'équilibre bioénergétique de la cellule dans la MH.

i) Augmentation de la production des ROS et atteinte de la chaîne respiratoire

Le complexe II a un rôle important pour l'entrée d'équivalent d'électron dans la chaîne respiratoire mitochondriale. Or des études *post-mortem* montrent une nette carence en complexe mitochondrial II dans le striatum de sujets MH (Stahl and Swanson, 1974; Gu et al., 1996; Browne et al., 1997; Benchoua et al., 2006; Rotblat et al., 2014) ainsi qu'une diminution de l'activité des complexes II-III, sans altération de l'activité des complexes I ou IV (Ren et al., 2009). Des neurones striataux transfectés avec la partie N-Terminale de la mHTT présentent une diminution de l'activité enzymatique du complexe II (succinate déshydrogénase) impliquée dans le cycle de Krebs. Ceci augmente la sensibilité des cellules aux variations calciques et aux modifications du potentiel de membrane mitochondriale lors de la consommation d'oxygène, tandis que la surexpression du complexe II prévient le dysfonctionnement mitochondrial et la mort cellulaire (Benchoua et al., 2006; Milakovic et al., 2006). In vivo également, la surexpression des sous-unités du complexe II réduit la mort des neurones striataux induit par la mHTT (Damiano et al., 2013).

La diminution du complexe II dans la MH diminue la mise à disposition d'ATP par la cellule en perturbant le cycle de Krebs et ne limite pas la production de ROS.

ii) Perturbation de la capacité tampon du calcium dans les mitochondries

Les mitochondries jouent un rôle important dans le maintien des niveaux calciques cytoplasmiques en réponse à l'activité neuronale (Nicholls, 2009). Le transport mitochondrial du calcium est alimenté par le gradient de protons, et l'augmentation du calcium neuronal modifie la production d'ATP mitochondrial par découplage de la phosphorylation oxydative. La surcharge calcique peut être induite par la décharge du potentiel membranaire mitochondriale (PTMP) (Nicholls, 2009), entraînant l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale, la libération de cytochrome C et l'activation des voies de mort cellulaire. Les mitochondries isolées dans des modèles MH présentent un potentiel membranaire réduit et se dépolarisent à des concentrations plus faibles que les mitochondries normales (Choo et al., 2004). De plus les mitochondries des neurones striataux contiennent plus de cyclophiline D (régulateur de l'ouverture des pores mitochondriaux) que les mitochondries corticales ce qui les rend plus sensibles à l'ouverture des canaux PTPM par le calcium (Brustovetsky et al., 2003).

L'ensemble de ces données contribue à entrevoir les problèmes d'excitotoxicité que rencontrent les neurones striataux et comment la mitochondrie peut renforcer le stress cellulaire dans ces derniers.

iii) Perturbation de la biogénèse mitochondriale

PGC-1 $\alpha$  est un co-activateur transcriptionnel clé contrôlant la biogénèse mitochondriale, le métabolisme, et la défense antioxydante (Puigserver et al., 1998; Kelly and Scarpulla, 2004; Cui et al., 2006; Handschin and Spiegelman, 2006; Lin and Beal, 2006; Liu and Lin, 2011). PGC-1 $\alpha$  interagit avec un certain nombre de facteurs de transcription dont le facteur respiratoire nucléaire 1 (NRF-1) et le facteur respiratoire nucléaire 2 (NRF-2), qui régulent l'expression des gènes respiratoires mitochondriaux (Scarpulla, 2006). L'inhibition de PGC-1 $\alpha$  perturbe le métabolisme énergétique (Lin et al., 2004). La perturbation de la voie CREB par la mHTT (Cui et al., 2006) induite par une diminution de la phosphorylation de la voie CREB et de la signalisation CRE, contribue fortement à réduire les taux de PGC-1 $\alpha$  (Gines et al., 2003b) et à diminuer la biogénèse mitochondriale entre autre (Weydt et al., 2009).

Dans l'ensemble, ces données soulignent que des événements en mont de la perturbation mitochondriale sont vraisemblablement altérés au cours de la MH.

iv) Perturbation du trafic et de la dynamique mitochondriale

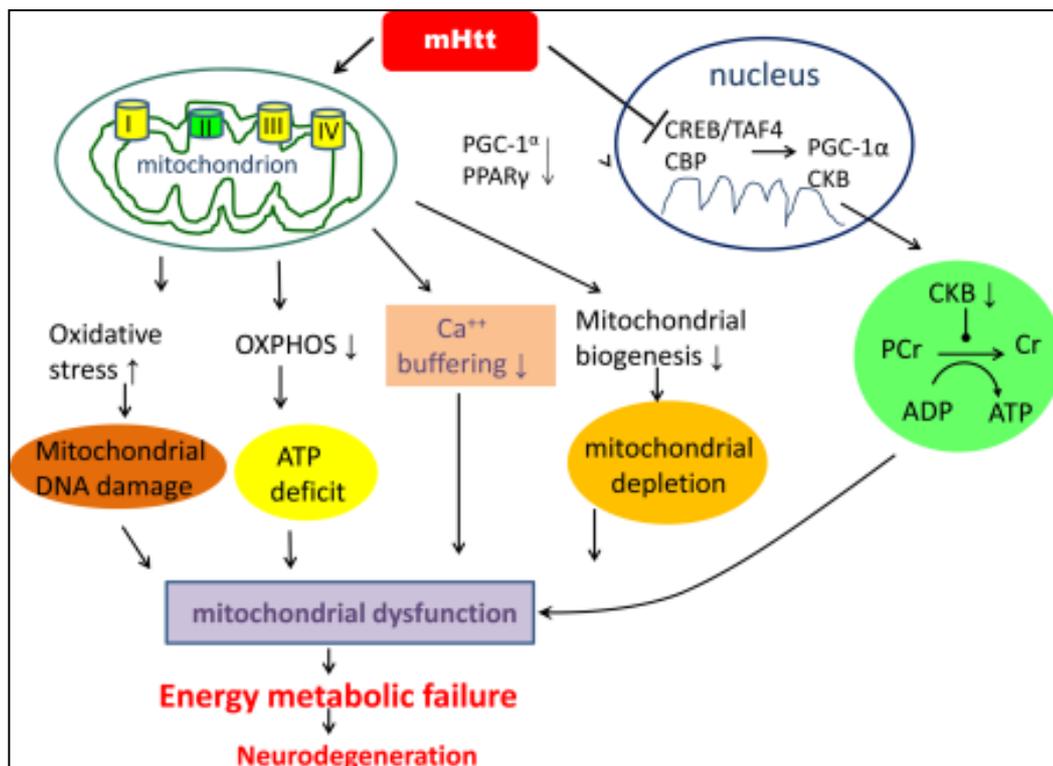
Le dysfonctionnement mitochondrial précède le dysfonctionnement neuronal dans des modèles *in vitro* et *in vivo* de la MH. La mHTT perturbe la motilité mitochondriale dans les neurones de mammifères au travers du gain de fonction toxique de la mHTT et une perte de fonction de la HTT normale (Trushina et al., 2004). Cependant, les mécanismes par lesquels la mHTT affecte le trafic mitochondrial intracellulaire sont encore mal connus (Bossy-Wetzel et al., 2008; Li et al., 2010; Song et al., 2011). Pour appuyer cette théorie, des analyses sur des cerveaux de patients MH montrent que la distribution et le transport des mitochondries dans des neurones calbindine-positifs évoluaient en même temps que la maladie. Ces résultats confortent l'hypothèse selon laquelle la modification du dynamisme mitochondrial représente un mécanisme important dans le dysfonctionnement mitochondrial.

v) Perturbation de l'homéostasie énergétique

Le système de créatine kinase (CK)/phosphocréatine (PCr) est l'un des principaux mécanismes qui contrôle l'utilisation de l'énergie dans les cellules.(Wyss and Kaddurah-Daouk, 2000). Dans la MH, les concentrations en PCr sont augmentées et l'activité des CK-BB est diminuée (Zhang et al., 2011a; Mochel et al., 2012) suggérant que la mHTT pourrait

aussi réguler CK-BB au niveau transcriptionnel. Une diminution du système CK/PCr est associée à un ratio ATP/ADP réduit ce qui perturbe l'homéostasie énergétique (Mochel et al., 2012).

En plus d'affecter l'homéostasie énergétique cellulaire, la suppression de CK-BB dans la MH pourrait également compromettre les fonctions liées à ses protéines d'interactions. Le co-transporteur potassium-chlorure KCC2, qui se lie directement à CK-BB et est fortement exprimé dans les neurones GABAergiques, eux-mêmes sensiblement vulnérables dans la MH, favorise la formation d'épine dendritique (Li et al., 2007b).



**Figure 11 : Schéma des mécanismes d'insuffisance métabolique énergétique dans la MH.** En altérant de nombreux mécanismes moléculaires la huntingtine mutée peut entraîner une insuffisance métabolique énergétique et conduire à la neurodégénérescence dans la MH (Duan et al., 2014).

Pour résumer, la mHTT affecte directement ou indirectement la fonction mitochondriale en induisant un stress oxydatif conduisant à la mort neuronale (**Figure 11**).

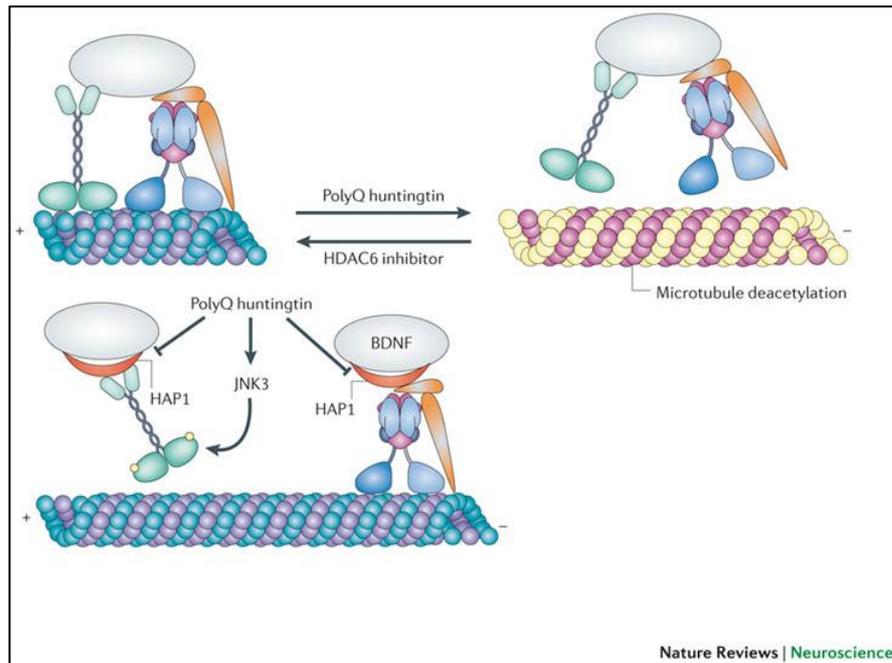
### 3.4. Altération du transport axonal

Le transport axonal normal des organites, y compris des mitochondries, des vésicules synaptiques, et des protéines, est essentiel pour l'activité synaptique et la communication neuronale.

La HTT transporte une variété d'organites, y compris des vésicules contenant des précurseurs synaptiques (Zala et al., 2013a), des vésicules qui contiennent la protéine v-SNARE VAMP7 (Colin et al., 2008), des autophagosomes (Wong and Holzbaur, 2014), des endosomes et lysosomes (Caviston et al., 2011; Liot et al., 2013), des vésicules contenant le facteur BDNF (Gauthier et al., 2004), des vésicules transportant la protéine précurseur de l'amyloïde (APP) (Colin et al., 2008; Her and Goldstein, 2008), et des vésicules contenant des récepteurs GABAergiques (Twelvetrees et al., 2010). Dans les neurones MH, le transport axonal est essentiellement altéré par l'interaction entre la mHTT et des protéines localisées dans les axones. Ces interactions anormales bloquent le transport des organites le long des axones, conduisant finalement à un appauvrissement synaptique. En effet, la dégénérescence caractéristique du striatum et du cortex est précédée par une pathologie axonale chez les souris exprimant la mHTT (Li et al., 2001) et des agrégats axonaux de mHTT perturbent physiquement le transport axonal dans les neurones (Li et al., 2001).

Des études sur le transport axonal ont rapporté une altération du transport mitochondrial et vésiculaire dans les neurones corticaux sur-exprimant la mHTT (Chang et al., 2006), dans les neurones du striatum MH (Trushina et al., 2004), dans les neurones corticaux de rat et dans les neurones du striatum de souris transfectées avec la mHTT (Orr et al., 2008).

La mHTT pourrait nuire au transport axonal en induisant la dé-acétylation des microtubules, en activant la phosphorylation des protéines motrices ou suite à la perte de fonction de la HTT normale.



**Figure 12 : Perturbation du transport axonal dans la maladie de Huntington.** Dans la MH, une déficience du transport axonal est causée par une perturbation de la liaison des protéines motrices avec les microtubules ou avec les cargos. **i)** La mHTT favorise la déacétylation de la tubuline entraînant une altération de la liaison des protéines motrices aux microtubules. **ii)** La liaison de la kinésine aux microtubules est également perturbée par la phosphorylation (rond jaune) du domaine moteur de la kinésine suite à l'activation de *c-Jun N-terminal 3* (JNK3) par la mHTT. **iii)** *HTT-associated protein 1* (HAP1) est une protéine adaptatrice qui interagit avec les chaînes légères de la kinésine et la sous-unité 1 de la dynactine (DCTN1). La mHTT perturbe le transport axonal médié par HAP1, y compris celui du BDNF. La perte d'appui neurotrophique peut contribuer à la neurotoxicité dans la maladie de Huntington (Millecamps and Julien, 2013).

i) L'acétylation de la tubuline est une modification post traductionnelle réversible qui a lieu au niveau de la lysine 40 (Lys40) sur la partie N-terminale de l' $\alpha$ -tubuline. Cette modification facilite la liaison de la kinésine aux microtubules. Cette acétylation est perturbée par l'histone dé-acétylase 6 (HDAC6) (Choudhary et al., 2009) ; et il s'avère que l'acétylation de la tubuline est réduite dans le cerveau des patients Huntington par comparaison avec des cerveaux contrôle (Dompierre et al., 2007) (voir **Figure 12**).

ii) La mHTT altère aussi le transport axonal au travers de *c-Jun N-terminal 3* (JNK3). Il a été observé que l'activation de JNK3, qui est uniquement exprimé dans les neurones, est un évènement précédant l'apparition de la maladie dans des modèles souris de la MH (Morfini et al., 2009). JNK3 phosphoryle un résidu sérine sur le domaine moteur de la kinésine ce qui a pour conséquence de diminuer la liaison de la kinésine avec les microtubules (Morfini et al., 2009) (**Figure 12**).

iii) La mHTT réduit l'efficacité de transport des vésicules le long des microtubules en se liant et en retenant le GAPDH (glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase) au niveau des vésicules. Le GAPDH fournit de l'énergie pour le transport axonal rapide des vésicules (Zala et al., 2013b). En effet, la diminution des quantités de HTT à la fois *in vitro* et *in vivo* chez la souris entraîne le détachement du GAPDH des vésicules ce qui réduit l'efficacité du transport. Une perturbation de l'échafaudage protéique entre la mHTT, GPADH et les deux moteurs moléculaires, qui couple production et consommation d'énergie participerait au dysfonctionnement du transport vésiculaire axonal.

iv) Le transport bidirectionnel est également perturbé par la présence de la mHTT (Caviston et al., 2007). Un partenaire de liaison de la HTT est HAP1 (*HTT-associated protein 1*) qui interagit avec KIF5C et DCTN1 (Engelender et al., 1997). La HTT peut également se lier directement aux chaînes intermédiaires de la dynéine et faciliter la mobilité vésiculaire bidirectionnelle (Caviston et al., 2007). HTT, HAP1 et la sous-unité p150<sup>Glued</sup> de la dynactine prennent part dans le trafic intracellulaire des endosomes et des lysosomes médié par la dynéine (Caviston et al., 2011) et dans le transport rétrograde du BDNF (Gauthier et al., 2004). HTT, HAP1 et KIF5C de la kinésine assurent le transport rétrograde des récepteurs GABA de type A au niveau des synapses, et ce transport est défectueux lorsque la HTT est mutée (Twelvetrees et al., 2010). De plus, la HTT agirait comme un coordinateur du contrôle de la direction du mouvement vésiculaire le long des microtubules au travers de la phosphorylation au niveau de la sérine S421 (Colin et al., 2008). La phosphorylation de la S421 est médiée par la voie PI3K/AKT et SGK (*serum- and glucocorticoid-induced kinase*) (Humbert et al., 2002; Rangone et al., 2004) et la déphosphorylation est induite par l'activation de la calcineurine (Pardo et al., 2006) (**Figure 12**).

Ainsi, la perte du soutien neurotrophique, un défaut de la clairance des produits lysosomaux et/ou l'altération de l'inhibition synaptique dans le cerveau peut contribuer à la neurotoxicité dans la maladie de Huntington.

### **3.5. Altérations de la synapse et des circuits neuronaux**

La HTT est fortement exprimée au niveau présynaptique dans les neurones (DiFiglia et al., 1995) et est nécessaire pour l'établissement des circuits excitateurs corticaux-striataux (McKinstry et al., 2014). Les premières observations montrant de grandes similitudes entre les lésions excitotoxiques chez l'animal et les lésions striatales sur des cerveaux *post-mortem* chez l'Homme sont à l'origine de l'hypothèse excitotoxique dans la MH : la neurodégénérescence striatale serait à lier à une anomalie du système glutamatergique couplée à une dysfonction énergétique mitochondriale. Dans les neurones, il y a une

perturbation de l'homéostasie calcique médiée par deux mécanismes : une augmentation de l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans les neurones du striatum et une perturbation des mécanismes de séquestration/relargages des stocks intracellulaire du  $\text{Ca}^{2+}$ .

i) Excitotoxicité Glutamatergique

L'excitotoxicité dans le striatum se produit lorsque la signalisation glutamatergique est excessive et augmente les niveaux calciques intracellulaires conduisant à une perturbation énergétique mitochondriale et la mort cellulaire. Dans la MH, les changements de libération de glutamate, l'absorption et la signalisation post-synaptique convergent pour promouvoir l'excitotoxicité des MSN. La libération accrue de glutamate se produit aux stades précoces de la MH et est suivie par la perte de récepteurs glutamatergiques lors des phases symptomatiques, indiquant une déconnexion du cortex et du striatum (Raymond et al., 2011). La signalisation glutamatergique initialement élevée dans les neurones peut également être augmentée par une concentration plus élevée du glutamate extracellulaire suite à une recapture réduite. En effet, au niveau des synapses cortico-striatales, le glutamate est pompé de l'espace extracellulaire par les astrocytes qui expriment des transporteurs au glutamate (GLT1 et GLAST). Il s'avère que le transporteur GLT-1 est réduit dans des modèles de la MH (Estrada-Sanchez and Rebec, 2012; Miller et al., 2012a), ce qui contribue à l'augmentation du glutamate dans l'espace inter-synaptique.

L'augmentation extracellulaire du glutamate active la signalisation de différents récepteurs : 1) Les récepteurs post-synaptiques AMPA ( *$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*) des MSN permettent un bref afflux de cation et dépolarisent la membrane. 2) Les récepteurs métabotropiques aux glutamates qui participent à la réponse à un excès de glutamate en fonction du type cellulaire et de la voie de signalisation auxquels ils sont couplés. Par exemple, le groupe mGluR2/3 est exprimé au niveau des synapses cortico-striatales et au niveau des astrocytes et participent à la neuroprotection des neurones. L'activation de ces récepteurs augmentent la concentration de GLT-1 et inhibe le relargage du glutamate (Faideau et al., 2010; Estrada-Sanchez and Rebec, 2012) ; (Shin et al., 2005). 3) Les récepteurs NMDA qui sont sur-activés et surcharge milieu intracellulaire en ions calciques.

La sur-activation des récepteurs NMDA peut rendre les neurones plus sensibles à l'excitotoxicité en raison d'une haute perméabilité aux ions calciques et une désactivation lente qui se traduit par une surcharge intracellulaire de calcium. La perte sélective des MSN du striatum par rapport aux autres types cellulaires dans les modèles chimiques de la MH suggèrent que la signalisation des récepteurs NMDA est un mécanisme de neurodégénérescence sélectif dans la MH (Beal et al., 1986; Lee et al., 2006). Cela est

d'autant plus vrai que la HTT peut se lier à PSD-95 une protéine post-synaptique qui régule la signalisation glutamatergique par son interaction avec les récepteurs NMDA (Song et al., 2003). Les récepteurs NMDA sont composés de deux sous-unités NR1 (GluN1/GRIN1B) et de deux sous-unités NR2A ou NR2B (GluN2A/B ou GRIN2A/B) qui diffèrent dans leur propriétés au niveau de leurs canaux ioniques, de leur pharmacologie et de leur distribution spatio-temporelle (Liu et al., 2004) ; (Rigby et al., 1996). L'activation des récepteurs NMDA synaptiques favorise l'expression de gènes pro-survies, de protéines anti-apoptotiques et anti-oxydantes, et favorise l'expression du BDNF. En revanche, l'activation des récepteurs NMDA extra-synaptiques conduit à l'expression de gènes de voies de mort cellulaire, à la surcharge calcique mitochondriale et à la libération de facteurs apoptotiques (Sepers and Raymond, 2014). Les récepteurs NR2B sont majoritairement exprimés pendant les phases de développement post-natal et sont majoritairement présent dans les neurones immatures au niveau extra-synaptique (Hardingham and Bading, 2010; Milnerwood et al., 2010). Ces récepteurs sont notamment plus fortement exprimés dans les MSN du striatum par rapport aux autres sous-types de neurones et aux autres régions du cerveau. Avec une dynamique d'ouverture des canaux plus longue que NR2A (Heng et al., 2009), une localisation extra-synaptique et majoritairement au niveau des MSN, la sous-unité NR2B peut contribuer à la vulnérabilité sélective du striatum (**Figure 13**).

Cependant, la sur-activation des récepteurs NMDA ne semble pas une condition pré-requise pour l'excitotoxicité. En effet, des concentrations normales de glutamate dans l'espace extra-synaptique peuvent engendrer excitotoxicité et mort neuronale dans des neurones présentant un déficit énergétique (Jacquard et al., 2006). Cet effet peut être médiée par une augmentation des concentrations de  $Ca^{2+}$  par les récepteurs NMDA (Damiano et al., 2010). La vulnérabilité accrue des neurones à l'excitotoxicité peut être aussi induite par une recapture réduite du  $Ca^{2+}$  cytosolique par la mitochondrie qui est déficiente, lors de la stimulation du récepteur NMDA. Dans les synapses MH (**Figure 13** à droite), il y a une interaction forte entre la mHTT pleine longueur ou fragmentée avec PACSIN1 qui perturbe la suppression par endocytose des sous-unités NR2B de la membrane post-synaptique (Marco et al., 2013), et induit l'augmentation de récepteurs NMDA contenant la sous-unité NR2B (qui induit une réduction de la perméabilité aux ions  $Ca^{2+}$ ) dans la synapse, ainsi que d'autres altérations des récepteurs NMDA.

Les neurones striataux recevant de nombreuses afférences excitatrices, ils ont un fort besoin en énergie pour maintenir le potentiel membranaire. Le déficit énergétique qui découle de l'atteinte mitochondriale dans la MH entraîne une dépolarisation partielle de la membrane neuronale, la levée du blocage voltage-dépendant par le magnésium des canaux calciques associés aux récepteurs NMDA menant à une entrée non contrôlée de  $Ca^{2+}$  dans le

neurone (Damiano et al., 2010). L'une des conséquences néfastes de l'excès de calcium dans le cytosol neuronal est l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale, la libération de cytochrome C et l'activation des voies de mort cellulaire impliquant les calpaïnes et les caspases (Nicholls, 2009).

L'altération des fonctions mitochondriales dans la MH pourrait participer à l'excitotoxicité médiée par le système glutamatergique et participé à la dégénérescence neuronale.

ii) Dopamine et mitochondrie

D'autres systèmes de neurotransmission jouent probablement un rôle dans la pathogenèse et en particulier, la dopamine, présent à des concentrations élevées dans le striatum par rapport à d'autres zones du cerveau et avoir un rôle important dans la vulnérabilité sélective du striatum par le biais d'une interaction fonctionnelle avec des mitochondries (Jakel and Maragos, 2000).

Des études neurochimiques, électrophysiologiques et comportementales chez les patients MH et les modèles génétiques de souris suggèrent un changement bi phasique de la neurotransmission dopaminergique au cours de la maladie. Durant les premiers stades, la neurotransmission dopaminergique est augmentée conduisant aux mouvements hyperkinétiques qui peuvent être atténués en épuisant les stocks dopaminergiques (Spokes, 1980; Bedard et al., 2011). En revanche, durant les derniers stades de la maladie, les déficits en dopamine conduisent à l'hypokinésie (Kish et al., 1987). Les modifications dopaminergiques affectent la modulation du récepteur du glutamate et pourraient contribuer à l'excitotoxicité.

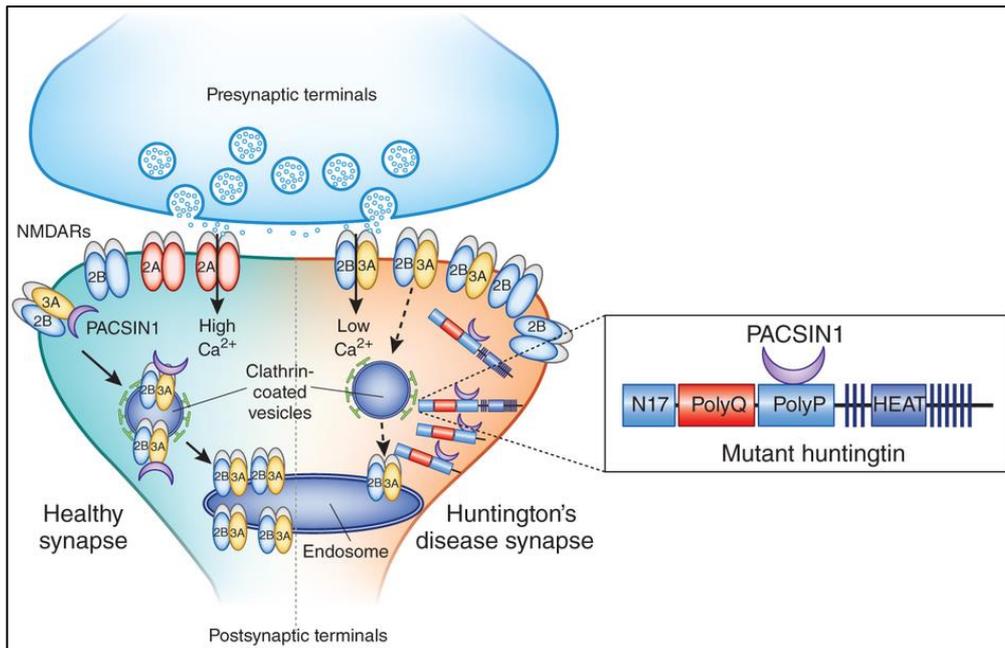
De plus il a été montré par des études de biologie cellulaire que la dopamine génère la production de radicaux libre par son oxydation (Charvin et al., 2005; Benchoua et al., 2008). Les radicaux libres pourraient être d'importants médiateurs de la mort des neuronaux striataux et la dopamine pourrait participer au stress oxydatif en étant elle-même une source de radicaux libres. Enfin, la dopamine peut activer la voie pro-apoptotique JNK (Luo et al., 1998). Recoupées avec les altérations mitochondriale, ces informations suggèrent que la voie dopaminergique, en produisant des radicaux libres, contribue au stress excitotoxique et participe à la neurodégénérescence des MSN dans la MH

iii) BDNF

Le mécanisme biologique moléculaire d'entrée du calcium n'est pas le seul responsable de l'apoptose induite par l'excitotoxicité.

Le BDNF est un facteur de croissance libéré par les neurones qui favorise la croissance des neurites et la formation de la colonne vertébrale dans le cerveau adulte (Lu et al., 2013a). Les neurones du striatum dépendent de la libération du BDNF par les axones en provenance des autres régions cérébrales. En effet, le striatum ne produit pas de BDNF, mais sa fonction proprement dite en dépend fortement. Au niveau des MSN, il y a une altération de la libération du BDNF et de son récepteur tyrosine kinase, TrkB (Zuccato et al., 2001).

Le rôle crucial de la HTT normale dans la transcription et le transport vésiculaire du BDNF est perturbée par la présence de la mHTT, et entraîne une réduction du support trophique pour le striatum (Gauthier et al., 2004; Baydyuk and Xu, 2014). Dans les neurones striataux exprimant la mHTT, il y a également une réduction du transport de TrkB aux dendrites, ce qui entraîne une diminution de la signalisation TrkB (Liot et al., 2013). Chez les patients atteints de la MH, l'expression du BDNF est réduite dans le cortex (Zuccato et al., 2001) et l'expression du récepteur de TrkB est réduite dans le striatum (Gines et al., 2006). Le BDNF est aussi important pour la potentialisation à long terme dans le striatum en activant les récepteurs TrkB situés sur les MSN (Jia et al., 2010b). A long terme, en l'absence de signal synaptique, les axones des MSN vont dégénérer et conduire à la mort du neurone menant à l'atrophie striatale (Conforti et al., 2013).



**Figure 13 : Exemple d'altération synaptique dans la maladie de Huntington.** La synapse glutamatergique saine dans le cerveau adulte (à gauche) présente la plupart des récepteurs NMDA. Ces récepteurs ont une haute perméabilité pour les ions  $\text{Ca}^{2+}$  et sont des médiateurs clés de la plasticité synaptique. La sous-unité développementale NR2B est, cependant, présente à beaucoup plus faible densité dans les synapses matures en raison de sa liaison avec PACSIN1 (*Protein Kinase C And Casein Kinase Substrate In Neurons 1*), qui assure la suppression de NR2B de la membrane synaptique par endocytose à clathrine. Dans les synapses MH (à droite), il y a une interaction forte entre la mHTT pleine longueur ou fragmentée avec PACSIN1 qui perturbe la suppression par endocytose des sous-unités NR2B de la membrane post-synaptique (Marco et al., 2013). L'augmentation de récepteurs NMDA contenant la sous-unité NR2B (qui induit une réduction de la perméabilité aux ions  $\text{Ca}^{2+}$ ) dans la synapse, ainsi que d'autres altérations des récepteurs NMDA (Okamoto et al., 2009; Milnerwood et al., 2010; Raymond et al., 2011), conduit à une toxicité synaptique et une cascade d'événements pathogènes qui contribuent aux déficits comportementaux et à la neurodégénérescence dans la maladie de Huntington (Daggett and Yang, 2013).

### 3.6. Altérations de l'autophagie

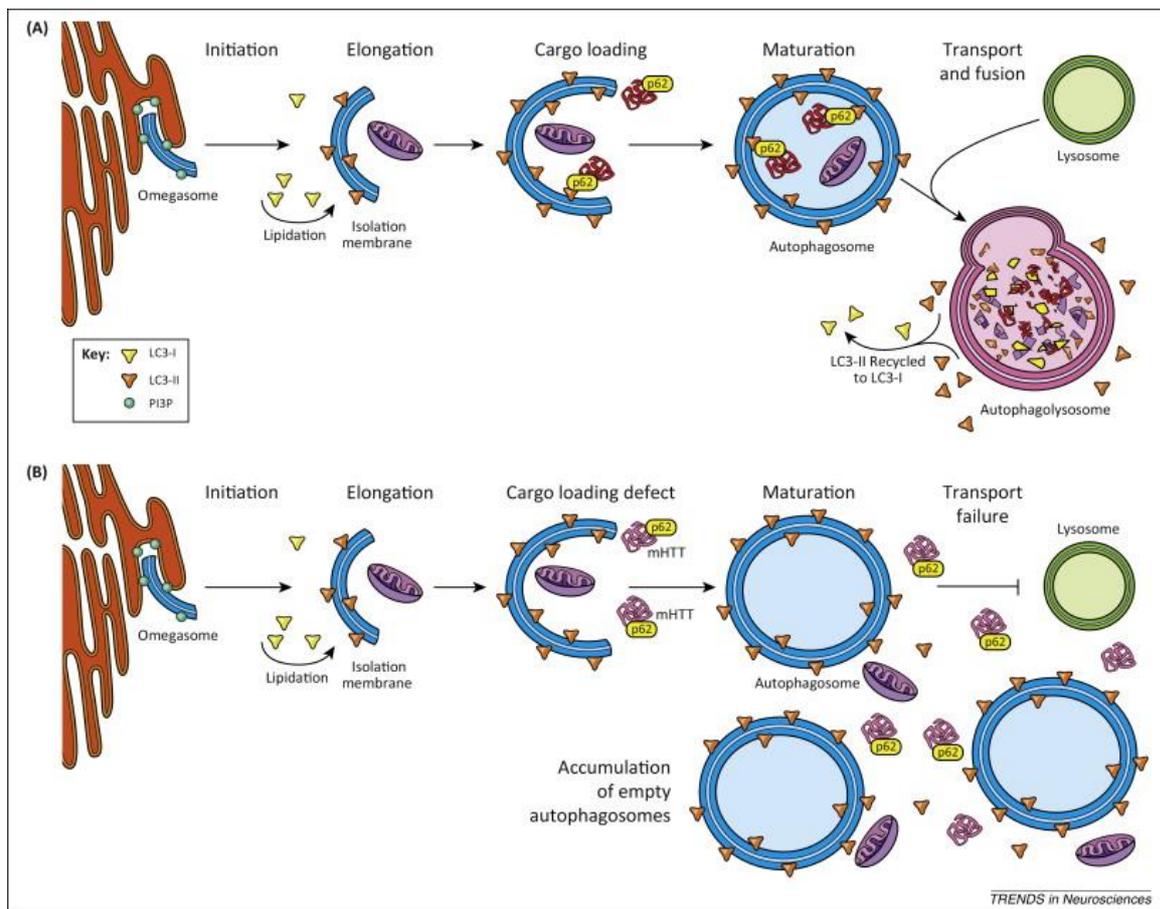
L'autophagie fait partie des voies importantes pour la dégradation de protéines mal conformées. L'autophagie se caractérise en 3 grandes types : l'autophagie coordonnée par les chaperons (*CMA-chaperon-mediated autophagy*), la microautophagie et la macroautophagie. La microautophagie implique la translocation des matériaux cytoplasmiques dans le lysosome via absorption direct au travers de la membrane du lysosome. Dans la CMA, les protéines solubles individuelles qui présentent un motif « KFERQ-like » sont sélectionnées par les chaperons, dépliées et puis transloquées au travers de la membrane lysosomale. L'internalisation des protéines par cette voie est assurée par la fonction coordonnée de protéines chaperons situées de part et d'autre de la membrane

lysosomale et par une protéine membranaire LAMP- 2A (*lysosome-associated membrane protein type 2A*) qui agit à la fois comme récepteur et comme une composante essentielle du complexe translocation. Enfin la macroautophagie, plus communément appelé « autophagie », a d'abord été décrite comme un mécanisme de nettoyage des agrégats protéiques. C'est un mécanisme activé lors de privation en nutriment afin de reconstituer les stocks énergétiques. La macroautophagie est le seul processus qui permet la dégradation de substrats très grands tels les organites, les microbes et les agrégats. Elle se décompose en trois étapes principales: 1) la formation d'un autophagosome, 2) la maturation et 3) la fusion avec les lysosomes. Pendant la formation de l'autophagosome, une membrane isolante se forme et peut englober des portions de cytoplasme contenant des protéines et des organelles entières. Une fois formé, ces autophagosomes sont transportés le long des microtubules pour finalement fusionner avec les lysosomes conduisant à la dégradation de la cargaison par les protéases lysosomales autophagiques (Martin et al., 2015). Longtemps considéré comme un système non sélectif, il apparaît que ce processus peut être très sélectif pour la dégradation des organites, des bactéries, des ribosomes, des protéines spécifiques et des agrégats de protéines par autophagie (Kraft et al., 2010; Lamark and Johansen, 2012). Dans l'autophagie sélective, un rôle important est joué par les protéines qui agissent comme des récepteurs de l'autophagie tels que p62 et NBR1 qui se lient directement à des homologues de ATG8 (*autophagy-related gene*) tel que la famille LC3 ou GABARAP.

La HTT normale est une protéine d'échafaudage nécessaire pour la macroautophagie dite sélective, mais n'est pas indispensable pour la macroautophagie non sélective (Rui et al., 2015). La HTT interagit avec le récepteur autophagique p62 et facilite son association avec LC3 et avec les substrats ubiquitylés sur la lysine-63. L'autophagie sélective au cours du stress atteint sa capacité maximale à la suite de la liaison de la HTT à ULK1, qui initie l'autophagie, ce qui libère ULK1 de la régulation négative par mTOR (*mammalian target of rapamycin*) (Rui and Le, 2015).

De nombreuses maladies neurodégénératives sont caractérisées par un flux autophagique faible, conduisant à l'accumulation des substrats autophagiques et induisant une toxicité cellulaire (Menziés et al., 2011). Cependant, dans le cadre de la MH, il y a une augmentation du nombre d'autophagosomes sans perturber (voire augmenter) le flux autophagique (Kegel et al., 2000; Martinez-Vicente et al., 2010). Il apparaît que la mHTT contribue à l'activation de l'autophagie dans la cellule, chez les rongeurs et chez des patients MH en séquestrant et en inactivant mTOR, une enzyme qui au travers du complexe mTORC1, contrôle la biosynthèse des protéines, conduisant à l'induction de l'autophagie (Ravikumar et al., 2006).

De manière intéressante, il a été montré que les autophagosomes sont en réalité dépourvus de contenu en raison d'un déficit dans la reconnaissance des cargos (Martinez-Vicente et al., 2010). Par conséquent, malgré une augmentation de l'initiation de la formation des vacuoles autophagiques, les protéines agrégées (tel que la mHTT) et les organites endommagés ne sont pas dégradés et continuent de s'accumuler dans le cytoplasme ce qui contribue à augmenter la toxicité et le stress dans les cellules (**Figure 14**).

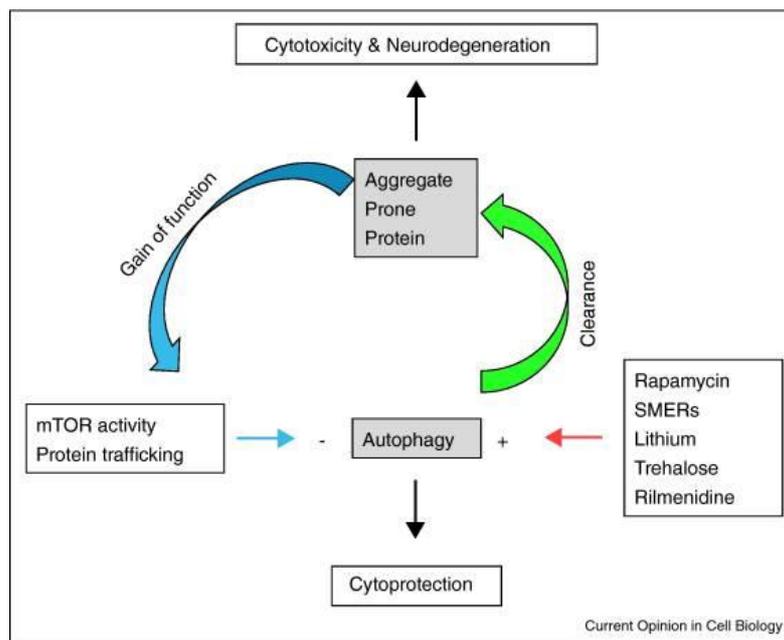


**Figure 14 : Altération de l'autophagie dans la maladie de Huntington. (A)** L'autophagie implique la formation de vésicules à double membrane qui incorporent des organites endommagés et des protéines toxiques ou agrégées, et fusionnent avec le lysosome pour la dégradation. **(B)** Dans la MH, il a été montré que l'autophagie est affectée à plusieurs étapes notamment un défaut de chargement des cargos, la perturbation du trafic des autophagosomes, et une diminution de la fusion entre autophagosomes (Martinez-Vicente et al., 2010).

De tels défauts mécanistiques dans la voie de l'autophagie pourraient éventuellement conduire à une boucle de rétroaction négative, où la présence de mHTT résulte en une dégradation par autophagie défectueuse et conduit à l'accumulation de mHTT, après quoi les cellules répondent par un mécanisme compensatoire qui tend à augmenter l'autophagie, ce qui au final, mène à la neurotoxicité (**Figure 15**).

Les défauts mécanistiques de l'autophagie dans la MH sont exacerbés par l'effet de la mHTT sur le trafic de vésiculaire. La mHTT perturbe la motilité des autophagosomes et empêche la fusion de ces derniers avec les lysosomes ce qui accroît leur nombre (Wong and Holzbaur, 2014). Il y a une diminution de l'interaction entre la mHTT et le complexe optineurine/Rab8 impliqué dans le trafic vésiculaire conduisant à des autophagosomes/lysosomes dysfonctionnels (del Toro et al., 2009). Il est encore difficile de savoir à quel moment de la pathogénicité, ces défauts fonctionnels sont prédominants. On peut très bien penser que la dynamique de fusion peut être affectée dès les premières phases de la maladie, et être surmontée par la suite au travers de mécanismes compensatoires, après quoi, l'échec de la dégradation de la mHTT par la machinerie autophagique conduit à l'augmentation de la neurotoxicité.

Alors que la macroautophagie est le mécanisme autophagique le plus couramment étudié, les autres voies autophagiques peuvent jouer un rôle important dans la MH. La mitophagie (Kim et al., 2007) se réfère à la dégradation sélective des mitochondries dysfonctionnelles dont une régulation positive serait donc bénéfique pour le devenir des cellules.



**Figure 15 : Modèle pour la régulation de l'autophagie dans les protéinopathies.** Un système interconnecté existe dans l'autophagie et est en mesure de contrôler les niveaux de protéines agrégées intracytoplasmiques (flèche verte). Cependant, ces protéines sont également en mesure de participer au contrôle du flux autophagique (flèches bleues). En outre l'autophagie peut aussi être régulée en utilisant des médicaments (flèche rouge). L'équilibre entre ces facteurs va modifier la survie des cellules.

Prise dans leur ensemble, il est clair qu'il y a une interaction complexe entre les multiples formes de l'autophagie dans la MH et que la présence de la mHTT peut perturber les voies autophagiques à plusieurs niveaux ce qui participe à l'accumulation des biomolécules endommagées au sein de la cellule et renforce le stress cellulaire (**Figure 15**).

Une grande interrogation est de savoir si toutes ces perturbations impactent sur la capacité du neurone à résister au stress induit par la présence de la mHTT.

## **Chapitre 3 - FOXO3 et Homéostasie Cellulaire**

Les gènes « *Forkhead box* », ou FOX, sont des gènes régulateurs de la transcription issus d'une ancienne famille évolutive nommée d'après le gène *Fork Head* de la drosophile (*fkh*). Des mutations dans le gène *fkh* entraînent un défaut dans le repliement de la tête au cours de l'embryogénèse, conduisant chez la drosophile adulte à un phénotype en tête de fourche (*fork head*) (Weigel et al., 1989). Des nombreux gènes FOX ont été identifiés dans des espèces différentes allant de la levure à l'humain en passant par *C. elegans* ; et ont été classés en sous-familles comme FOXO et FOXP.

Bon nombre de ces gènes ont des fonctions biologiques importantes au travers de ces espèces ; fonctions allant du cycle cellulaire à la différenciation de l'épithélium, et du développement du placenta à la formation de l'oreille interne. La conservation évolutive du domaine de liaison à l'ADN entre les membres orthologues de la famille des gènes FOX est remarquable. En effet, par exemple, on retrouve 90% de similitude entre le gène *fkh* de la drosophile et le gène humain *FOXA1*.

Denombreux gènes FOX sont mutés ou perturbés dans des maladies humaines entraînant des perturbations aussi bien dans l'organogenèse que dans l'acquisition du langage (Tuteja and Kaestner, 2007a, b). De plus, de récentes découvertes sur l'importance de la régulation des gènes FOX notamment dans le cancer du sein et de la prostate démontrent la grande contribution de ces gènes dans les processus primordiaux assurant la santé chez l'homme.

Au travers des prochains paragraphes, je tenterais de présenter nous allons tenter de comprendre comment les facteurs de transcription FOX et notamment ceux de la sous-famille O sont régulés et régulent les mécanismes d'homéostasie cellulaire.

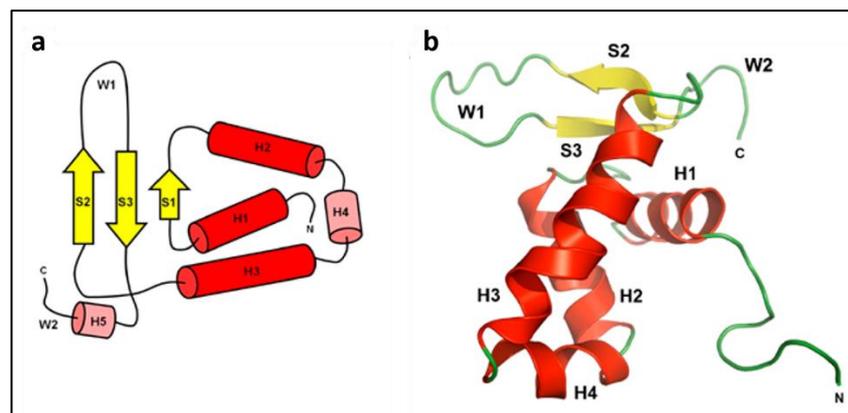
## **1. *Forkhead* : Facteur de transcription hautement conservé**

### **1.1. Découverte et classification des gènes FOX**

La caractéristique commune des facteurs de transcription FOX est un domaine de liaison à l'ADN d'environ 100 résidus, le domaine *forkhead* (FBHE – *Forkhead Binding Element*), domaine qui est hautement conservé entre tous les membres de la famille FKH. C'est la convergence des découvertes scientifiques issues de deux continents différents et de deux espèces différentes qui a conduit à l'indentification des premiers membres de cette famille de protéine de liaison à l'ADN, il y a de cela plus de 25 ans.

La première mention de la famille des facteurs de transcription FOX revient à Detfel Weigel et collègues en 1989 (Weigel et al., 1989) qui, en clonant le gène responsable du

phénotype *forkhead*, mirent en évidence un gène qui ne présentait pas les homéodomaines connus jusqu'alors. Peu de temps après, l'ADNc encodant pour le facteur hépatocytaire 3 $\alpha$  (*hepatocyte nuclear factor 3 $\alpha$*  - HNF3 $\alpha$ ), maintenant connu sous le nom de FOXA1, a été cloné chez le rat (Lai et al., 1990). De la même manière, la séquence de FOXA1 ne présentait elle aussi aucune similarité avec les motifs de liaison à l'ADN connus, comme ceux que l'on peut retrouver chez les récepteurs nucléaires ou les facteurs de transcription avec des motifs en doigts de zinc. Cependant, Lai et collègues (Lai et al., 1990) parvinrent à délimiter la région de fixation à l'ADN dans la protéine FOXA1 au niveau des acides aminés. Et en 1990, Weigle et Jäckle (Weigel and Jackle, 1990) mirent en évidence une étonnante similarité entre les 110 acides aminés centraux des protéines FOX de *D. melanogaster* et des mammifères. Il apparaît que cette séquence de 110 acides aminés contient la totalité du domaine de liaison à l'ADN identifié par Lai et collègues chez FOXA1, Weigle et Jäckle suggérèrent donc le nom de *forkhead domain* pour ce nouveau motif particulier de liaison à l'ADN.

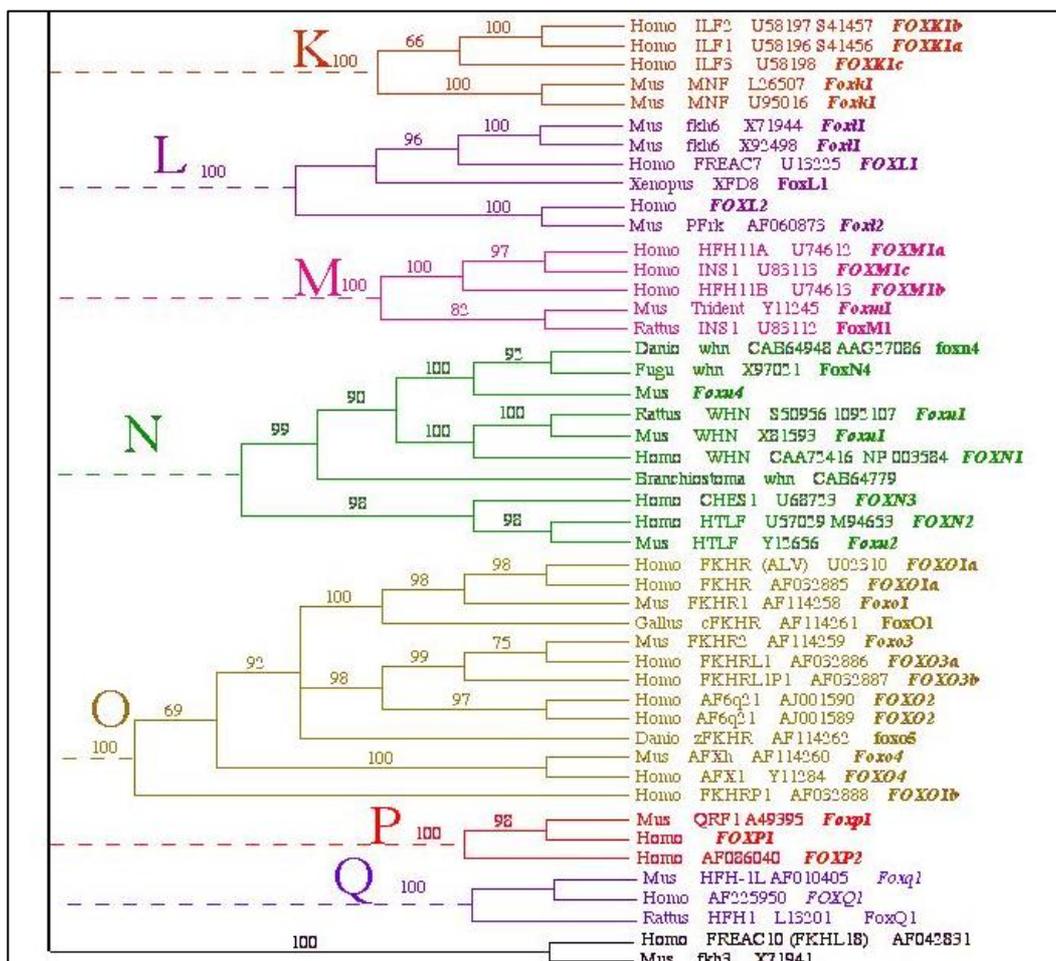


**Figure 16 : Structure tridimensionnelle du domaine *Forkhead*.** (a) Topologie du domaine *Forkhead*. Les hélices H4 et H5 ne sont présentes que dans certains domaines *Forkhead*. (b) Représentation en ruban du domaine *Forkhead* de FOXO4. L'agencement du domaine est : H1-H2-S1-S2-H3-W1-W2-S3. Le brin S1, qui est inséré entre les hélices H1 et H2, interagit avec les brins S2 et S3 pour former un feuillet  $\beta$  antiparallèle à trois brins torsadés. La partie N-terminale du domaine est formée par un groupe de trois hélices  $\alpha$ , tandis que la partie C-terminale est constituée des feuillets  $\beta$  S2 et S3 et deux grandes boucles (« wing » W1 et W2) qui ressortent du feuillet  $\beta$  (Obsil and Obsilova, 2008).

La structure du domaine canonique FBHE de liaison à l'ADN a été étudiée pour de nombreux gènes FOXs : FOXA1 (Cirillo and Zaret, 2007), FOXA3 (Clark et al., 1993), FOXD3 (Jin et al., 1999), FOXK1 (Tsai et al., 2006), FOXO3 (Tsai et al., 2007) ou encore FOXO4 (Boura et al., 2010). Il est composé de trois hélices  $\alpha$  (H1, H2, H3), trois feuillets  $\beta$  (S1, S2, S3) et deux régions « Wings » (W1 et W2) (Obsil and Obsilova, 2008) (**Figure 16**). La plupart des protéines se lient aux FOX en tant que monomères, en contact avec leurs séquences cibles au niveau de la troisième hélice  $\alpha$ , des résidus et au niveau des deux

régions « *Wings* » qui représentent « les ailes » de la protéine (Hannenhalli and Kaestner, 2009).

Au cours des dernières décennies, des centaines de gènes FOX ont été identifiés dans de nombreuses espèces et nommés de manière assez confuse par les chercheurs. Afin de fournir un système de classement permettant l'étude des gènes FKH ; en l'an 2000 un comité proposa une classification basée sur l'analyse phylogénétique de 172 protéines FOX au travers de 14 espèces différentes (incluant les multiples isoformes pour certaines protéines) (Kaestner et al., 2000). Basés sur les similarités présentes dans le domaine FBHE, les gènes FOX furent ainsi divisés en 15 sous familles allant de FOXA à FOXO. Depuis Kaestner et collègues en 2000, l'arbre phylogénétique s'est agrandi et comporte 4 classes supplémentaires – de FOXP à FOXS (<http://www.biology.pomona.edu/fox/>). A présent, 19 clades ont été identifiés et sont connus (**Figure 17**).



**Figure 17 : Arbre phylogénétique partiel des facteurs de transcription FOX chez les chordés basé sur l'analyse des séquences des domaines FBHE de liaison à l'ADN à partir de la méthode du *Neighbour-Joining*. La mesure de distance utilisée est la différence moyenne de caractères. L'arbre est enraciné en utilisant le gène HOMO QRF1 (AF086040) comme groupe de référence. Les chiffres sur les branches sont les**

pourcentages de *bootstrap*. Pour chaque protéine sont indiqués l'organisme, le nom, le numéro d'accèsion et le nom «FOX» (<http://www.biology.pomona.edu/fox/>).

## 1.2. Diversité fonctionnelle des gènes FOX

Bien qu'il existe une similarité dans leur domaine de liaison à l'ADN et donc dans leur motif de reconnaissance à l'ADN, les différentes protéines FOX ont acquis au cours de l'évolution une grande diversité fonctionnelle. En effet, quand les gènes d'une même famille se multiplient au travers d'événements de duplication, souvent les nouveaux membres évoluent et développent des fonctions distinctes du gène initial (Lynch and Conery, 2000). Cependant, chevauchements et redondances fonctionnels peuvent être maintenus pendant de très longues périodes évolutives comme c'est le cas pour FOXA1 et FOXA2 qui coopèrent pendant la morphogénèse des poumons et du foie (Lee et al., 2005; Wan et al., 2005) ; bien que les séquences protéiques FOX présentent plus de similarité entre elles que les séquences des domaines FBHE.

La diversité fonctionnelle des protéines FOX peut s'expliquer par le biais de deux facteurs. D'une part les protéines FOX peuvent interagir avec différents partenaires notamment des cofacteurs ou des enzymes de restriction. D'autre part, on explique aussi cette diversité par l'existence de profils d'expression qui varient de manière spatio-temporelle. En général, les facteurs de transcription paralogues possédant un motif similaire de liaison à l'ADN ont tendance à avoir des domaines d'expression divergents, de sorte que, dans un contexte cellulaire particulier, au maximum un des paralogues est fortement exprimé (Singh and Hannenhalli, 2008). Bien que de nombreuses études expérimentales aient démontré les fonctions précises d'un sous-ensemble de protéines FOX dans plusieurs espèces, une meilleure compréhension de l'évolution et de la diversification fonctionnelle de la famille FOX apparaît comme un objectif important à long terme.

Nom du gène Humain (localisation)	Régulé par:	Régule:	Implications développementales et cellulaires
FOXA1 (14q21.1)	FOXA2, FOXA3, RXRA, PMA, MSA, le86, INS1, NR0B2,DHT, POU5F1, FOXD3, GR, PRKACA, LRP5, ER	GCG, TCF1, TFF1, INS1, PRDM15, XBP1, PISD, COL18A1, NRIP1, ATP5J, DSCAM, NDUFV3, SOD1, LIN52, PFKFB1, ER	Différenciation des cellules épithéliales, morphogénèse de branchements, développement des poumons, du foie, de la prostate et du pancréas. Ouverture de la chromatine compacte par interaction avec les histones. Participe à la régulation des récepteurs aux oestrogènes.
FOXA3 (19q13.32)	TCF1, FOXA2, TCF2, PMA, le86, AGN194204, fénofibrate, acide Pirinixic, CLOCK, NR0B2, GR, PRKACA	FOXA1, FOXA2, TF, TAT, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4, SLC2A2, TCF1, NR3C1, albumine, PEPCK	Homéostasie du glucose cellulaire, réponse à la privation nutritionnelle, Ouverture de la chromatine compacte par interaction avec les histones.
FOXB1 (15q22.2)	CTNBN1		Développement du tube neural, processus d'innervation chez les mammifères.
FOXC2 (16q24.1)	LY294002, TNF, CITED2, Ins, IKBKG, IGF2, INSR, CHUK, NFKBIA, D98059, wortmannine, SHH, ER, PDGF-BB, MA	FABP4, CEBPA, PRKAR1A, PLIN, ADIPOQ, LFNG, UCP1, PPARGC1A, EFNB2, DLL1, MESP1, PPARA, NOTCH1, LC2A4, HES5	Prolifération cellulaire, développement des reins, du cœur, de l'uretère et du squelette
FOXD3 (1p31.3)	Acide rétinoïque, IL3, PAX3	FOXA1, FOXA2	Différenciation cellulaire du trophoblaste, développement placentaire
FOXE1 (9q22.33)	TSH, TNF, IFNG, Forskoline, IGF1, TG, A23187, Insuline, PMA, CREB1, Décabine, DH	TPO, SLC5A5, hormones thyroïdiennes	Développement de la glande thyroïde et du palais
FOXF2 (6p25.3)	IKBKB, IKBKG, CHUK, TITF1, NFKBIA, TNF, SMO	TITF1, NFKBIA, TNF, SMO, WNT5A, Col I, Collagène de Type IV, CTNBN1	Prolifération des cellules épithéliales, développement du colon
FOXG1 (14q12)	SH2B1, Insuline, Fsh, NGFB, acide oléique, AKT1, acide glutamique, INS, IGF1, OTX1, OTX2, GBX2, CHRD, NOG, LPS	BCL2L11, CDKN1A, CDKN1B, FASLG, CDKN2B, Cdkn2b, SERPINE1, FOXH1, SMAD2, RB	Différenciation neuronale, progression du cycle cellulaire, développement du prosencéphale
FOX11 (5q35.1)		SLC26A4, SLC4A9, SLC4A1, ATP6V1B1, SLC12A3	Développement de l'oreille interne
FOXK1 (7p22.1)			Régulation la progression du cycle cellulaire dans les progéniteurs myogénique
FOXN1 (17q11.2)	WNT5B, WNT4, BMP4, Noggin	FAM67A, SERPINB1, GZMA, MREG, IL7, TRG, PPP1R16B, C19ORF28, CD274, IVL	Prolifération des cellules épithéliales, différenciation des kératinocytes, développement des follicules pileux et du thymus.
FOXN4 (12q24.12)		NEUROD4, NEUROD1, PROX1	Induction neurale, genèse des cellules amacrine et horizontales
FOXO1 (13q14.11)	Akt, IGF1, LY294002, Insuline, IRS1, IRS2, wortmannine, PTEN, INS, PDK1, IL6, FOXO1A, C5b9, TNF, PGC1-α	CK1, BCL2L11, IGF1BP1, CDKN1B, FASLG, SERPINE1, TNFSF10, CXCR4, CCNG2, GADD45A, PRL, MYOD1, BCL2L1	Régulation la signalisation de l'insuline, inhibition de la prolifération cellulaire et/ou induction de l'apoptose, développement des vaisseaux sanguins, du diaphragme et du sac vitellin. Régulateur principal de l'équilibre redox et du contrôle des ostéoclastes.
FOXO2 (1p34.1)		Identique à FOXO3	
FOXO3 (6q21)	Akt, LY294002, IGF1, peroxyde d'hydrogène, PI3K, EPO, P53, SGK, IKBKB, CHUK, SHC1, IL3, DYRK1a, JNK3, STAT3, E2F1, SIRT1, PDGF, FGF	BCL2L11, CDKN1B, CCNG2, FASLG, FBXO32, CDKN1A, RBL2, GADD45A, FOXO3A, BNIP3L, SOD2, NOS2A, BBC3, HBP1, JNK3	Différenciation des érythrocytes, inhibition de l'activation spontanée des lymphocytes T et de l'auto-immunité; Inhibition de la prolifération et/ou induction de l'apoptose, régulation du cycle cellulaire,
FOXO4 (Xq13.1)	IGF1, JINK1/2, MAPK10, MAPK8, RALA, wortmannine, Akt, RGL2, LY294002, RALGPS1, Ras, naltrindole, INS1	CDKN1B, CDKN1A, VEGFA, BCL6, RBL2, CDC42EP3, LEMD3, GADD45B, SGK, OVOL1, EPO, GADD45A, CTGF, JAG1, IER3	Régulation négative de la prolifération cellulaire; progression du cycle cellulaire, différenciation cellulaire
FOXO6 (1p34.1)			Potentiation de la mémoire à long terme
FOXP2 (7q31)	En, GATA6, FOXP2	SFTPC, SCGB1A1, FOXP2	Développement du noyau caudé, du cervelet et du putamen
FOXP3 (Xp11.23)	TGFB1, Cd3, prostaglandine E2, CD28, cyclosporine A, Tcr, TGAL copolymère, PTGER4, CBLB, PTGER2, Flagelline, LEPR, PLP1, AG490, CTLA4	IL4, IL2, IL5, IL2RA, SMAD7, ITGAE, ERBB2, SELL, IgG2a, IgM, IgG1, CD40LG	Régulation du développement des lymphocytes T,
FOXQ1 (6p25.3)	flutamide, TITF1, DHT	Telokin	Régulation de la fonction des lymphocytes Natural Killer.

**Tableau 3 : Tableau représentant la diversité fonctionnelle retrouvée dans la famille des protéines FOX.** (Modifié d'après (Tuteja and Kaestner, 2007b, a) ainsi que l'ensemble de la littérature.)

## 2. Facteurs de transcription FOXO3

Les facteurs FOXO sont très étudiés pour leur rôle dans l'homéostasie cellulaire. D'abord identifiés chez l'Homme au travers des translocations chromosomiques qui conduisent aux rhabdomyosarcomes et à la leucémie myéloïde aiguë (Parry et al., 1994; Hillion et al., 1997), ils sont classés sous le terme de « *Forkhead Homologue in Rhabdomyosarcoma* » (FKHR). Par la suite, il a été montré que la voie Akt réprime FKHR (Paradis and Ruvkun, 1998; Brunet et al., 1999a; Tang et al., 1999). Des études portant sur le facteur DAF-16/FOXO (Furuyama et al., 2003) orientent alors la découverte chez l'homme de 3 facteurs orthologues. La première codification en fut alors : « AFX (acute-lymphocyticleukaemia-1 gène fusionné sur le chromosome X), FKHR (*Forkhead in rhabdomyosarcoma*) et FKHR-L1 (*FKHR-like 1*).

La sous-famille des facteurs de transcription FOXO est conservée de *C. elegans* aux mammifères. Chez *C. elegans*, on retrouve un gène FOXO (DAF-16) (Burgering and Kops, 2002) tandis que chez les mammifères on retrouve quatre gènes FOXO: FOXO1 (FKHR), FOXO3 (FKHRL1), FOXO4 (AFX) et FOXO6 (Anderson et al., 1998; Jacobs et al., 2003). Chez les mammifères, les protéines FOXO ont le même site de liaison à l'ADN et plusieurs cibles transcriptionnelles en commun. Néanmoins, elles présentent des fonctions biologiques distinctes et le répertoire des cibles varie beaucoup en fonction du type cellulaire et de l'espèce. Chez la souris, par exemple, l'inactivation de Foxo1 est associée à la mortalité embryonnaire et les souris ne survivent pas après E10.5 (Furuyama et al., 2004). Les souris *KO* pour Foxo3 survivent mais présentent un syndrome lymphoprolifératif, une inflammation des organes et pour les femelles, une infertilité liée à l'âge (Castrillon et al., 2003). En revanche, les souris *KO* pour Foxo4 et Foxo6 ne présentent pas de phénotype embryonnaire (Hosaka et al., 2004).

Les profils d'expression sont eux aussi spécifiques. L'expression de FOXO1 est élevée dans les tissus adipeux, l'utérus et les ovaires ; FOXO3 est fortement exprimé dans le cerveau, la rate et le cœur ; FOXO4 est fortement exprimé dans les muscles squelettiques et cardiaques, et FOXO6 est exprimé quasiment exclusivement dans le cerveau (Hoekman et al., 2006). Nous verrons que le modèle d'action qui émerge pour les facteurs FOXO est celui de facteurs de transcription qui ont un spectre d'action large mais relativement spécifique dans leur rôle de gardiens cellulaires en réponse aux signaux que reçoit la cellule, et que ce rôle peut avoir un impact sur plusieurs structures sub-cellulaires comprenant par exemple le noyau, les mitochondries et la synapse.

## 2.1. Mécanismes régulateurs de FOXO3

Les facteurs de transcription FOXO sont étroitement régulés de sorte que la régulation de leurs cibles est ajustée en fonction des conditions environnementales. Une des voies de régulation principale est la phosphorylation des protéines FOXO par Akt en réponse à l'insuline ou aux facteurs de croissance (voie Insuline/IGF-1 – IIS). La phosphorylation sur trois résidus favorise la rétention cytoplasmique des FOXO, ce qui inhibe la transcription. Les facteurs FOXO sont également phosphorylés par d'autres kinases. En plus des modifications post-traductionnelles (phosphorylations), les gènes FOXO se lient également à des complexes co-activateurs ou co-répresseurs et ils sont acétylés. Les protéines FOXO peuvent également être mono-ubiquitinylées dans des conditions de stress oxydatif, ce qui augmente leur activité transcriptionnelle. Enfin, les FOXO sont également poly-ubiquitinylés et ciblés pour dégradation par le protéasome. Dans les paragraphes suivants, nous mettrons en lumière les voies de signalisation qui régulent l'activité transcriptionnelle de FOXO3.

### i) Régulation de la localisation sub-cellulaire de FOXO3.

Après que l'insuline, IGF1 ou d'autres facteurs de croissance se lient à leur récepteur tyrosine-kinase et activent la *phosphoinositide 3-kinase* (PI3K), plusieurs sérines-thréonines-kinases qui comprennent entre autres les protéines de la famille Akt et *Serum and Glucocorticoid regulated Kinase* (SGK) sont activées (Cantley, 2002). Tous les membres de la famille FOXO contiennent trois sites consensus de phosphorylation (RXRXXS / T) de Akt : une thréonine (T32) N-terminale, une sérine FBHE (S253) et une sérine (S315) C-terminale. T32 et S253 sont nécessaires pour l'export nucléaire des FOXOs et la liaison aux protéines 14-3-3 (Walker et al., 1998; Brunet et al., 1999a; Kops and Burgering, 1999; Brownawell et al., 2001; Rena et al., 2002). La sérine S253 est nécessaire pour la phosphorylation des deux autres. La phosphorylation de la sérine S315 par Akt/SGK provoque l'exportation du noyau vers le cytoplasme de FOXO3 (Brunet et al., 2001; Rena et al., 2002). Au travers d'une liaison avec les protéines 14-3-3 qui se lient à FOXO3 phosphorylé (Brunet et al., 1999a; Brunet et al., 2002), FOXO3 est exporté vers le cytoplasme suite à un changement conformationnel qui expose le signal d'export nucléaire et entraîne une interaction entre FOXO3 et l'exportine/GRC1 (Brunet et al., 2002). D'autre part, les protéines 14-3-3 peuvent également bloquer l'import nucléaire en masquant le signal de localisation cellulaire (Brownawell et al., 2001; Brunet et al., 2002). SGK est régulé au niveau transcriptionnel et protéique par le sérum, les glucocorticoïdes et le stress au travers de la voie de signalisation PI3K/PDK1 (Brunet et al., 2001; Leong et al., 2003). Il s'avère que les protéines Akt et SGK ont des substrats identiques, ce qui rend difficile de distinguer leurs activités respectives. Cependant le fait que SGK soit activé par autant de stimuli différents, l'absence d'un

domaine d'homologie à la pleckstrine dans sa structure et une phosphorylation majoritaire sur la sérine S315, permet vraisemblablement de différencier leur rôle *in vivo* (Kobayashi and Cohen, 1999; Brunet et al., 2001).

ii) Autres types de phosphorylation de FOXO3

D'autres kinases régulent l'activité des facteurs de transcription FOXO :

La *Casein Kinase 1* (CK1) phosphoryle les sérines S318 et S321. La phosphorylation par Akt du site S315 C-terminal est essentielle pour la phosphorylation des deux autres sérines par CK1 (Rena et al., 2002). CK1 peut être activée suite à des dommages de l'ADN (Santos et al., 1996; Zhu et al., 2014) et en inhibant l'activité transcriptionnelle de FOXO3, peut participer à l'inhibition du cycle cellulaire entre autre, permettant probablement la réparation de l'ADN.

La kinase *Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1A* (DYRK1a) phosphoryle la sérine S644 (Greer and Brunet, 2005). DYRK1a est une serine-thréonine kinase dont la fonction n'est pas encore très bien caractérisée mais qui semble impliquée dans diverses fonctions neurodéveloppementales et dans la physiologie du cerveau adulte (Becker and Sippl, 2011). Un des sites de phosphorylation de DYRK1a est présent sur FOXO3 au niveau de la S325. Ce site est adjacent aux deux sites de phosphorylation par CK1 (S318 et S321) et est constitutivement phosphorylé (Woods et al., 2001; Rena et al., 2002).

La voie pro-apoptotique *c-Jun N-terminal kinase* (JNK) régule de manière positive l'activité de daf16/FOXO3 chez *C. elegans* et chez la drosophile, l'activation de la voie JNK augmentant fortement l'espérance de vie dans ces deux espèces. Il a été démontré que JNK antagonise la voie PI3K/Akt et favorise la translocation nucléaire de DAF-16/FOXO3 pour réguler la durée de vie chez les invertébrés (Oh et al., 2005; Wang et al., 2005; Huang and Tindall, 2007). JNK régule FOXO3 à différents niveaux (Essers et al., 2004; Wang et al., 2005). i) L'activation de JNK *in vitro* induit la phosphorylation de la sérine S184 de 14-3-3 et conduit à la dissociation de FOXO3 et de 14-3-3 dans le cytoplasme, et permet la relocalisation nucléaire de FOXO3 (Sunayama et al., 2005). Cette translocation nucléaire induit la transcription de gènes cibles de FOXO3 telle que la protéine pro-apoptotique de la famille BCL2, Bim (*Bcl-2-interacting mediator of cell death protein*) (Ness et al., 2006). ii) JNK régule FOXO3 au travers de l'activation de MST1. JNK phosphoryle MST1 sur la serine S82 et MST1 phosphoryle à son tour FOXO3 qui active les voies pro-apoptotiques (Bi et al., 2010). 3). iii) Des mécanismes supplémentaires régissant la fonction FOXO3 par JNK

pourraient être liés à la régulation de la protéine Akt ou de certaines phosphatases qui participeraient à la déphosphorylation de FOXO3 (Li et al., 2015).

Parmi les kinases qui modulent la régulation des FOXO, on peut noter la MST (*Mammalian Sterile20-like*) qui est impliquée dans le contrôle de la croissance (Lehtinen et al., 2006), l'AMPK (*AMP-activated protein Kinase*) qui est activée à la suite d'un ratio élevé AMP/ATP (Apfeld et al., 2004; Greer et al., 2007) et la voie p38MAPK (*p38 Mitogen-Activated Protein kinase*) qui influence l'immunité innée et la réponse au stress chez *C. elegans* (Troemel et al., 2006).

### iii) Dégradation de FOXO3

Bien que le facteur de transcription FOXO3 soit régulé majoritairement par des changements réversibles de sa localisation sub-cellulaire, la dégradation de FOXO3 représente un niveau de régulation supplémentaire irréversible qui accompagne souvent la transformation cellulaire (Hu et al., 2004b; Huang et al., 2005).

La dégradation des facteurs de transcription FOXO est médiée par la voie ubiquitine-protéasome (Matsuzaki et al., 2003; Plas and Thompson, 2003; Aoki et al., 2004; Hu et al., 2004b; Huang et al., 2005) et requière Akt (Huang et al., 2005). Cependant, il semblerait que des complexes spécifiques d'E3 ubiquitine-ligase sont nécessaires pour la dégradation des différents membres de la famille FOXO. Skp2, une sous-unité du complexe SCF (Skp1/Cul1/F-box) E3 ubiquitine-ligase, ne se lie que sur FOXO1. MDM2, une autre E3 ubiquitine ligase spécifique serait impliquée dans la dégradation par ubiquitinylation de FOXO3 après phosphorylation par ERK (Yang et al., 2008; Fu et al., 2009).

FOXO3 peut également interagir et être phosphorylé par la kinase I $\kappa$ B ( $I\kappa\beta$ ), indépendante de l'activité PI3K (Hu et al., 2004a). I $\kappa$ B induit la phosphorylation de FOXO3 au niveau de la sérine S644 et conduit à l'ubiquitinylation et la dégradation de FOXO3 (Hu et al., 2004a).

### iv) Acétylation de FOXO3 : rôle des sirtuines

Les facteurs de transcription FOXO sont étroitement régulés par un jeu de phosphorylation. Cependant, cet équilibre ne suffit pas à lui seul à rendre compte de toutes les différentes actions de facteurs de transcription FOXO. En effet, un niveau supplémentaire de régulation des gènes FOXO est leur liaison à des complexes co-activateurs ou co-répresseurs et les modifications ultérieures des niveaux d'acétylation des FOXO.

Une série d'études a mis en évidence un lien entre les facteurs FOXO et la famille des dé-acétylases SIR2 (Brunet et al., 2004; Daitoku et al., 2004; van der Horst et al., 2004). La

famille SIR2 code pour des dé-acétylases de classe III qui utilisent le NAD<sup>+</sup> comme cofacteur (Imai et al., 2000). Chez la levure, les vers et les mouches, l'expression de SIR2 prolonge la longévité (Kaeberlein et al., 1999; Guarente, 2000; Rogina and Helfand, 2004; Wood et al., 2004). Dans les cellules de mammifères, FOXO3 et SIRT1 (*silent mating type information regulation 2 homolog*) interagissent en réponse au stress oxydatif. SIRT1 catalyse directement la dé-acétylation de FOXO3 *in vitro* et participe à la dé-acétylation de ces facteurs dans les cellules *in vivo* (Brunet et al., 2004; Daitoku et al., 2004; Motta et al., 2004; Wang et al., 2012).

Les effets de SIRT1 sur la fonction des FOXO semblent varier en fonction des gènes cibles de FOXO. Par exemple, la dé-acétylation de FOXO par SIRT1 augmente l'activité transcriptionnelle de FOXO3 (Daitoku et al., 2004; van der Horst et al., 2004; Kitamura et al., 2005). D'autres études montrent que la présence de SIRT1 a donné lieu à une régulation négative de l'activité transcriptionnelle de FOXO3 (Motta et al., 2004; Wang et al., 2012; Wang et al., 2015). Cependant la forme dé-acétylée de FOXO3 était facilement ubiquitinylée et dégradée, ce qui compenserait l'augmentation de l'activité transcriptionnelle (Wang et al., 2012; Wang et al., 2015). Par conséquent, l'activité de FOXO3 est régulée de façon fine par plusieurs facteurs, les contradictions apparentes sur la répression ou l'activité de FOXO3 sont sans doute liées à des régulateurs qui restent à identifier.

#### v) Régulateurs amont de FOXO3

Bien que FOXO3 soit exprimé de façon ubiquitaire dans tous les tissus, son niveau d'expression varie en fonction du type cellulaire et des conditions physiologiques, ce qui suggère que transcription et traduction de FOXO3 sont contrôlées avec précision. Contrairement à la fonction transcriptionnelle bien caractérisée de FOXO3, on en savait peu sur la façon dont l'expression de FOXO3 lui-même est régulée.

E2F-1 est le premier facteur de transcription identifié qui active la transcription de FOXO3 (Nowak et al., 2007). On retrouve deux sites de liaison à E2F-1 dans le promoteur de FOXO3. E2F-1 se lie aux promoteurs *in vivo* et induit la transcription du gène endogène FOXO3 (Nowak et al., 2007).

STAT3 est un régulateur transcriptionnel de FOXO3 : Il se lie au promoteur de FOXO3 et augmente sa transcription, ce qui empêche la prolifération des lymphocytes T et contribue à la quiescence lymphocytaire (Oh et al., 2011).

FOXO3 interagit aussi avec le facteur de transcription et suppresseur de tumeur P53 (You et al., 2004; You et al., 2006a). P53 induit la transactivation directe du gène FOXO3 et

ces deux facteurs de transcription peuvent fonctionner ensemble au sein d'un vaste réseau de régulation au cours du vieillissement (Renault et al., 2011).

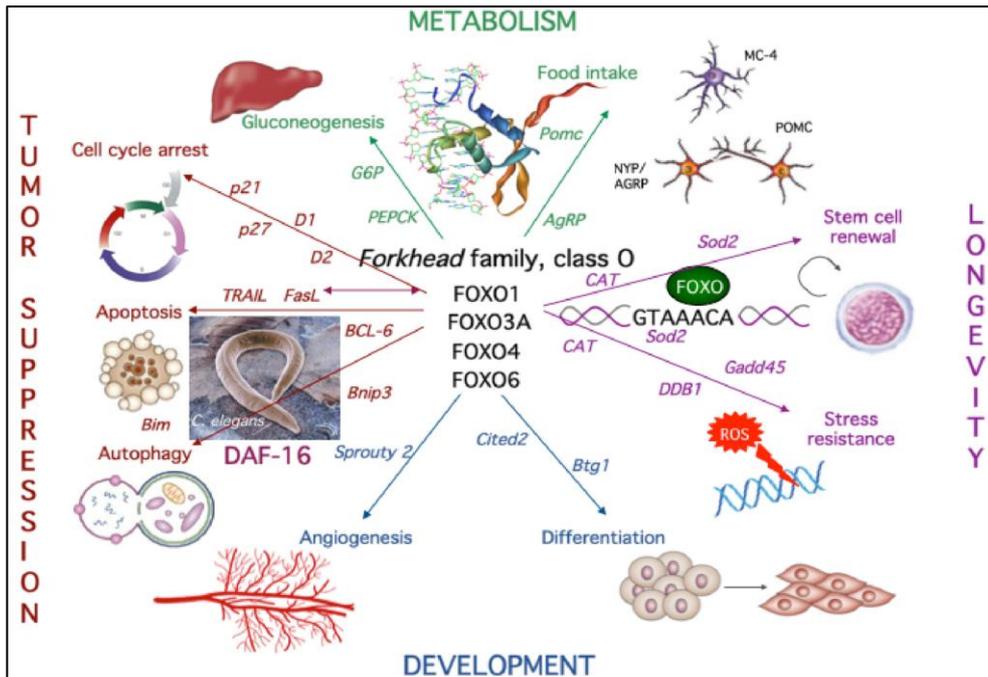
Curieusement, on retrouve dans les promoteurs du gène FOXO3 des domaines FBHE, ce qui laisse supposer que FOXO3 stimule sa propre transcription formant ainsi une boucle de rétroaction positive.

Autres régulateurs de FOXO3, PDGF (*Platelet Derived Growth Factor*) et FGF (*Fibroblaste growth factor*) activent la voie PI3K, et déclenchent ainsi la séquestration de FOXO3 dans le cytoplasme, ce qui perturbe la transcription des gènes qui sont FOXO-dépendant, et régule positivement la voie prolifération cellulaire (Essaghir et al., 2009).

L'ensemble des régulations de FOXO3 (phosphorylation/déphosphorylation, acétylation/dé-acétylation, dégradation, activation transcriptionnelle) interviennent toutes dans un cadre de maintien de l'homéostasie cellulaire, et les nombreuses interconnexions entre les différentes régulations démontrent l'importance qu'un équilibre stable doit être trouvé et maintenu au sein de la cellule pour s'assurer de la qualité des processus médiés par la régulation du facteur de transcription FOXO3.

## **2.2. Mécanismes régulés par FOXO3**

Les caractéristiques et le rôle des facteurs de transcription FOXO ont été largement étudiés et ont récemment permis de mettre en évidence l'importance de la famille FOXO dans de nombreux processus cellulaires et moléculaires. Ils peuvent activer ou inhiber la transcription de gènes cibles impliqués dans la régulation du stress oxydatif, de la protéostase, de la prolifération cellulaire, de l'autophagie, du métabolisme et de l'inflammation (van der Horst and Burgering, 2007), à savoir des processus biologiques qui sont altérés dans la MH. Les FOXO sont des promoteurs de la survie cellulaire si le stress cellulaire est gérable. Dans le cas contraire, ils sont capables de déclencher la mort cellulaire (Webb and Brunet, 2014). Dans ce paragraphe, nous allons explorer les fonctions qui sont sous contrôle de FOXO3 (**Figure 18**).



**Figure 18 : Représentation de l'implication des facteurs de transcription FOXO au sein de l'organisme.** Les facteurs de transcription FOXO sont impliqués dans un ensemble complexe de régulations à la fois tissus spécifiques et systémiques. On peut noter leurs implications dans les processus développementaux, métaboliques, supprimeurs de tumeur et leur forte implication dans les processus de longévité notamment dans le maintien des pools de cellules souches (Monsalve and Olmos, 2011).

### 2.2.1. Régulation du cycle cellulaire

#### i) Régulation de la famille CIP/KIP

La régulation temporelle du cycle cellulaire se fait par des activations séquentielles d'une famille de sérine-thréonine kinase appelée CDK (*Cyclin dependent kinase*). De nombreuses CDK inhibitrices (CDKI) sont nécessaires pour assurer une activation précise des CDK pendant les différentes phases du cycle cellulaire (Lee and Kim, 2009). La perturbation du contrôle du cycle cellulaire est retrouvée de manière quasi universelle dans les cancers et notamment la surexpression de CDKI p27/KIP1 (CDKN1B) qui inhibe le complexe cyclin E-CDK2 (Belletti et al., 2005). Dans les cellules quiescentes, FOXO, localisé dans le noyau peut se lier au promoteur de CDKN1B et initier sa transcription (Medema et al., 2000). Comme nous l'avons vu, en réponse aux facteurs de croissance, FOXO3 est phosphorylé, exporté et retenu dans le cytoplasme ce qui lève l'inhibition transcriptionnelle CDKN1B et permet la prolifération cellulaire (Dijkers et al., 2000b). L'activation de FOXO3 est suffisante pour accroître les niveaux d'ARNm et de protéines de CDKN1B, et ainsi induire l'apoptose (Medema et al., 2000). FOXO3 module la sortie ou l'entrée dans le cycle cellulaire des cellules quiescentes en régulant aussi les membres de la

famille du rétinoblastome p130 (Kops et al., 2002a). Conformément à son rôle dans l'arrêt du cycle cellulaire, FOXO3 seul s'avère incapable d'induire l'arrêt en phase G1 dans des fibroblastes CDKN1B/p130 déficients, ce qui suggère que CDKN1B et p130 sont les deux médiateurs critiques à l'arrêt du cycle cellulaire FOXO-dépendant.

Une autre cible de FOXO3 est le gène qui code pour la CDKI p21WAF1/CIP1 (p21<sup>Cip1</sup> - p21<sup>Waf1</sup>). Le promoteur de p21WAF1/CIP1 contient à la fois un site de liaison Smad (*Smad Binding Element* – SBE) ainsi qu'une séquence consensus FBHE (T (G/A) TT (T/G) (G/A) (T/C)) située immédiatement en amont du site de liaison Smad (Seoane et al., 2004). En réponse au TGFβ, FOXO3 se lie spécifiquement aux Smad 3 et 4. Ce complexe se lie sur les sites de liaison FBHE et SBE du promoteur p21WAF1/CIP1 entraînant l'arrêt du cycle cellulaire à la transition G1/S (Arden, 2004; Seoane et al., 2004). FOXO3 inhibe la prolifération des cellules dans les leucémies aiguës myéloblastiques en activant la transcription des récepteurs de mort Fas-L et de p21WAF1/CIP1 tandis que l'activité de la kinase Iκκβ maintient FOXO3 dans le cytoplasme ce qui démontre le rôle important de FOXO3 dans la régulation de la prolifération et la survie des cellules et notamment pour les cellules des leucémies aiguës myéloblastiques (Chapuis et al., 2010).

FOXO3 est donc un acteur clé dans l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 en régulant positivement les CDKI (p21WAF1/CIP1 et CDKN1B) entraînant une régulation négative des CDK du cycle cellulaire.

## ii) Régulation de la famille INK et des cyclines

Les facteurs de transcription FOXO régulent également les CDKI de la famille INK4 comme p15 et p19. Les CDKI INK4 se lient et inhibent spécifiquement le complexe de la cycline CDK-4/6. Katayama et collègues ont montré que la protéine Akt inhibe l'expression des CDKI p15 et p19 en phosphorylant FOXO3 (Katayama et al., 2008). Autre élément intéressant, FOXO3 peut également favoriser l'arrêt du cycle cellulaire en réprimant les cyclines D1 et D2 (respectivement CDK1 et CDK2), des éléments régulateurs positifs du cycle cellulaire (Ramaswamy et al., 2002; Schmidt et al., 2002).

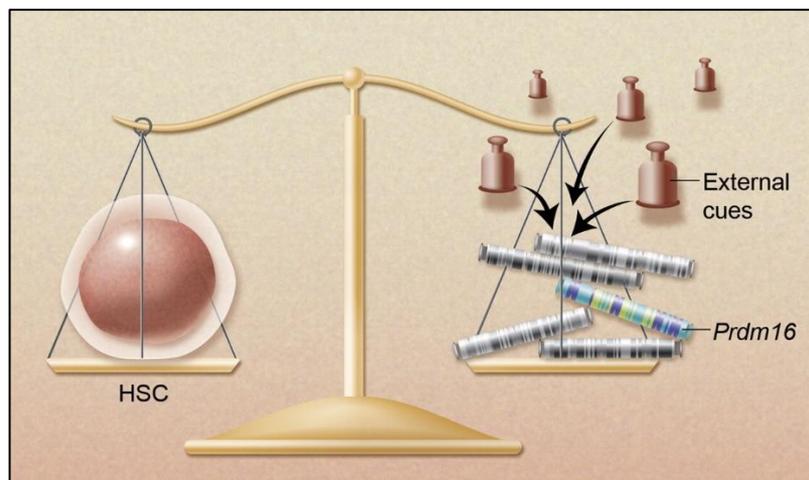
FOXO3 régule également l'expression des gènes mitotiques tels que la cycline B et les *polo-like kinases* (Plk) (Alvarez et al., 2001). Puisque les Plk sont impliquées dans le processus mitotique et le maintien de l'intégrité de l'ADN, leur régulation par FOXO3 souligne encore un rôle important des facteurs de transcription FOXO dans le contrôle du cycle cellulaire chez les mammifères.

FOXO3 active la transcription de la cycline G2, homologue de la cycline G1, qui contrairement aux cyclines classiques, est connue pour induire l'arrêt du cycle cellulaire. La

régulation positive de la cycline G2 par les FOXO est associée à la transcription induite par la voie PTEN/Akt impliquée dans l'apoptose (que nous décrirons dans quelques paragraphes (van Duijn et al., 2010).

iii) Intégrité du pool de cellules souches

De nombreuses études suggèrent que l'état de repos des cellules souches est fortement dépendant d'une régulation fine et précise de leur statut métabolique. Par exemple, les cellules souches hématopoïétiques résident dans des niches hypoxiques au sein de la moelle osseuse, où une faible consommation d'oxygène et une faible production de ROS peuvent promouvoir leur quiescence. En outre, plusieurs gènes connus pour moduler le stress oxydatif et les niveaux de ROS dans les cellules souches tels que *Polycomb* Bmi1 et les *FOXO* sont nécessaires pour préserver le pool de cellules souches hématopoïétiques (Park et al., 2003; Tothova et al., 2007) (**Figure 19**).



**Figure 19 : Equilibre pour le maintien des niches de cellules souches.** Une poignée de gènes sont connus pour être nécessaires pour le maintien et l'intégrité des cellules souches hématopoïétiques : PRDM16, Bmi1, EVI1, PBX1, Gfi1 et les facteurs de transcription FOXO. Une activité équilibrée de ces facteurs nucléaires préserve l'état des cellules souches, mais est constamment remis en cause par des signaux externes et le stress environnemental (Jansson and Larsson, 2011).

Comme nous venons de le décrire, FOXO3 est important dans le contrôle du cycle cellulaire au niveau des check-points G1-S et G2-M en modulant directement la transcription des protéines qui régulent ces transitions : p130, la cycline G2, CDKN1B, p21WAF1/CIP1 et cycline D2 (Tothova et al., 2007).

Les anomalies du cycle cellulaire des cellules souches hématopoïétiques suite à l'invalidation des *FOXO* sont susceptibles d'avoir des conséquences importantes dans le destin de ces cellules. Des animaux présentant un *KO* conditionnel pour FOXO1/3/4 ont une population cellulaire en G0 diminuée et un nombre réduit de cellules souches

hématopoïétiques. On retrouve ces caractéristiques chez des adultes *KO* pour FOXO3, ce qui suggère que les cellules souches FOXO-déficientes sont incapables de rentrer correctement dans le cycle cellulaire et présentent de ce fait une perturbation de leur capacité d'auto-renouvellement. De plus, il y a une augmentation du nombre de cycles cellulaires ce qui suggère que ces cellules sont incapables de quitter le cycle cellulaire en l'absence de FOXO3 et s'accumulent en phase S/G2/M. Ces cellules sont sorties de leur état de quiescence et incapables d'y ré-entrer, ce qui mène à l'épuisement du pool de cellules souches.

On retrouve aussi une altération de l'auto-renouvellement dans les cellules souches du muscle squelettique, ou «cellules satellites». Gopinath et collègues révèlent qu'une diminution de FOXO3 dans les cellules quiescentes induit une régulation négative de la voie de signalisation NOTCH, un régulateur clé de la quiescence des cellules satellites. A l'inverse, la surexpression du domaine intracellulaire de NOTCH (NICD) permet d'améliorer la capacité d'auto-renouvellement des cellules satellites déficientes en FOXO3. FOXO3 régule l'expression des récepteurs NOTCH1 et NOTCH3, ce qui suggère que FOXO3, via l'activation de la voie NOTCH, assure l'état de quiescence des cellules satellites au cours du processus de régénération musculaire chez l'adulte. (Gopinath et al., 2014).

FOXO3 régule l'arrêt du cycle cellulaire au niveau des phases de transition G1/S (p21WAF1/CIP1 - CDKN1B – CDK2) et G2/M (Cycline G2 – CDK1) deux points de contrôle qui sont essentiels dans la réponse cellulaire au stress. Une régulation fine de FOXO3 est nécessaire pour maintenir un équilibre entre apoptose et prolifération cellulaire. Ces observations sont en lien avec la fonction de FOXO3 dans la promotion de la résistance au stress et la longévité. Il y a une forte implication des facteurs de transcription FOXO dans le vieillissement des organismes évolués et leur implication maligne sur la biologie des cellules souches.

### **2.2.2. Réponse anti-oxydante**

Au vu du paragraphe Dysfonction mitochondriale, la mutation de la HTT est à l'origine d'un défaut mitochondrial entraînant une altération du métabolisme énergétique. La perturbation de la production d'énergie mitochondriale augmenterait la production de radicaux libres, qui à son tour conduirait à une augmentation du stress oxydatif.

Le stress oxydatif est causé par le déséquilibre dans la production de ROS et par l'incapacité du système biologique à se détoxifier de ces espèces et réparer les dommages causés. Les effets du stress oxydatif dépendent de son impact sur le système cellulaire, si le système est en mesure de retrouver, ou non, son état d'origine. Cependant, des niveaux

élevés de stress oxydatif peuvent provoquer une nécrose, une avarie en ATP, et induire la mort par apoptose (Beal, 2005). Dans des conditions normales la plupart des cellules sont maintenues dans un environnement réducteur par des enzymes. Tout déséquilibre dans l'état normal d'oxydo-réduction conduit à une toxicité via la production de radicaux libres et de peroxydes (constituant des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote) endommageant les protéines, les lipides et l'ADN de la cellule. Ainsi, pour maintenir l'homéostasie cellulaire appropriée, un équilibre doit être trouvé entre la production d'oxygène réactif et sa consommation. Les ROS en excès doivent être soit inactivés en étant convertis en molécules métaboliquement non destructives ou être balayés/neutralisés juste après leur formation. Ce mécanisme de protection appelé système de défense anti-oxydant prévient l'apparition de dommages causés par les radicaux libres à l'origine du vieillissement et de diverses maladies (Yu, 1994).

FOXO3 permet de lutter contre le stress oxydatif en augmentant notamment la transcription de SOD2 (*superoxyde dismutase 2, mitochondrial*) et de la catalase 2, des enzymes qui neutralisent les ROS (Kops et al., 2002b). Accroître la détoxification de l'organisme favorise la survie cellulaire dans un environnement défavorable. Cette détoxification est aussi régulée par l'inhibition de l'activité transcriptionnelle de MYC par FOXO3 ce qui entraîne une réduction du nombre de copies d'ADN mitochondrial de protéines mitochondriales, des complexes mitochondriaux et de l'activité mitochondriale et mène à la diminution de la production des ROS (Ferber et al., 2012; Liu et al., 2015b).

FOXO3 a un rôle clé dans la transduction du signal des voies associées au stress et au vieillissement. Ceci illustre parfaitement le fait que l'activité de FOXO3 est fortement régulée par les signaux de stress cellulaire et particulièrement le stress oxydatif, ce qui conduit finalement à moduler la durée de vie des organismes. Le stress cellulaire entraîne l'induction de kinases spécifiques (voir paragraphe Mécanismes régulateurs de FOXO3) liées au stress qui activent FOXO3 par phosphorylation. Une perturbation de l'activité transcriptionnelle de FOXO3 peut perturber les mécanismes qui détoxifient l'organisme en ROS et renforcer le stress oxydatif, notamment le stress induit par une protéine mal conformée telle que la mHTT.

### **2.2.3. FOXO3 et longévité**

FOXO3 est généralement reconnu comme un «master» gène dans le vieillissement depuis que son association avec la longévité a été validée dans plusieurs organismes et des populations humaines (Kenyon et al., 1993; Castrillon et al., 2003; Giannakou et al., 2004; Greer and Brunet, 2005).

Chez l'homme, de nombreuses études biodémographiques ont établi qu'un groupe de polymorphismes nucléotidiques simples (SNP) du gène *FOXO3* a été associé à la longévité humaine, mais la variante fonctionnelle réelle est encore inconnue. Dans un échantillon d'hommes hawaïens d'origine japonaise présentant une longue durée de vie, trois polymorphismes nucléotidiques simples (SNP) du gène *FOXO3* (rs2764264, rs13217795 et rs2802292) se sont avérés être associés à la longévité (Koropatnick et al., 2008; Willcox et al., 2008). Cette corrélation entre longévité humaine et variations génétiques de *FOXO3* a également été identifiée dans une étude de centenaires et nonagénaires allemands, dans laquelle quatre SNP (rs2802288, rs2883881, rs12200646 et rs13220810), qui ne se recoupent pas avec ceux du groupe japonais, étaient significativement associés à la longévité dans les deux sexes. De plus il apparaît que ces SNP sont plus fréquents chez les centenaires que chez les nonagénaires (Flachsbarth et al., 2009). D'autres investigations ont été étendues à des populations italiennes (Anselmi et al., 2009), chinoises Han (Li et al., 2009b), et des populations juives Ashkenazes (Pawlikowska et al., 2009). D'autres homologues de FOXO sont également impliqués dans la longévité humaine. *FOXO1* a été trouvé associé à la longévité dans les cohortes américaines et féminines chinoises (Lunetta et al., 2007; Li et al., 2009b).

Cependant d'autres études biodémographiques modulent l'idée que l'on peut se faire de *FOXO3* sur la longévité. En effet, Soerensen et collègues ne retrouvent pas de SNP *FOXO3* en comparant les sujets les plus « vieux » entre eux et en retrouvent trois parmi les plus connus en comparant les sujets « jeunes » aux sujets plus âgés (Soerensen et al., 2010). Ces résultats tendent vers l'idée que *FOXO3* fonctionne comme un gène de longévité du jeune âge à la vieillesse, mais ne participe pas au maintien de la longévité pendant la vieillesse. De plus, Donlon et collègues ont séquencé la région codante de centenaires américains d'origine japonaise afin de cartographier cette région polymorphique (Donlon et al., 2012). Sur les 38 variants publiés, 6 sont des désalignements avec des séquences non alléliques homologues de *FOXO3B* (*ZNF286B*), un pseudogène sur un chromosome différent 2 sont attribuables à *ZNF286B* seulement, et les 30 autres ont été infirmés. Ceci indique que les polymorphismes de cette région sont très rares au travers de la population et ne peuvent probablement pas être impliqués dans la longévité.

Bien que les variants polymorphiques semblent prometteurs, il existe une pléthore d'études qui ont trouvé un ou plusieurs variants génétiques associés à la longévité, mais la grande majorité de ces études ne sont pas reproductibles. Le fait que seuls deux gènes (*ApoE* et *FOXO3*) soient apparus cohérents dans ces études, bien que leur reproductibilité soit quasi nulle, est assez déroutant. Quelles sont les raisons de ce manque de reproductibilité ? Une des causes potentielles peut être la présence de variants spécifiques

aux populations. Les études de Willcox et Koropatnick ne se recoupent pas avec celles de Barzilai ou Falchsbart. D'autres raisons, plus communes à ce manque de reproductibilité comprennent l'existence de variants rares, des désalignements avec d'autres séquences hautement homologues, des erreurs de séquençage /d'assemblage, entre autres.

Le lien entre longévité et FOXO3 est encore loin d'être tout à fait élucidé, du moins chez les mammifères. Bien que de nombreuses fonctions de FOXO3 soient reliées à la longévité (réponse anti-oxydante, protéostase), des études ont montré qu'il n'y a pas de variations de l'espérance de vie chez des souris déficientes en superoxyde dismutase (cible transcriptionnelle de FOXO) (Jang et al., 2009; Zhang et al., 2009) ; pas plus que chez les souris sur-exprimant la superoxyde dismutase. D'autres travaux sont nécessaires pour évaluer les relations possibles entre FOXO3, le stress oxydatif et la longévité. Toutefois, il semblerait que l'expression d'enzymes anti-oxydantes communes est en corrélation avec la variation génétique de FOXO3 ou avec d'autres facteurs qui influent sur l'expression de FOXO3 dans une population.

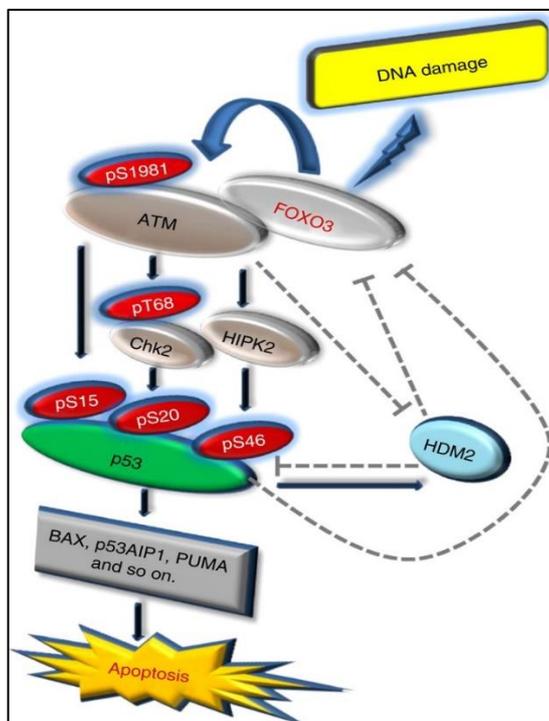
#### **2.2.4. Réparation de l'ADN**

Les facteurs de transcription FOXO sont impliqués dans les mécanismes de réparation de l'ADN en modulant l'expression des gènes qui permettent la détection des dommages de l'ADN tels que GADD45 (*Growth Arrest and DNA damage 45*), DDB1 (*Damage-specific DNA binding protein 1*) (Zhang et al., 2012) ou encore ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*)(Chung et al., 2012).

FOXO3 participe à l'expression de GADD45 (Tran et al., 2002). Les protéines GADD45 sont réparties de façon ubiquitaire en particulier dans les populations cellulaires au repos et sont fortement exprimées au cours de la phase G1 du cycle cellulaire, avec une expression protéique réduite de manière significative au cours de la phase S (Kearsey et al., 1995). GADD45 joue un rôle important dans les réponses aux stress cellulaires génotoxiques et non génotoxiques et agit comme un capteur de stress et un suppresseur de tumeurs. Après lésion de l'ADN, tous les membres de la famille des protéines GADD45 sont rapidement induits, entraînant l'arrêt du cycle cellulaire et/ou l'apoptose, ou participent alors activement aux mécanismes de réparation de l'ADN (Tamura et al., 2012).

Les protéines DDB1 sont impliquées dans la réparation par excision de nucléotides. Elles forment un complexe avec la culline CUL4 et ce complexe est impliqué dans de nombreux processus nucléaires comme la réparation des dommages de l'ADN, la réplication de l'ADN et le remodelage de la chromatine (Choe et al., 2009).

FOXO3 interagit avec la protéine ATM, une protéine qui assure la réparation des cassures double-brins dans l'ADN occasionnées par des agressions physiques ou des processus physiologiques. FOXO3 permet la phosphorylation d'ATM sur la sérine S1981 entraînant une dimérisation et une activation d'ATM. Elle phosphoryle ensuite H2AX, une variante de la famille des histones, qui recrute au niveau du site de l'ADN endommagé, plusieurs protéines qui sont séquentiellement phosphorylées par ATM, dont 53BP1, BRCA1, Chk1 et Chk2 (Chung et al., 2012). L'augmentation de FOXO3 dans les cellules favorise l'activation de la voie ATM-FOXO3, alors que les cellules dépourvues en FOXO3 ne peuvent pas déclencher ce mécanisme de réparation de l'ADN suite à une lésion par exemple (Tsai et al., 2008) (**Figure 20**).



**Figure 20 : Schéma représentant la voie ATM-FOXO3 dépendante.** Sur ce schéma est représenté l'activation FOXO3 dépendante de l'ATM - pS1981, Chk2 - pT68, HIPK2, p53 - PS15, p53 - PS20, p53 - pS46 et les rôles possibles de p53 et HDM2 dans la régulation négative de FOXO3 comme boucles de rétroactions négatives, et l'activation de la voie de signalisation pro-apoptotique p53. Les lignes en pointillés représentent les voies d'inhibition publiées dans la littérature (Chung et al., 2012).

GADD45, DBB1, ou encore ATM sont des cibles directes de FOXO3 et toute modulation de l'expression de ces gènes a des répercussions sur la résistance des cellules aux stress.

### 2.2.5. FOXO3 et apoptose

Selon la théorie du Ying et du Yang, chaque phénomène est composé de deux aspects opposés, le Ying étant l'aspect négatif et le Yang l'aspect positif. La coexistence des deux parties dans un certain équilibre et/ou en harmonie, est considérée comme une clé pour la santé globale des systèmes biologiques. En accord avec cette théorie, les pertes et

les gains de fonction de gène cruciaux pour la voie apoptotique suggèrent que toute perturbation de l'homéostasie cellulaire peut être un événement pathogène primaire qui conduit à la maladie. En effet, il existe maintenant des preuves convaincantes qu'une apoptose insuffisante peut se manifester sous forme de cancer ou de maladie auto-immune, alors que la mort cellulaire accrue contribue aux maladies dégénératives aiguës et chroniques (MacFarlane, 2009)

Les facteurs régulant les niveaux d'expression des protéines de survie sont susceptibles de jouer un rôle crucial dans la formation de tumeurs. Par exemple, une sur-activation aberrante de signalisation PI3K/Akt est une caractéristique de nombreux cancers humains. En séquestrant FOXO dans le cytoplasme, loin des promoteurs des gènes apoptotiques, PI3K/Akt participe à la survie cellulaire, ce qui fait de FOXO un élément critique de la voie PI3K/Akt par régulation de l'expression de gènes apoptotiques (Fu and Tindall, 2008).

i) FOXO régule positivement les protéines BH3-seulement

Classiquement, l'apoptose se produit via deux voies principales : la voie intrinsèque médiée par les mitochondries, et qui conduit à l'activation de la caspase 9, tandis que la voie extrinsèque est induite par l'activation des récepteurs de mort (Fas et TNFR) et implique l'activation de la caspase 8 (Kiechle and Zhang, 2002; Rishi et al., 2009). La famille des protéines BCL2 est connue pour être régulatrice de l'apoptose intrinsèque et est répartie en trois sous-familles sur la base du nombre de domaines BH (*BCL-2 homologie*) qu'ils partagent (Lomonosova and Chinnadurai, 2008). Le groupe BH3-seulement est constitué de protéines pro-apoptotiques dont BIK, EGL-1, BIM, BMF, NOXA, BID, BAD, BNIP3, PUMA et BECN1. Des études montrent que les formes constitutivement actives nucléaires de FOXO déclenchent la mort cellulaire par l'activation d'au moins deux membres de la famille BH3 tels que Bim et Bnip3. (Dijkers et al., 2000a; Dijkers et al., 2002; Stahl et al., 2002; Gilley et al., 2003)

FOXO3 est responsable de la régulation positive de la transcription de PUMA, puissant régulateur de perméabilisation des membranes mitochondriales externes en réponse à des cytokines ou une privation en facteurs de croissance (You et al., 2006b; Chipuk and Green, 2009).

ii) FOXO active la voie apoptotique extrinsèque

FOXO régule directement la voie apoptotique extrinsèque en régulant positivement la transcription des facteurs pro-apoptotiques tels que FasL et TRAIL (**Figure 21**). Le promoteur FasL contient trois sites FBHE, et l'apoptose induite par FOXO3 dans des

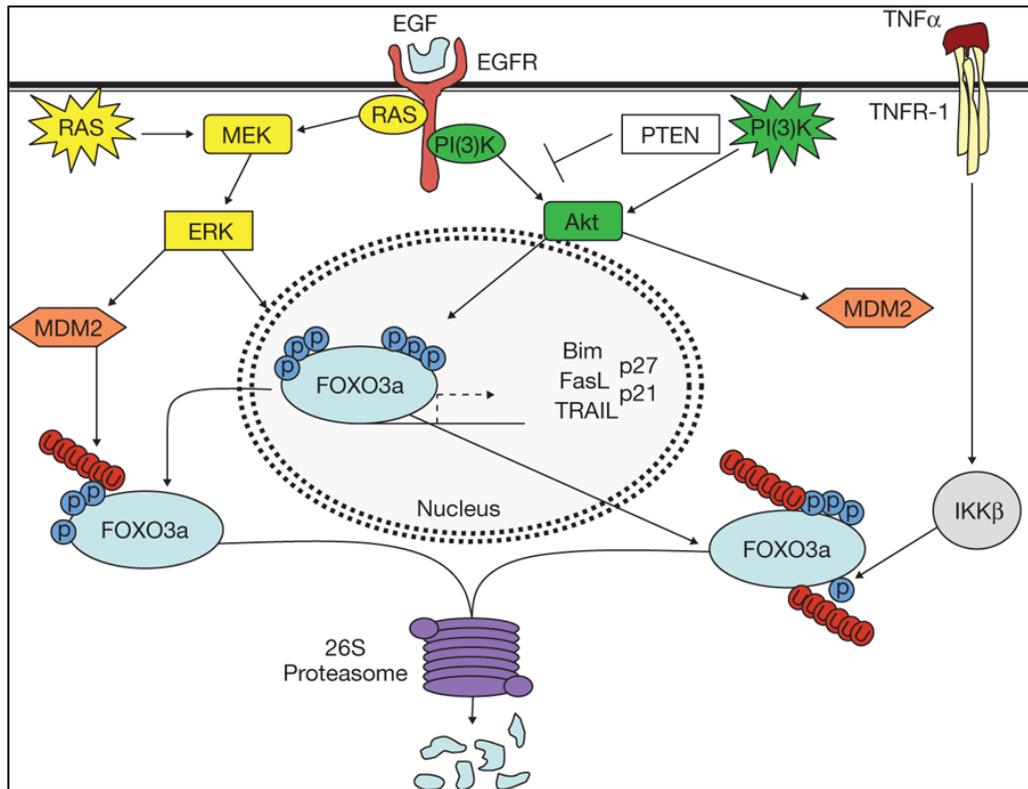
neurones du cervelet apparaît diminuée lorsque l'interaction entre Fas et FasL est bloquée par la protéine de fusion Fas-Fc. La surexpression d'une forme constitutivement active de FOXO3 déclenche l'apoptose dans les neurones granulaires du cervelet à travers la cascade de signalisation Fas (Brunet et al., 1999a)

TRAIL est une cytokine capable d'activer les voies apoptotiques et est une cible directe de FOXO3 (Modur et al., 2002). La surexpression de FOXO1 et FOXO3 dans des cellules cancéreuses de la prostate augmente l'expression du TRAIL et conduit à l'apoptose (Zhang et al., 2011b).

FOXO3 régule la mort cellulaire par apoptose en modulant l'expression des protéines BH3-seulement (Bim, BNIP3 et PUMA entre autres) et des ligands des récepteurs de mort (FasL et TRAIL) qui fonctionnent dans les voies autocrine et paracrine.

### iii) Axe PTEN/FOXO3 dans l'apoptose

Le gène PTEN (*Phosphatase and TENsin homolog*) est un gène suppresseur de tumeurs fréquemment muté dans les tumeurs malignes humaines. Sa signalisation est presque universellement altérée dans le cancer (Keniry and Parsons, 2008). PTEN est un régulateur négatif majeur de la voie PI3K/Akt. Dans des cellules qui portent une mutation sur le gène PTEN, la PI3K est souvent constitutivement activée, conduisant à une inactivation de FOXO3 endogène et, éventuellement, à l'initiation et la progression des tumeurs (Greer and Brunet, 2005). Etant donné que FOXO3 facilite l'expression du gène PTEN, FOXO3 peut renforcer sa propre fonction biologique qu'est la suppression tumorale (Aroui et al., 2016)(**Figure 21**).



**Figure 21 : Régulation des voies apoptotiques par FOXO3. (a)** La stimulation des récepteurs aux facteurs de croissance tels qu'EGFR permet le recrutement et l'activation des voies de signalisation Ras-Erk et PI3K/Akt. Akt et ERK sont transloquées vers le noyau où ils phosphorylent FOXO3 au niveau de sites indépendants. Ces événements de phosphorylation inhibent la transcription de gènes qui induisent l'apoptose (Bim, FasL et TRAIL) et l'arrêt du cycle cellulaire (p27 et p21) en exportant FOXO3 hors du noyau et en induisant son ubiquitinylation et sa dégradation par le protéasome **(b)**. TNF-alpha (*tumor necrosis factor*) stimule I $\kappa$ Kbeta (*inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta*), qui phosphoryle FOXO3 et, de façon similaire à ERK et Akt, favorise sa rétention cytoplasmique, son ubiquitinylation et sa dégradation par le protéasome. MDM2 est la ligase E3 qui ubiquitine FOXO3 en réponse à l'activation de la voie ERK (Yang et al., 2008).

### 2.2.6. Régulation de l'autophagie

FOXO3 participe activement à la régulation de l'autophagie, dont une diminution est un marqueur d'un vieillissement cellulaire prématuré.

#### i) FOXO3 active l'autophagie et la mitophagie

Initialement, il a été montré que les facteurs de transcription FOXO régulaient l'autophagie dans le muscle après dénervation ou privation énergétique. Le processus autophagique est étroitement lié à la mise en place d'un réseau de gènes autophagiques qui codent pour des protéines assurant le recrutement des cargos, la formation des autophagosomes, la fusion avec le lysosome et la libération des produits issus de la

dégradation (acides aminés, lipides, acides nucléiques et carbohydrates) (Codogno et al., 2012).

FOXO3 active l'expression de nombreux gènes impliqués dans les diverses étapes du processus autophagique : LC3B, GABARAPL1, PI3k-III, ULK2, ATG12, BECN1, ATG4B et BNIP3 ; et nombreux de ces gènes sont des cibles directes de FOXO3 (LC3B, BNIP3, et BNIP3L) (Mammucari et al., 2007; Zhao et al., 2007).

FOXO3 activent aussi une autre forme d'autophagie, la mitophagie, processus par lequel les mitochondries sont reconnues et dégradées par la machinerie autophagique lysosomale (Liesa and Shirihai, 2013). La mitophagie est activée par la dégradation de MFN2 (*Mitofusin 2*), une GTPase qui normalement assure la fusion des mitochondries et participe au maintien des mitochondries (Chen et al., 2003a). Dans le muscle, FOXO3 active l'expression de MUL1, une E3 ubiquitine-ligase qui co-localise avec les autophagosomes pendant la mitophagie et cible MFN2 pour le dégrader (Chen et al., 2003a). Ce processus mitophagique est également retrouvé dans les neurones épineux moyens. En effet, une étude réalisée dans un modèle de la maladie de Parkinson montre que FOXO3 est capable de prévenir la toxicité de l' $\alpha$ -synucléine en activant sa dégradation et celle des mitochondries (Pino et al., 2014). FOXO3 active aussi la mitophagie en activant la transcription d'un gène encodant pour une serine-thréonine kinase, *PINK1*. En retour PINK1 recrute l'ubiquitine-ligase PARKIN (*PARK2- Parkin RBR E3 Ubiquitin Protein Ligase*) à la membrane mitochondriale pour également induire la dégradation de MFN2 (Mei et al., 2009).

Ces éléments indiquent que chez les mammifères, FOXO3 active la mitophagie au niveau transcriptionnel en augmentant l'expression des E3 ubiquitine-ligase mitochondriales, qui ciblent les mitochondries pour dégradation. Ainsi, FOXO3 peut agir comme un régulateur du stress oxydatif dans les neurones dopaminergiques, ayant un rôle protecteur lorsque les niveaux de stress oxydatif sont relativement faibles, mais activant la mort cellulaire lorsque la charge du stress oxydatif est élevée. Ceci soulève l'équilibre important qui réside au travers de la régulation de FOXO3 au sein de la cellule.

## ii) Intersection des voies FOXO et mTOR dans l'autophagie

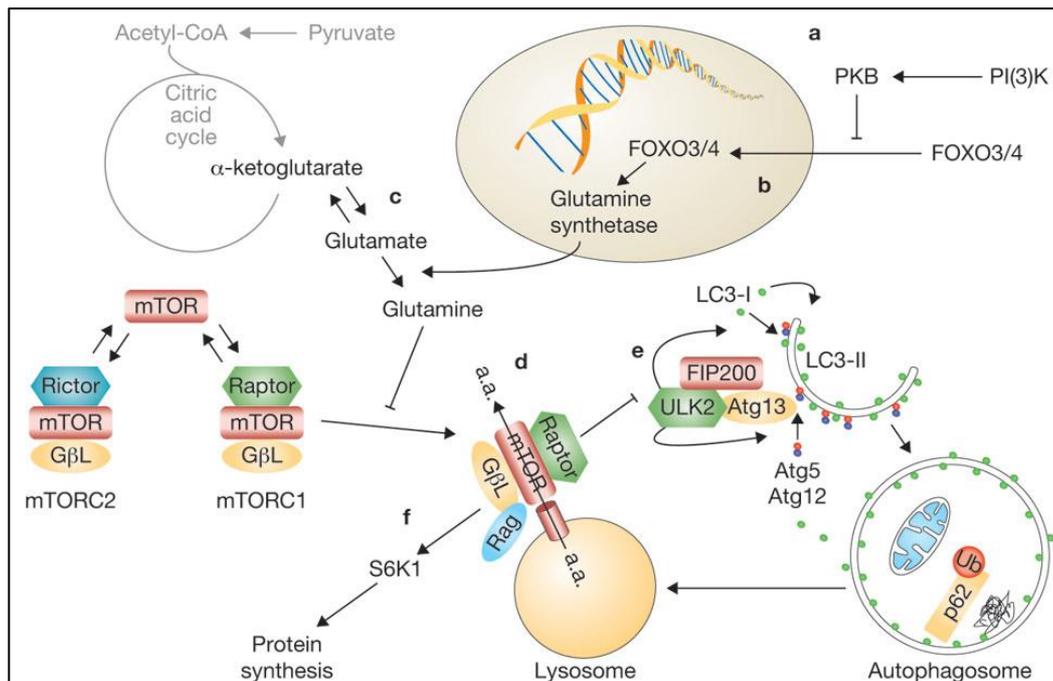
La voie de signalisation mTOR est un régulateur central du métabolisme et de la croissance cellulaire au travers de deux complexes multiprotéiques distincts ; mTORC1 et mTORC2. Bien que ces deux complexes sont impliqués de manière coordonnée dans le métabolisme et la croissance cellulaire, le complexe mTORC1 est critique dans la régulation autophagique (Laplante and Sabatini). Comme nous l'avons vu, en condition normale, mTORC1 phosphoryle ULK1 et bloque la formation des autophagosomes. Une privation en

nutriments ou une forte condition de stress induit la dissociation du complexe mTORC1/ULK1 ce qui active les mécanismes autophagiques (Young et al., 2006; Lin et al., 2014).

FOXO3 induit l'activation des mécanismes d'autophagie mTORC1-dépendant en inhibant la localisation de mTORC1 au niveau des lysosomes, ce qui inhibe la phosphorylation du complexe ULK1/2 qui permet l'initiation et la progression de l'autophagie (Young et al., 2006; Lin et al., 2014) (**Figure 22**).

Cependant une relation antagoniste entre FOXO3 et mTOR a été observée dans les cellules d'invertébrés et de mammifères. Contrairement à FOXO3, qui permet de préserver les pools de cellules souches (Miyamoto et al., 2007; Tothova et al., 2007), l'activation de mTORC1 conduit à l'épuisement prématuré de ces mêmes pools de cellules souches (Chen et al., 2009; Lee et al., 2010). Cet effet contradictoire est également retrouvé dans les modèles *C. elegans* (Vellai et al., 2003). En effet, la surexpression de FOXO3 conduit à l'augmentation de l'activité de la glutamine synthase et inhibe la localisation de mTORC1 sur ULK1, indiquant que des taux suffisamment élevés de glutamine conduisent à l'activation des processus autophagiques (Sandri, 2012).

Pourquoi la protéostase médiée par FOXO promeut la survie dans certains cas (neurones), mais induit la dégénérescence dans d'autres (cellules musculaires squelettiques) ? Il semblerait que certains membres de la famille FOXO soient plus aptes à réguler la protéostase que d'autres. On pourrait expliquer ce phénomène au travers de l'expression différentielle des membres de la famille FOXO dans les différents tissus et de l'interaction spécifique de chacun d'entre eux avec des effecteurs de l'autophagie, mais l'histoire est susceptible d'être plus complexe. Il est possible que les effets protecteurs de la protéostase contrôlée par FOXO précèdent dans le temps les effets néfastes, bien que certains types de cellules soient capables de résister au stress pendant des périodes de temps très longues. Il faut donc prendre en compte d'autres paramètres types cellulaires dépendants qui peuvent contribuer soit à une protéostase protectrice ou soit à une protéostase neurodégénérative en perturbant par exemple l'état de la chromatine, la liaison aux cofacteurs ou encore le métabolisme. Les analyses génomiques des sites de liaisons de FOXO3 seraient susceptibles d'apporter un nouvel éclairage sur ses fonctions dans l'autophagie et le maintien de l'intégrité de la protéostase.



**Figure 22 : Mécanismes autophagiques FOXO-dépendants.** (a) En présence de facteurs de croissance, la voie PI3K/AKT séquestre FOXO1, FOXO3 et FOXO4 dans le cytoplasme. (b) En l'absence de facteurs de croissance, la voie PI3K/Akt est inactive, ce qui permet la translocation des FOXO dans le noyau et l'activation de la transcription de gènes cibles telle que la glutamine synthase (c) qui induit la production de glutamine (en agissant sur le glutamate qui est en équilibre avec le cycle de l'acide citrique), et inhibe la localisation du complexe mTORC1 sur les lysosomes. La production de glutamine dépendante de FOXO favorise l'autophagie en inhibant mTORC1. (d) Le recrutement du complexe mTORC1 vers les lysosomes est médié par les Rag-GTPase, ce qui permet la relocalisation de mTORC1 à proximité de l'adénosine triphosphatase ATPase H<sup>+</sup> (*v-ATPase-Vacuolar-type H<sup>+</sup>-ATPase*). mTOR détecte et est activé par le flux d'acide aminé provenant de la dégradation des protéines lysosomales. mTORC1 a au moins deux grandes fonctions cellulaires: (e) il bloque l'autophagie en inhibant la formation du complexe ULK1/2 et (f) il favorise la synthèse des protéines par la kinase S6K1 (Sandri, 2012).

### 2.2.7. Régulation de la synapse

Ces dernières années, plusieurs études 'suggèrent que les facteurs FOXO comme FOXO3 ou FOXO6 jouent un rôle dans la régulation de l'activité synaptique. En effet, les récepteurs NMDA activent la voie PI3k/Akt entraînant la phosphorylation et l'exportation de FOXO1 du noyau. Ainsi, les effets suppresseurs de l'exportation de FOXO1 sur l'expression de ses cibles, peuvent durer beaucoup plus longtemps qu'on ne le pensait en raison des effets à long terme médiés par l'activation de la voie PI3K/Akt par stimulation des récepteurs NMDA dans les neurones adultes (Al-Mubarak et al., 2009). L'activation du promoteur FOXO1 par lui-même peut agir comme un mécanisme de « *feed-forward* » visant à renforcer l'effet d'un signal environnemental initial qui tend modifier l'activité post-traductionnelle des protéines FOXO1, entraînant une réponse physiologique précise. Cela est également applicable aux signaux FOXO1 répresseurs. Dans les tumeurs, où l'activation anormale de la voie PI3K/Akt est une étape importante pour leur initiation et leur maintien, l'exportation nucléaire de FOXO1 par Akt peut alors conduire à la suppression de l'expression FOXO1, aggravant encore plus la situation.

Une autre étude réalisée sur les neurones de l'hippocampe de rat suggère que FOXO6 joue un rôle dans la consolidation de la mémoire. FOXO6 régulerait la consolidation de la mémoire en coordonnant un programme d'expression des gènes qui contrôlent d'une part le nombre et la fonction des synapses et d'autre part, les gènes qui assurent la connectivité neuronale dans l'hippocampe après l'apprentissage (Salih et al., 2012b).

Récemment, une analyse des cibles de DAF-16/FOXO dans les neurones de *C. elegans* a mis en évidence des cibles différentes des cibles canoniques des FOXO qui sont classiquement associées à la réponse au stress, à la protéostase et à la longévité. Il apparaît que les cibles IIS/FOXO neurones-spécifiques sont nécessaires pour la mémorisation chez les mutants IIS/*daf2* (*daf2* codant pour IGF1 chez *C. elegans*) (Kaletsky et al., 2016). De plus l'activation du facteur de transcription FKH9 chez ces mêmes mutants est nécessaire pour la régénération axonale liée à l'âge, et son activité dans d'autres tissus tels que l'intestin, est nécessaire pour la longévité des mutants *daf2*. Ces deux jeux de cibles, neuronales et canoniques, semblent coordonner l'activité neuronale, le métabolisme et la longévité chez *C. elegans*.

Au regard des nombreuses régulations et fonctions des facteurs de transcription FOXO et notamment celles de FOXO3, il est important de signaler qu'une régulation précise de ces facteurs est primordiale pour maintenir l'équilibre cellulaire. Nous avons vu notamment que FOXO3 peut avoir un rôle protecteur lorsque les niveaux de stress oxydatif sont relativement faibles, mais peut aussi activer la mort cellulaire lorsque le stress oxydatif

est trop élevé. FOXO3 peut aussi promouvoir la survie cellulaire dans certains tissus (neurones), mais mener à la dégénérescence dans d'autres (muscles squelettiques). De plus, on retrouve de nombreux chevauchements entre les différents mécanismes qui régulent FOXO3 et sont régulés par FOXO.

La plasticité fonctionnelle des facteurs de transcription FOXO3 permet aux organismes de répondre d'une manière appropriée aux changements environnementaux (stress entre autres). La compréhension du réseau de gènes participants au maintien de l'homéostasie cellulaire régulés par FOXO3 dans les cellules neurales ou les neurones, nous permettrait de comprendre comment FOXO3, facteur neuroprotecteur, répond à la mHTT et de savoir si son spectre d'action tends vers la maintenance neuronale malgré des cellules « abimées » ou s'il pourrait éventuellement faire pencher la balance vers le déclin neuronal, les deux n'étant pas exclusifs et pouvant se succéder dans le temps avec l'aggravation des niveaux de stress et le vieillissement.

En ce sens, nous avons étudié au sein du laboratoire comment la voie FOXO3 est modifiée dans plusieurs modèles de la MH.

### **3. Régulation des FOXO par la voie Ryk**

Les voies développementales peuvent jouer un rôle dans la survie des cellules adultes. Cependant, si elles interagissent avec les voies de longévité et survie cellulaire pour conférer une protection contre la toxicité liée aux maladies neurodégénératives, ce type de mécanisme reste mal compris. Des études ont montré une interaction possible entre les voies Wnt et les facteurs de transcription FOXO, conduisant à une protection des cellules contre la toxicité induite par le stress cellulaire. En effet, l'inhibition de la dé-acétylase SIR2/SIRT1 impliquée dans la régulation de DAF16/FOXO3 et de sa cible daf16/FOXO3, protège du déclin et d'une motilité anormale, les cellules musculaires chez un modèle *C. elegans* présentant une répétition polyQ. La neuroprotection induite par la dé-acétylation de FOXO3 par SIRT1 passerait par la voie Wnt- $\beta$ -caténine dépendante (Pasco et al., 2010). D'autres études plus récentes révèlent l'importance du facteur de transcription FOXO3 dans la progression du cancer de la prostate (Liu et al., 2015a). FOXO3 inhibe de manière significative l'expression de  $\beta$ -caténine dans les cellules cancéreuses de la prostate (Liu et al., 2015a). En se liant directement à la  $\beta$ -caténine, FOXO3 entre en compétition avec TCF pour l'interaction avec la  $\beta$ -caténine, inhibant ainsi l'activité transcriptionnelle du complexe TCF/ $\beta$ -caténine et réduisant ainsi l'expression des gènes cibles de TCF.

## 3.1. Wnt, voie de signalisation développementale

### 3.1.1. Complexité de la voie Wnt

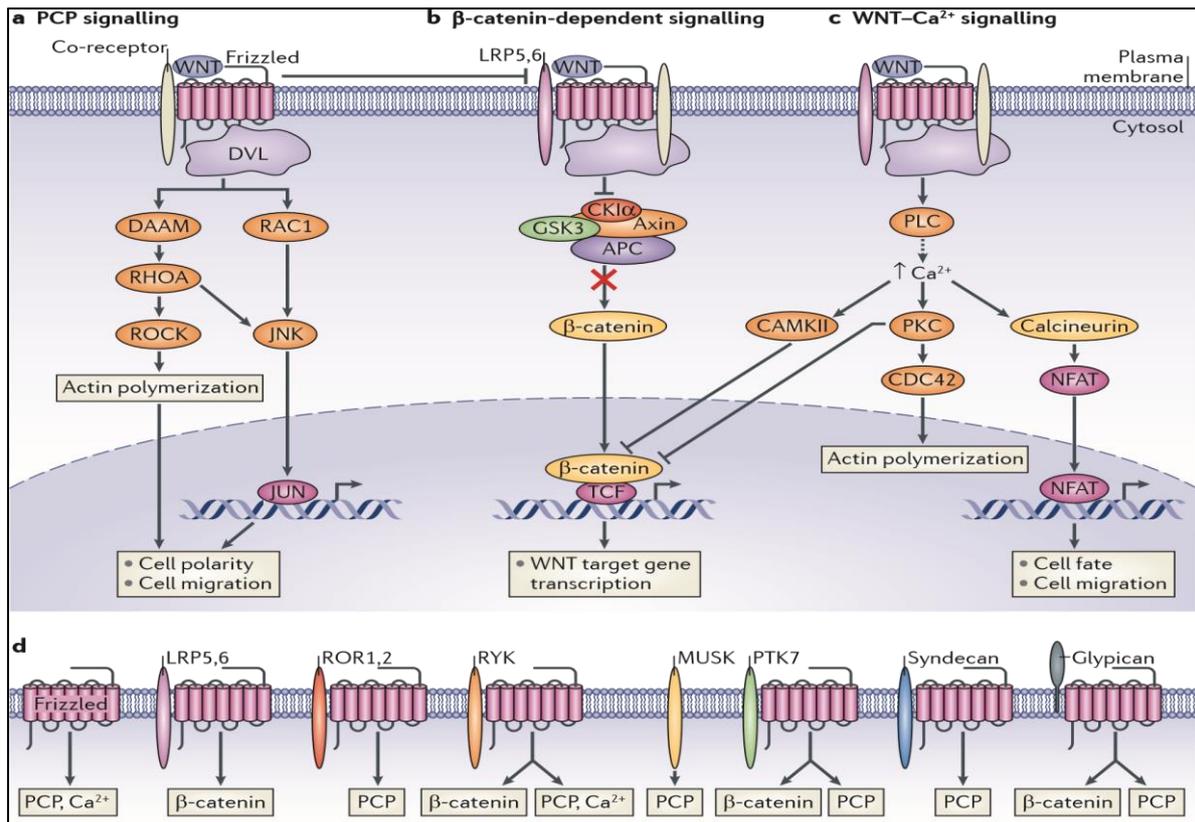
Les protéines Wnt sont une famille de glycoprotéines hautement conservées, riches en cystéines, d'environ 350 acides aminés, sécrétées dans le milieu extracellulaire, qui influent sur le destin des cellules voisines dans plusieurs organes. La voie de signalisation Wnt est impliquée dans une variété de processus développementaux, y compris la détermination du destin cellulaire, la polarité cellulaire, la structure des tissus, le développement embryonnaire, le maintien des cellules souches, le contrôle de la prolifération cellulaire et le maintien de l'homéostasie tissulaire adulte (Yamaguchi et al., 1999; Moon et al., 2002). Chez l'Homme, on dénombre 19 protéines Wnt (Kikuchi et al., 2011).

Ces voies ont été classées comme étant canoniques ( $\beta$ -caténine-dépendante) ou non-canonique ( $\beta$ -caténine-indépendante). Toutefois, cette classification ne peut servir qu'à titre indicatif, puisque des voies de signalisation Wnt canonique et non-canonique sont utilisées dans des contextes cellulaires différents (Simons and Mlodzik, 2008; Kikuchi et al., 2011; Clark et al., 2012). Bien que plusieurs voies Wnt activent préférentiellement soit les voies  $\beta$ -caténine-dépendantes ou  $\beta$ -caténine indépendantes, l'activité de Wnt dépend du contexte cellulaire et du récepteur et, par conséquent, elles ne peuvent pas être subdivisées rigoureusement selon la signalisation qu'elles induisent. Il existe plus de 15 récepteurs et co-récepteurs différents des protéines Wnt et c'est la combinaison particulière d'un récepteur/co-récepteur avec un ligand Wnt donné qui détermine la voie activée en aval.

La complexité de la voie de signalisation intracellulaire Wnt est parallèle à la complexité observée dans la diversité des récepteurs Wnt. Les récepteurs Wnt comprennent i) la famille des récepteurs Frizzled (FZZ), ii) les récepteurs *Low Density Lipoprotein Receptor-related Proteins-5/6* (LRP-5/6), iii) les récepteurs *tyrosin kinase-like Receptor-1 Orphan / 2* (ROR1 / 2), et iv) les récepteurs liés à la tyrosine (Y) kinase (Ryk).

Les récepteurs Frizzled sont des récepteurs couplés aux protéines G à sept domaines transmembranaires. Cette famille de récepteurs comprend au moins dix membres différents qui transduisent des effets tissus-spécifiques. La structure des membres de la famille Frizzled est similaire : ils présentent un signal peptidique divergent sur l'extrémité N-terminale, un domaine extracellulaire riche en cystéines hautement conservé, une région de liaison de longueur variable, une région à sept domaines transmembranaires, et une extrémité C-terminale de longueur variable. Les ligands Wnt se lient aux récepteurs Frizzled par le domaine cellulaire riche en cystéine, et peuvent également nécessiter un co-récepteur, comme LRP-5, LRP-6, ROR, ou Ryk, pour l'activation des voies de signalisation en aval.

LRP-5 et 6 sont des orthologues du récepteur Arrow chez la drosophile, et sont associés à la voie de signalisation canonique  $\beta$ -caténine-dépendant. ROR 1/2 et Ryk sont des co-récepteurs de Wnt supplémentaires qui sont associés à la voie non-canoniques de Wnt. Les ligands Wnt ont des affinités différentes pour les différents récepteurs Frizzled, l'activation d'une cascade de signalisation est donc dépendante du ligand et du contexte d'interaction cellulaire (**Figure 23**).



**Figure 23 : Voies de signalisation Wnt.** Schéma simplifié des principales voies Wnt suite à une interaction spécifique entre un ligand Wnt, Frizzled et un co-récepteur. **(a) La voie de signalisation de la polarité cellulaire planaire (PCP)** déclenche l'activation des petites GTPases RHOA et RAC1, qui à leur tour activent la RHO kinase (ROCK) et la *c-jun-N-terminal kinase* (JNK), respectivement, conduisant à la polymérisation de l'actine et de la stabilisation des microtubules. Cette voie est principalement impliquée dans la régulation de la polarité cellulaire, la motilité cellulaire et les mouvements morphogénétiques. **(b) La voie β-caténine-dépendant :** Dans des conditions cellulaires stables, GSK3 (*glycogen synthase kinase 3*) phosphoryle la β-caténine, ce qui déclenche sa dégradation. Cependant, en présence d'un ligand Wnt, le complexe de dégradation comprenant GSK3, CK1α, Axine et APC est recruté par le complexe ligand Wnt/récepteur et inactivé. Ceci entraîne l'accumulation de la β-caténine dans le cytoplasme et sa translocation dans le noyau où elle active la transcription de gènes cibles sous le contrôle du facteur de cellule T (TCF), entre autres. **(c) La voie Wnt-Ca<sup>2+</sup> active CAMKII** (Ca<sup>2+</sup> et calmoduline-kinase II dépendante), PKC (*protein kinase C*) et la calcineurine. La calcineurine active le facteur nucléaire des lymphocytes T activés (NFAT), qui régule la transcription de gènes contrôlant le destin des cellules et la migration cellulaire. Les voies de signalisation PCP et Ca<sup>2+</sup> antagonisent la signalisation de la β-caténine à différents niveaux. **(d)** Sont décrits ci-dessus les principales voies utilisées par les récepteurs et co-récepteurs Wnt. Pour les autres récepteurs, nous détaillerons uniquement le récepteur Ryk dans le paragraphe **Voie Ryk-ICD** (DAAM, *DVL-associé activateur de la morphogenèse 1*; DVL-*Dishevelled*; LRP-*low-density lipoprotein receptor-related protein*; MUSK-*muscle skeletal receptor Tyr kinase*; PLC-*phospholipase C*; PTK7-*protein Tyr kinase 7*; ROR, *receptor Tyr kinas-like orphan receptor*; RYK, *receptor Tyr kinase*) (Niehrs, 2012).

### 3.1.2. $\beta$ -Caténine, effecteur de la voie Wnt

La  $\beta$ -caténine est une protéine d'environ 88k Da et appartient à la famille des protéines dites « armadillo », caractérisées par un motif central composé de 42 acides aminés présentant une répétition du domaine « armadillo ». Par sa présence dans les différents compartiments cellulaires, la  $\beta$ -caténine est une protéine multifonctionnelle en fonction de sa localisation sub-cellulaire. Au niveau membranaire, elle a un rôle dans l'adhésion cellulaire, la signalisation cellulaire et la transcription des protéines. Par sa liaison avec les cadhérines et l' $\alpha$ -caténine, c'est un constituant des adhésions focales. Son rôle est important dans l'adhésion intercellulaire notamment au niveau neuronal. Elle participe à la plasticité neuronale synaptique et à la régulation synaptique (Maguschak and Ressler, 2012). Au niveau nucléaire, la  $\beta$ -caténine joue un rôle central de co-activateur transcriptionnel notamment impliqué dans la direction de plusieurs processus développementaux en se liant directement aux facteurs de transcription tels que TCF ou FOXO3.

La plupart des interactions avec la  $\beta$ -caténine nécessitent les répétitions « armadillo » et certaines études suggèrent que la phosphorylation des protéines qui interagissent avec la  $\beta$ -caténine entraîne l'apparition d'une partie protéique chargée négativement, ce qui renforce la liaison au domaine « armadillo » de la  $\beta$ -caténine chargée positivement (Xu and Kimelman, 2007). Il faut cependant noter que toutes les phosphorylations ne conduisent pas à une plus forte interaction avec la  $\beta$ -caténine ; plusieurs événements de phosphorylation ont été décrits comme diminuant l'affinité de liaison avec la  $\beta$ -caténine. En effet, aux extrémités N-terminale et C-terminale de la  $\beta$ -caténine, on retrouve des régions régulatrices non structurées qui sont largement impliquées dans le recrutement de cofacteurs pour l'adhésion et l'activation transcriptionnelle. Enfin la  $\beta$ -caténine est un effecteur important de la voie Wnt canonique.

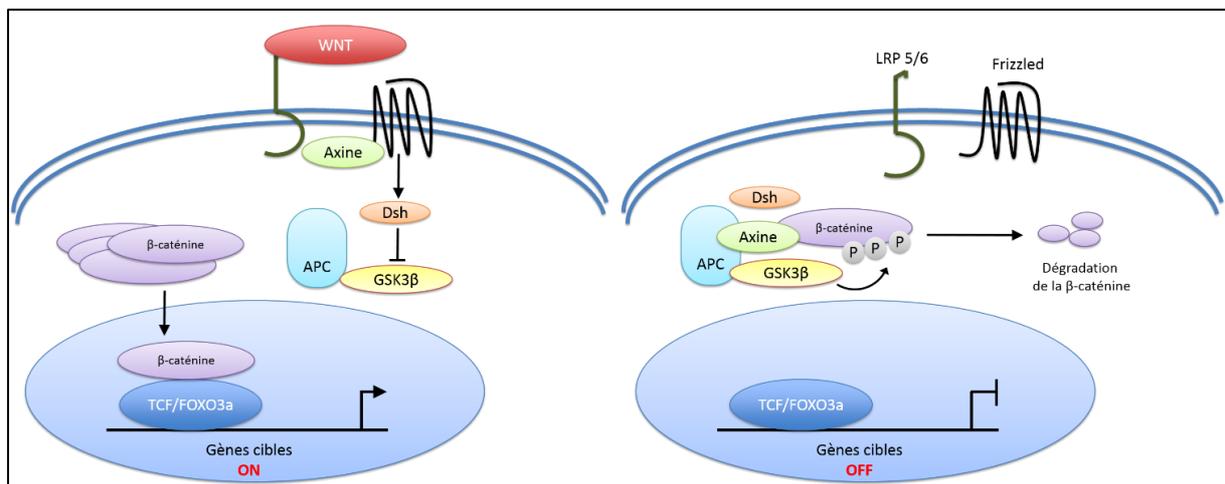
## 3.2. Voies de signalisation Wnt

### 3.2.1. Signalisation Wnt canonique

La signalisation Wnt est initiée par la formation du complexe entre un ligand Wnt, le récepteur Frizzled et son corécepteur. L'extrémité C-terminale intracellulaire de Frizzled peut se lier directement (et faiblement), au domaine PDZ (*Postsynaptic density-95, Discs-large and Zonula occludens-1*) de Dishevelled (DSH) (Wong et al., 2003). La liaison de Wnt à ses récepteurs entraîne donc l'activation de DSH ce qui contrecarre l'activation du complexe de dégradation de la  $\beta$ -caténine (Cadigan and Liu, 2006; Li and Zhan, 2006). La dégradation de la  $\beta$ -caténine est initiée par un complexe multiprotéique comprenant quatre protéines : la  $\beta$ -

caténine, la sérine/thréonine kinase GSK3 $\beta$  (glycogène synthase kinase-3 $\beta$ ), le produit du gène suppresseur de tumeur APC (*adenomatous polyPosis coli*) et les protéines de la famille axine/conductine (Barker et al., 2000; Harwood, 2002; Kimelman and Xu, 2006). Lors de la formation du complexe de dégradation, la  $\beta$ -caténine est phosphorylée à son extrémité N-terminale par GSK3 $\beta$  (Ser33 et Ser37) et par CK1 (Ser45). Ces sites de phosphorylations servent de sites de reconnaissance pour l'E3 ubiquitine-ligase  $\beta$ -TrCP. Il en résulte une polyubiquitinylation de la  $\beta$ -caténine et sa dégradation par le protéasome (McManus et al., 2005).

La voie de signalisation Wnt permet de contrôler la biodisponibilité de la  $\beta$ -caténine dans le cytoplasme. Toute accumulation cytoplasmique se traduit par la translocation de la  $\beta$ -caténine dans le noyau où elle peut alors se lier à divers facteurs de transcription tels TCF (Facteur de Lymphocyte T) ou encore FOXO3 (Essers et al., 2005b; MacDonald et al., 2009) (**Figure 24**).



**Figure 24 : Voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine canonique.** La liaison de la protéine Wnt initie une cascade de signalisation qui conduit à l'activation de la  $\beta$ -caténine, son accumulation dans le cytoplasme et sa translocation dans le noyau et la transcription de gènes cibles (à gauche). Lorsque les récepteurs Fzz/LRP ne sont pas engagés, CK1 et GSK3 $\beta$  phosphorylent séquentiellement la  $\beta$ -caténine liée à l'axine. Par conséquent, la  $\beta$ -caténine est ubiquitinylée et ciblée par le protéasome pour une destruction rapide (à droite) (Vilchez et al., 2016).

Une activation anormale/oncogénique de la voie Wnt, par exemple par la perte de l'APC, conduit à une  $\beta$ -caténine constitutivement active qui favorise et prolonge l'activation des gènes cibles en aval, notamment le gène *MYC*, un oncogène, impliqué dans la prolifération cellulaire (van de Wetering et al., 2002) ce qui peut être lié à l'apparition de cancer (Beaulieu, 2015). La HTT participe aussi à stabilisation du complexe de dégradation de la  $\beta$ -caténine ce qui entraîne une dégradation équilibrée de la  $\beta$ -caténine. La stabilisation

du complexe est altérée par la présence de la mHTT ce qui contribue à une accumulation toxique de  $\beta$ -caténine (Godin et al., 2010).

### 3.2.2. Signalisation Wnt non-canonique

La signalisation Wnt  $\beta$ -caténine-indépendante englobe les voies qui n'utilisent pas un module  $\beta$ -caténine/TCF ou un module  $\beta$ -caténine/LEF mais utilisent d'autres voies de signalisation en aval, dont certaines provoquent une réponse transcriptionnelle. Il existe maintenant un ensemble confus de ces voies de Wnt non-canoniques, classées selon les récepteurs et/ou co-récepteurs utilisés et les voies effectrices activées en aval.

#### i) Voie non-canonique PCP

La voie  $\beta$ -caténine-indépendante la mieux caractérisée est la voie de PCP. Les éléments transmembranaires à la base de la voie PCP comprennent le récepteur FZZ, le récepteur transmembranaire VANGL et la cadhérine, Flamingo. Les protéines cytoplasmiques de base sont DSH, Prickle ou Diego. Flamingo peut recruter soit FZZ ou VANGLE, et ensuite recruter DSH et Prickle (Zallen, 2007). DSH interagit de manière compétitive avec Prickle et Diego. Alors que Diego favorise la signalisation FZZ par DSH, Prickle l'inhibe. Ces composants PCP de base sont souvent asymétriquement localisés dans les cellules. Ainsi, en fonction de la localisation de ces composants, la voie PCP peut être activée ou inhibée sur certains sites au sein d'une cellule.

Les récepteurs FZZ activent une cascade qui implique les petites GTPases (RAC1/RhoA) et *c-Jun N-terminal kinases* (JNK). Cette voie peut conduire à des changements dans le cytosquelette et la polarité cellulaire par l'intermédiaire de petites GTPases et/ou l'activation transcriptionnelle de facteurs de transcription JNK-dépendant, par exemple ATF2 (*Activating transcription Factor 2*), avec activation simultanée de leur gènes cibles (Simons and Mlodzik, 2008; Kikuchi et al., 2011). La voie PCP est largement impliquée dans la régulation de la polarité cellulaire au cours des processus morphogénétiques. Chez les vertébrés, la voie PCP régit le mouvement des cellules durant la gastrulation, la fermeture du tube neural et l'orientation des stéréocils dans l'oreille interne (Simons and Mlodzik, 2008; Kikuchi et al., 2011). La voie PCP et la voie Wnt dépendante de la  $\beta$ -caténine sont bien connues pour être antagonistes l'une de l'autre, et ainsi l'inhibition de l'une entraînera la régulation à la hausse de l'autre.

#### ii) Voie non-canonique Wnt- $\text{Ca}^{2+}$

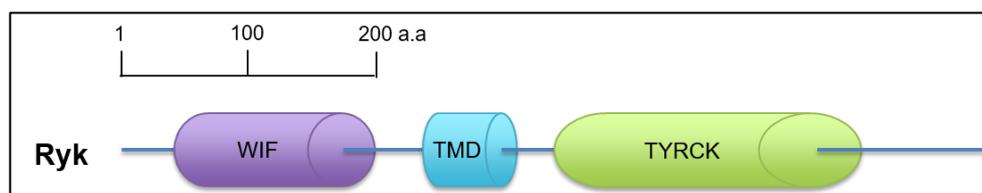
La seconde voie de signalisation  $\beta$ -caténine indépendante est la voie Wnt- $\text{Ca}^{2+}$  qui a été initialement identifiée dans les embryons de *X. laevis* et de zebrafish (Slusarski et al.,

1997). Dans ce cas, les ligands Wnt, en se fixant à Fzz, déclenchent l'activation des protéines G hétérotrimériques ce qui conduit à l'activation de la phospholipase C (PLC). La PLC stimule à son tour la production de diacylglycérol et d'inositol-1,4,5-triphosphate et déclenche libération de  $Ca^{2+}$  des réserves intracellulaires et induit l'activation d'effecteurs tels que CAMKII, la calcineurine et la protéine kinase C (PKC), qui activent NFAT (facteur de transcription nucléaire associé régulateur aux des cellules T). Cette voie est impliquée dans le cancer, l'inflammation et la neurodégénération (De, 2011).

Outre ces deux voies  $\beta$ -caténine-indépendantes, il existe des événements tissus-spécifiques supplémentaires déclenchés par les ligands Wnt en combinaison avec Frizzled ou des co-récepteurs spécifiques qui ne tombent pas dans ces catégories dont une voie qui nous intéresse particulièrement et sera discutée ci-dessous et plus particulièrement au cours des chapitre 2 et 3 : la voie Ryk-ICD/FOXO3/ $\beta$ -caténine.

### 3.2.3. Voie Ryk-ICD

Longtemps considéré comme un récepteur orphelin, Ryk est devenu, en seulement quelques années, le sujet de nombreuses recherches. L'identification de Ryk comme co-récepteur des protéines Wnt (Eisenmann, 2005) a été un des éléments déclencheurs de ces recherches. En effet, ce récepteur atypique est impliqué dans plusieurs processus développementaux comme la formation de la vulve chez *C. elegans* (Deshpande et al., 2005), la neurogenèse corticale (Lyu et al., 2008b), le guidage axonal et la synaptogenèse chez les mammifères (Bovolenta et al., 2006), avec aussi un rôle supposé dans l'inhibition de la régénération axonale (Liu et al., 2008b).



**Figure 25 : Structure du récepteur Ryk.** Ryk contient dans sa partie intracellulaire, un domaine RTK catalytiquement actif bien que la présence de plusieurs substitutions d'acides aminés sur ce domaine ait longtemps fait penser le contraire. La liaison avec les ligands Wnt s'effectue au niveau du domaine WIF, situé dans la partie extracellulaire du récepteur. Ryk (75kDa) possède aussi deux sites de clivage : l'un situé dans le domaine extracellulaire du récepteur et responsable de la libération d'un fragment de 45 kDa appelé CTF (C-Terminal Fragment), l'autre situé dans la partie transmembranaire du récepteur, est clivé par le complexe gamma-sécrétase, libérant le domaine intracellulaire de Ryk (Ryk-ICD) de 42kDa. Enfin, Ryk possède un domaine de liaison aux protéines à domaine PDZ dans sa région carboxyterminale. TYRCK, Tyr kinase catalytic domain; WIF, Wnt-inhibitory factor-1 like domain (Niehrs, 2012).

Ryk (*Receptor Tyrosine Kinase-related*) est un récepteur transmembranaire de la famille des récepteurs tyrosine kinase (Hovens et al., 1992) qui se lie à Wnt (aussi connu sous le nom *Derailed* (DRL) chez *D. melanogaster*) (Yoshikawa et al., 2003; Lu et al., 2004). C'est un récepteur à un seul domaine transmembranaire (Halford and Stacker, 2001) dont le domaine extracellulaire contient un module WIF (*WNT-inhibitory factor-1 like domain*) qui permet la liaison des ligands Wnt à Ryk (Lu et al., 2004). En plus de la liaison aux ligands Wnt, Ryk peut également interagir directement avec FZZ (Hsieh et al., 1999) ce qui suggère que Ryk agit également comme un co-récepteur de Wnt (**Figure 26**). Cette protéine est très conservée au travers des espèces, avec un gène Ryk chez les mammifères, zebrafish et *C. elegans* et trois orthologues chez la drosophile (Fradkin et al., 2010). Ryk est impliqué dans les voies de signalisation  $\beta$ -caténine-dépendante, la voie PCP et la voie  $Ca^{2+}$ -dépendante (Lu et al., 2004; Berndt et al., 2011; Macheda et al., 2012).

i) Implication de Ryk dans la voie  $\beta$ -caténine-dépendante

Il y a de nombreuses interactions entre Ryk et la  $\beta$ -caténine qui participent à la modulation des voies de signalisation  $\beta$ -caténine-dépendante :

L'activation de DSH par FZZ peut se produire de manière indirecte et être médiée par Ryk (Lu et al., 2004). Ryk et DSH sont liées dans les cerveaux de souris et leur co-expression dans des cellules HEK 293T (*Human Embryonic Kidney 293T*) conduit à une augmentation de l'activation de la voie TCF (Lu et al., 2004). L'interaction entre Dishevelled et Ryk est éliminée par une mutation du domaine PDZ de Dishevelled, et la suppression endogène de Dishevelled supprime l'activation de la voie TCF médiée par Wnt3a.

Les pertes de fonction de *lin18/RYK* mènent à l'impossibilité pour le ligand Wnt3a d'activer les gènes sous le contrôle de la  $\beta$ -caténine. (Lu et al., 2004). De plus, Ryk est ubiquitynilé par l'E3 ubiquitine-ligase *Mind Bombe 1* (MIB1) ce qui réduit son niveau à la membrane plasmique. Cette diminution de Ryk à la membrane conduit à la répression des gènes liée à une activité  $\beta$ -caténine dépendante (Berndt et al., 2011) ce qui suggère un lien entre Ryk et la  $\beta$ -caténine. En effet le fragment Ryk-ICD peut se lier à la  $\beta$ -caténine, réprime ses effets de co-facteur. Nous détaillerons cela dans la partie iii.

ii) Implication de Ryk dans la voie PCP

Ryk est impliqué dans la voie de signalisation Wnt/PCP, il active RhoA, un effecteur en aval de la signalisation PCP (Macheda et al., 2012). L'analyse détaillée de deux organismes modèles vertébrés a montré que des phénotypes Ryk étaient compatibles avec la signalisation PCP. Chez le poisson zèbre, l'inactivation de *ryk* a révélé une interaction entre Ryk et Wnt11 au cours du processus de l'extension des embryons régulé par la voie

régulée PCP (Macheda et al., 2012). Des embryons de souris déficients en *ryk* présente une perturbation de polarité des stéréocils, un phénotype associé à un dysfonctionnement de la signalisation PCP. Cette perturbation est médiée par une interaction entre Ryk et VANGL2 qui forme un complexe protéique (Andre et al., 2012; Macheda et al., 2012).

iii) la voie Ryk-ICD

L'activité de Ryk est aussi médiée par son fragment intracellulaire Ryk-ICD. Le fragment Ryk-ICD est issu du clivage de Ryk par les gamma-sécrétases. Ce clivage permet la libération du fragment Ryk-ICD dans le cytoplasme et la translocation de Ryk-ICD dans le noyau avec notamment un rôle dans la différenciation des cellules souches neurales en réponse à une stimulation par les ligands Wnt (Lyu et al., 2008b). Le domaine intracellulaire Ryk-ICD est stabilisé dans le cytoplasme par Cdc37 (Lyu et al., 2009) et les ligands Wnt comme Wnt3a favoriseraient la translocation nucléaire de Ryk-ICD (Lyu et al., 2008b). Les effets transcriptionnels du fragment Ryk-ICD et ses mécanismes de translocation sont inconnus à ce jour. Nous verrons dans la partie III que Ryk peut se lier à la  $\beta$ -caténine et qu'il forme avec FOXO3 et la  $\beta$ -caténine, un complexe tripartite. Nous étudierons les effets potentiels de la formation de ce complexe sur la régulation de gènes considérés comme cibles de FOXO3 et dépendants ou non de la mHTT.

## **Chapitre 4 - Cellules Souches Humaines et Modèle Neurodéveloppemental**

Les premières utilisations de cellules souches pluripotentes humaines reposaient sur l'utilisation de cellules souches embryonnaires. Ces cellules sont prélevées dans la masse cellulaire interne du blastocyste chez les embryons humains issus de fécondation *in vitro*. Bien que leurs utilisations présentent un avenir prometteur dans le monde de la recherche et dans le monde médical, leur provenance et leur utilisation potentielle soulèvent des problèmes éthiques conséquents.

Afin de contourner ces limites, en 2006, Shinya Yamanaka réalise un exploit scientifique. En s'appuyant sur les travaux de John Gurdon, il parvint à dédifférencier des cellules matures. Via des agents rétroviraux, Yamanaka et collègues (Takahashi and Yamanaka, 2006) introduisent dans des fibroblastes de souris adultes, quatre facteurs de transcription présents dans les cellules souches embryonnaires : *Myc*, *Oct3/4*, *Klf4* et *Sox2*. L'introduction de ces facteurs induit la dédifférenciation des cellules matures vers un état de pluripotence caractéristique de l'état embryonnaire. En 2007, ce sont des cellules humaines adultes que l'équipe de Yamanaka (Takahashi et al., 2007) parvint à dédifférencier en cellules souches pluripotentes induites (iPSC) en utilisant le même procédé.

A présent, et ce depuis son apparition, la technologie iPSC a déjà montré un fort potentiel en tant que modèle pour de nombreuses maladies. Ce potentiel est encore renforcé par la combinaison de la technologie iPSC avec le génie génétique (TALENs, CRISPR) qui permet la correction des mutations dans les iPSC dérivées de patients, ainsi que la modification de gènes pour faciliter la différenciation vers des types cellulaires spécifiques. La conclusion selon laquelle il est possible de moduler l'identité des cellules a également introduit la possibilité de reprogrammation directe, dans lequel la conversion du destin cellulaire est obtenue par la surexpression de multiples facteurs de transcription sans revenir à un état pluripotent.

L'existence actuelle des iPSC fournit des preuves solides que les facteurs de transcription, en particulier les « master regulators » à la base de l'identité cellulaire, peuvent modifier le destin des cellules.

Comme pour beaucoup d'autres maladies neurodégénératives, de nombreuses découvertes concernant la MH ont été faites par l'intermédiaire d'animaux transgéniques et des cultures primaires de neurones de rongeurs. Comme les cellules humaines malades ne sont pas si aisées à obtenir, la plupart des travaux pour la compréhension des mécanismes pathogéniques de la MH ont été effectués sur des tissus murins et malgré une modélisation réussie de plusieurs aspects de la MH *in vivo* et *in vitro*, des thérapies qui semblaient bénéfiques dans ces modèles se sont avérées décevantes au cours des essais cliniques humains.

Plus récemment, les études dans les tissus humains étaient limitées aux cellules immortalisées ou transformées, aux tissus fixés *post-mortem* et aux échantillons de sang. Bien qu'utiles à certains égards, les cellules immortalisées ont des propriétés biologiques fondamentalement différentes de celles des cellules du cerveau tandis que les tissus fixés sont soumis à la modification de l'ADN et de l'ARN, et la disponibilité de ces tissus est limitée. Quant aux échantillons de sang, ils sont utiles pour détecter des changements d'expression des gènes qui peuvent ainsi être utilisés comme biomarqueurs de la progression de la maladie (Borovecki et al., 2005; Lovrecic et al., 2009; Long et al., 2012) ; mais ces changements ne récapitulent que certaines caractéristiques moléculaires de la MH.

La découverte des iPSC offre de nouvelles possibilités passionnantes pour développer des modèles de la MH *in vitro* qui reflètent plus précisément la maladie humaine. Ces cellules obtenues directement auprès des patients MH peuvent proliférer indéfiniment et se différencier en MSN, le sous-type de neurones sensibles dans la MH. Bien que la MH soit une maladie avec une déclaration tardive, des données récentes suggèrent que les iPSC issus de patients Huntington récapitulent plusieurs aspects de la maladie humaine (An et al., 2012a; TheHD-Consortium, 2012). Nous allons décrire dans les paragraphes suivant les cellules souches, des caractéristiques à l'obtention en passant par leurs utilités et leurs limites.

## **1. Cellules souches**

La notion de cellule souche (CS), traduction de l'expression anglaise « *stem cell* » a été introduite pour la première fois en 1883 mais n'en avait pas encore la signification qu'on lui connaît en 2016 (Rey, 2003). Les cellules souches ou cellules indifférenciées sont définies par leur capacité à s'auto-renouveler à l'identique et à se différencier en type(s) cellulaire(s) spécialisé(s) (Tiedemann et al., 2001). Elles sont présentes à la fois au stade embryonnaire, menant à la formation des tissus qui constitueront l'organisme, mais également dans l'organisme adulte, où elles sont localisées dans des endroits protégés appelés « niches ». Les cellules souches adultes permettent la régénération des tissus et ainsi le maintien de l'homéostasie tissulaire. Leur perte, même partielle, peut avoir des conséquences désastreuses. De manière globale, les cellules souches sont trouvées chez tous les êtres vivants multicellulaires. Le terme de cellules souches rassemble une grande variété de cellules aux potentiels divers.

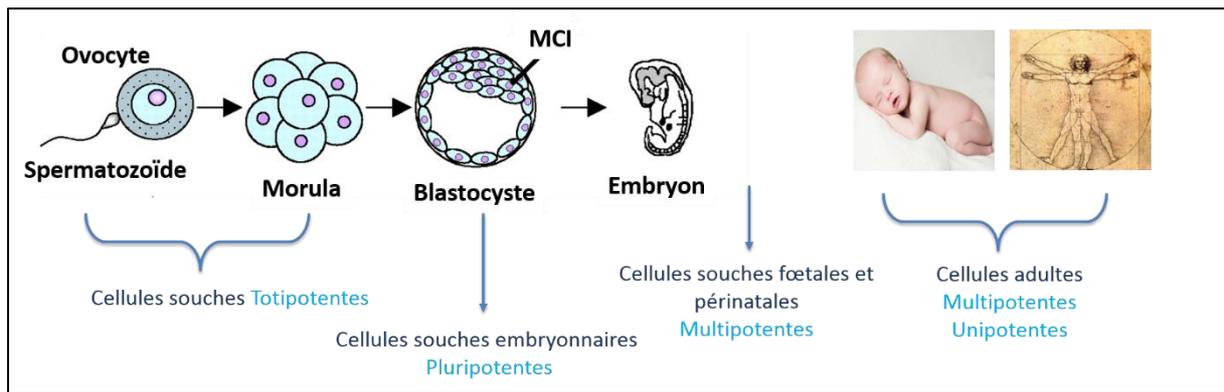
### **1.1. Différents types de cellules souches**

Les cellules souches peuvent être classées en 3 différents grades de différenciation qui sont issus de 3 étapes du développement embryonnaire. Après fécondation et jusqu'au stade morula (chez l'Homme, 4 jours après la fécondation), les cellules ont la capacité de se différencier dans tous les types cellulaires embryonnaires et extra-embryonnaires, et sont dites **totipotentes**.

Au 5<sup>ème</sup> jour, l'embryon n'est plus homogène et est implanté dans l'utérus. Au sein du blastocyste, seule la masse cellulaire interne (MCI) formera l'embryon. Les cellules de la MCI sont dites **pluripotentes** c'est-à-dire quelles sont capables de se différencier en tissus embryonnaires ainsi qu'en cellules germinales.

Au cours de la gastrulation, les cellules souches pluripotentes se différencient vers l'un des trois feuilletts embryonnaires ou participent à la lignée germinale. Ces cellules qui sont différenciées et peuvent donner plus de quatre types cellulaires différents sont dites **multipotentes**. Elles présentent un potentiel de différenciation diminué par rapport aux CS pluripotentes puisqu'elles sont déjà engagées dans un programme de différenciation tissulaire spécifique. Ces cellules sont présentes au cours du développement embryonnaire mais aussi chez l'adulte, protégées dans des niches. Chez l'adulte, on distingue notamment les CS mésenchymateuses à l'origine des lignées ostéoblastiques, chondroblastiques et adipocytaires (Santamaria-Martinez et al., 2009) situées dans la moelle osseuse. On y retrouve aussi les cellules souches hématopoïétiques qui donnent naissance aux cellules sanguines (thrombocytes, leucocyte, érythrocyte) (Lim et al., 2013). Enfin, on trouve aussi des cellules souches neurales (CSN) localisées au niveau de deux zones du cerveau chez l'adultes : la zone sous ventriculaire et le gyrus denté de l'hippocampe, cellules qui peuvent se différencier en neurones et en cellules gliales (Decimo et al., 2012) (**Figure 26**).

On peut distinguer des rangs inférieurs de CS. Les cellules **tri/bipotentes** qui comme leur nom l'indique, ont la capacité de se différencier respectivement en trois ou deux types cellulaires. A titre d'exemple de CS tri/bipotentes localisées au niveau de la moelle, on distingue : les CS chondro-ostogéniques (Ohgushi and Caplan, 1999) ou encore les CS chondro-ostéo-adipogéniques (Pittenger et al., 1999)



**Figure 26 : Différents stades de potence cellulaire.**

## 1.2. Cellules souches pluripotentes

Comme nous l'avons vu précédemment, on retrouve cette capacité de différenciation presque illimitée uniquement dans les cellules embryonnaires. Il existe différents types de cellules pluripotentes, nous en citerons quatre d'origine embryonnaire et un issu de la reprogrammation, modèle d'étude utilisé pour nos travaux.

### i) Cellules embryonnaires du carcinome

Historiquement, des cellules indifférenciées ont été observées dès 1964 à partir des cellules tumorales testiculaires de souris et donnant tous types de cellules (muscle, cartilage, tissu neural). La recherche débuta vraiment dans les années 1970 quand il fut possible d'induire des tératocarcinomes, et d'obtenir ainsi ce qu'on nomma les cellules embryonnaires carcinomiques (ECC), des cellules pluripotentes. Ces cellules ont la capacité de se multiplier en conservant leurs caractéristiques en culture *in vitro*. L'étude de ces cellules a permis de mettre en évidence l'importance de la présence de feeders (ou cellules nourricières), pour le maintien à l'état indifférencié (Smith and Hooper, 1983; Draper et al., 2004; Kieffer et al., 2010).

### ii) Cellules souches embryonnaires

C'est en 1981 que sont générées les premières générations de cellules embryonnaires murines (mESC) dérivées de la MCI au stade blastocyste (Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1982). Les mESC ont un potentiel de pluripotence bien plus large que celui des ECC et permettent la génération de multiples modèles murins. Les cultures obtenues contenaient des populations cellulaires se développant sous forme de colonies. On a beaucoup appris suite à la génération de lignées de mESC en termes de méthodes de prolifération, de dépendance aux facteurs de croissance, et d'expression de marqueurs caractéristiques des stades précoces du blastocyste, tels que le facteur de transcription à domaine POU (*Pit-1*

*Oct-1 Unc-86*) **Oct 3/4** (*Octamer Transcription Factor 3/4*) (Rosner et al., 1990; Scholer et al., 1990), le facteur de transcription à homéodomaine **Sox** (*SRY-related HMG-box gene 2*) (Yuan et al., 1995) , le gène **Rex-1** (*Reduced Expression Protein 1*) (Rogers et al., 1991), l'activateur transcriptionnel **Utf-1** (*Undifferentiated embryonic cell transcription factor 1*) (Okuda et al., 1998), ainsi que les épitopes **Ssea-1** et **Ssea-3** (*stage-specific embryonic antigen 1/3*) (Krupnick et al., 1994). L'étude des conditions de culture nécessaires pour le maintien de la pluripotence a permis de mettre en évidence l'importance de la présence de **Lif** (*Leukemia Inhibitory Factor*) pour le maintien à l'état indifférencié des mESC (Smith et al., 1988). Il faudra attendre 1988 pour que les premières ESC humaines (hESC) et de primates soient générées (Thomson et al., 1998b; Thomson and Marshall, 1998; Thomson et al., 1998a). Des études suggèrent que des différences existent entre les lignées ES souris et humaines. Similaires aux cellules mES, les hESC expriment des antigènes embryonnaires spécifiques tels que **SSEA-1**, au moins quelques-unes des hESC expriment des marqueurs de surface (glycolipides et des glycoprotéines) qui ont été initialement identifiés sur les ECC comme **SSEA-3**, **SSEA-4**, **TRA-1-81** (*teratocarcinoma-related antigen 1–81*), **TRA-1-60**.

iii) Cellules souches de l'épiblaste (EpiSC)

Des lignées de cellules souches pluripotentes murines ont été établies à partir de l'épiblaste après l'implantation des embryons (stade embryonnaire E5,5 à E6,5). Ces cellules sont appelées EpiSC (*epiblast stem cell*). Les EpiSC diffèrent de manière significative des ES murines mais partagent des caractéristiques communes avec les cellules ES humaines (Brons et al., 2007; Tesar et al., 2007).

iv) Cellules embryonnaires germinales (EGC)

Au stade de la gastrulation, seules les cellules germinales primordiales (PGC) conservent des caractéristiques de pluripotence. Ces PGC sont des précurseurs des ovocytes et des spermatozoïdes qui sont prélevés sur les crêtes génitales d'embryons avortés entre la cinquième et la neuvième semaine de développement (Shamblott et al., 1998). C'est de là que sont issues les cellules embryonnaires germinales (EGC), chez l'Homme comme chez la souris.

v) Cellules souches pluripotentes induites (iPSC)

C'est en combinant les connaissances acquises sur la reprogrammation nucléaire et sur les cellules souches pluripotentes que Takahashi et Yamanaka réussirent en 2006 à reprogrammer des fibroblastes murins. En 2007, ce sont des cellules humaines adultes qu'ils parvinrent à dédifférencier.

## **2. Cellules souches pluripotentes induites ou iPSC**

En 2012, le Japonais Shinya Yamanaka et le Britannique John Gurdon sont récompensés pour leurs travaux sur la reprogrammation nucléaire. En 1962, John Gurdon a découvert que l'ADN d'une cellule de grenouille adulte (Gurdon, 1962) contenait toutes les informations nécessaires pour transformer une cellule en tous les autres types de cellules. En utilisant la technique du SCNT (*Somatic Cell Nuclear Transfert*) mise au point par Gurdon, la naissance de la brebis Dolly en 1996 était la preuve ultime que les cellules de mammifères peuvent être reprogrammées et établir un état entièrement totipotent. C'est ainsi qu'en 2006, le Japonais Shinya Yamanaka a découvert que des fibroblastes embryonnaires de souris pouvaient être reprogrammés et redevenir immatures (Takahashi and Yamanaka, 2006).

Jusqu'alors, les cellules ES représentaient la seule source de cellules souches pluripotentes. Bien que beaucoup de points restent à vérifier, les cellules souches induites représentent actuellement une source cellulaire inépuisable présentant les mêmes capacités de différenciation que les cellules ES et ne nécessitant pas la destruction d'embryon. La découverte de Yamanaka a permis d'apporter de nouvelles options à la fois pour la recherche fondamentale et clinique, en fournissant d'une part des modèles d'étude patient-dépendant et d'autre part un modèle thérapeutique.

### **2.1. Différenciation des fibroblastes en iPSC**

#### **2.1.1. Choix de la cellule initiale**

Depuis 2006, de nombreux types cellulaires ont été reprogrammés, de la souris à l'Homme en passant par les primates. La grande diversité des cellules qui ont été reprogrammées démontre que la majorité des types cellulaires peuvent être dédifférenciées. Cependant les fibroblastes restent le type cellulaire de prédilection pour la reprogrammation. Ce sont des cellules facilement accessibles par biopsies cutanées, facilement amplifiables et facilement modifiable génétiquement.

Le choix des cellules initiales est critique pour l'efficacité et la cinétique de reprogrammation. La reprogrammation des fibroblastes avec les facteurs OSKM a une efficacité de 0,01% à 0,1% alors que la reprogrammation des kératinocytes a une efficacité de l'ordre de 1% (Aasen et al., 2008). Cependant leur mise en culture est bien plus compliquée que celle des fibroblastes, ce qui fait des fibroblastes, un type cellulaire à privilégier.

Les cellules somatiques, contrairement aux iPSC qui peuvent se renouveler de manière infinie, ont un nombre limité de division cellulaire et suite au vieillissement, rentrent en phase de sénescence répllicative. La sénescence apparaît donc comme incompatible avec la reprogrammation vers la pluripotence. Dans ce sens, l'accumulation de nombreux passages est associée à une diminution drastique de l'efficacité de reprogrammation (Utikal et al., 2009). Cependant des cellules sénescents particulièrement âgées ont pu être reprogrammées en forçant l'expression de 6 facteurs - *OCT4*, *SOX2*, *KLF4*, *MYC*, *LIN28* et *NANOG*. (Lapasset et al., 2011). Lapasset et collègues ont montré que la reprogrammation « rajeunissait » les cellules par notamment un rallongement des télomères et un métabolisme mitochondriale qui apparaissait similaire à celui des ESC.

Il faut aussi noter que la sous-expression de gènes suppresseurs de tumeurs tels que *p53*, *p21<sup>Cdkn1a</sup>*, *p16<sup>Ink4a</sup>* et *p19<sup>Arf</sup>* dans les fibroblastes améliore l'efficacité et la cinétique de la reprogrammation en induisant l'immortalisation des cellules et en interférant avec l'apoptose. Cependant, la reprogrammation en l'absence de *p53* entraînait une augmentation des altérations génétiques (Ho et al., 2011).

### 2.1.2. Facteurs de reprogrammation

Afin de « rajeunir » des cellules somatiques au stade cellules souches pluripotentes, l'équipe de Yamanaka a cherché à identifier les gènes impliqués dans le maintien de la pluripotence et de l'auto-renouvellement des cellules souches embryonnaires. Ils ont pu identifier 24 gènes permettant la reprogrammation des cellules somatiques. Individuellement, ces gènes n'induisent pas la reprogrammation cellulaire mais l'expression simultanée des 24 gènes permet l'apparition de cellules avec une morphologie proche des cellules souches embryonnaires de souris. Ils ont pu établir que la réactivation d'un cocktail de 4 chez la souris appelé les facteurs de Yamanaka (ou OSKM): *Myc*, *Oct3/4*, *Klf4* et *Sox2* permettait le rajeunissement cellulaire (Takahashi and Yamanaka, 2006) (**Figure 27**). Ce cocktail de facteurs de transcription, OSKM, permet la reprogrammation de différents types de cellules somatiques et ce, pour différentes espèces, y compris le singe rhésus (Liu et al., 2008a) et les cellules humaines (Takahashi et al., 2007).

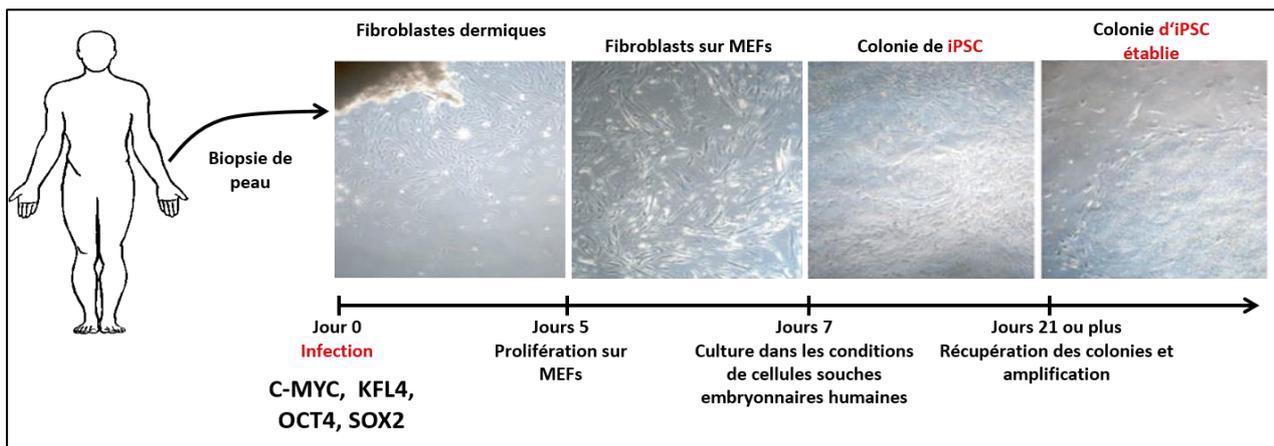
En 2007 plusieurs équipes parvinrent à reproduire le protocole de Yamanaka et ainsi générer des iPSC à partir de fibroblastes murins (Blüthgen et al., 2007; Meissner et al., 2007; Wernig et al., 2007).

Au cours de cette même année, Takahashi et Yamanaka, appliquèrent leur protocole de différenciation sur des cellules humaines (Takahashi et al., 2007; Yu et al., 2007). De la même manière que chez les souris, les iPSC humaines présentaient les caractéristiques

morphologiques des cellules souches embryonnaires humaines (marqueurs membranaires, facteurs de transcription) et sont aussi capables de former les trois feuillets embryonnaires.

S'en suit l'apparition de nombreux autres cocktails de reprogrammation directe comme celui décrit par Yu et collègues qui permet la reprogrammation de fibroblastes humains en utilisant les gènes suivant : *OCT4*, *SOX2*, *NANOG* et *LIN28* (Yu et al., 2007), ce qui suggère que *OCT4* et *SOX2* sont indispensables alors que *NANOG*, *LIN28*, *KLF4* et *MYC* sont des facteurs de soutien alternatifs. Par la suite, la majorité des laboratoires utiliseront les facteurs de Yamanaka pour générer des iPSC.

Des études ultérieures ont démontré que moins de facteurs sont nécessaires pour la reprogrammation; le gène *MYC*, un oncogène, n'est pas indispensable bien qu'en son absence, l'efficacité de reprogrammation des iPSC est nettement plus faible et le temps de reprogrammation beaucoup plus long (Nakagawa et al., 2008). Dans certains cas, comme celui des cellules souches neurales, l'expression d'un seul facteur (*OCT4*) est suffisante (Kim et al., 2009).



**Figure 27 : Protocole de reprogrammation des fibroblastes humains jusqu'au stade iPSC.** Les fibroblastes humains sont mis en culture sur MEF avec le cocktail de reprogrammation OSKM. Au bout de 21 jours environ, les premières colonies iPSC sont établies. Des nombreuses validations sont à faire pour évaluer la dédifférenciation et l'état de pluripotence des cellules (Park et al., 2008a).

### 2.1.3. Techniques de reprogrammation

#### 2.1.3.1. Approches intégratives

Les premières générations iPSC ont été établies à l'aide d'approches dites intégratives, c'est-à-dire en intégrant directement dans le génome des fibroblastes les facteurs de reprogrammation. Différentes techniques ont été mises au point afin d'optimiser l'efficacité de reprogrammation et d'extinction des facteurs étant donné que

seul les iPSC avec une activation des gènes de pluripotence et une extinction des transgènes, sont considérées comme reprogrammées (Hotta and Ellis, 2008). Ce silencing est d'autant plus important que certains facteurs comme *MYC* sont des gènes oncogènes.

i) Vecteurs rétroviraux

La première génération d'iPSC a été créée à l'aide de vecteurs rétroviraux. Les fibroblastes de souris ont été transduits à l'aide de vecteurs rétroviraux dérivés du MMuLV - virus de la leucémie murine de Moloney (*Moloney murine leukemia virus*). Les MMuLV sont des rétrovirus à ARN monocaténaire et contiennent une reverse transcriptase (RT) qui assure la rétro-transcription du génome d'ARN en ADN une fois la cellule infectée. L'ADN est ensuite intégré dans le génome de cellules infectées lorsque celles-ci se divisent.

L'intégration permanente dans le génome de ces vecteurs pose un certain nombre de problèmes. En premier lieu, il y a un risque fort de mutagenèse insertionnelle. D'autre part l'extinction des vecteurs, même si elle est généralement efficace, n'est pas toujours complète et il peut persister une expression résiduelle qui peut limiter la capacité de différenciation des cellules reprogrammées (González et al., 2011). Enfin, l'expression des vecteurs peut être ultérieurement réactivée et affectée la prolifération ou la différenciation des cellules. Par exemple, la réactivation de *Myc* dans des souris chimériques serait responsable de la formation de tumeurs (Okita et al., 2007).

D'autres méthodes d'apport des facteurs de dédifférenciation ont été développées, avec comme objectif soit d'améliorer l'efficacité du processus, soit de le rendre plus sûr.

ii) Vecteur lentiviraux

Les vecteurs lentiviraux ont également été utilisés avec succès pour exprimer l'ensemble des facteurs de reprogrammation (Blelloch et al., 2007; Yu et al., 2007). Ils sont généralement issus du VIH (Virus d'Immunodéficience Humaine). Ils permettent à la fois l'infection des cellules en division et les cellules ne se divisant pas. Cependant, par rapport aux rétrovirus, les lentivirus sont moins efficacement réprimés dans les iPSC ; ce qui peut compliquer l'identification des clones iPSC de bonne qualité (Hotta and Ellis, 2008).

La reprogrammation à l'aide de virus entraîne la production de particules virales potentiellement nocives qui expriment des oncogènes puissants tels que *MYC*. Les lignées iPSC générés en utilisant ces vecteurs portent des insertions de transgènes distribuées au hasard dans le génome (Varas et al., 2009) ce qui pourrait perturber l'expression de gènes

suppresseurs de tumeur ou alors des oncogènes. De plus, les virus génèrent inévitablement des lignes iPSC.

Même bien inactivés, les transgènes viraux peuvent éventuellement être réactivés au cours de la différenciation, au cours du cycle de vie des iPSC à l'apparition de tumeurs (Okita et al., 2007).

### iii) Transfection de vecteurs linéaires

Afin d'éviter l'utilisation de vecteurs viraux, la transfection d'ADN de référence en utilisant des liposomes ou la technique d'électroporation est une bonne alternative. Une amélioration essentielle a été faite depuis la conception de vecteurs polycistroniques qui permettent l'expression de plusieurs ADNc à partir du même promoteur. Ces constructions comprennent des séquences peptidiques 2A auto-destructrices (d'environ 20 acides aminés de long) du virus de la fièvre aphteuse (VFA). Lorsqu'il est cloné entre les différents ADNc, le peptide 2A permet aux ribosomes de continuer la traduction du cistron après la sortie de la première protéine à son extrémité carboxy-terminale fusionnée à 2A. Cela se traduit par l'expression de quantités pratiquement stœchiométriques de chaque protéine codée par le polycistron. Un tel système a été testé avec succès sur les ESC (Hasegawa et al., 2007). En utilisant un vecteur polycistronique avec un peptide 2A linéarisé flanqué par des sites loxP qui permet de supprimer la cassette de reprogrammation, des fibroblastes de souris ont été reprogrammés avec succès.

Le principal avantage de cette approche est la possibilité de supprimer les ADNc de reprogrammation, ce qui améliorerait le potentiel de différenciation des iPSC et, plus important encore, d'éviter la réactivation ou l'expression constitutive d'un des facteurs de reprogrammation, et ainsi, en théorie, réduire leur potentiel oncogène.

### iv) Système piggyBac transposon

Pour améliorer l'intégration stable de constructions non virales, certaines équipes ont déplacé les vecteurs de base dans un système piggyBac (PB) transposon (Cary et al., 1989). La transposase PB est active dans les cellules souches embryonnaires de souris (Wang et al., 2008) et humaines (Lacoste et al., 2009), et assure une meilleure intégration génomique que l'intégration aléatoire de plasmides linéarisés. Le système de reprogrammation PB comprend la transposase PB qui permet le transfert de gènes et un transposon contenant la séquence d'intérêt flanquée aux niveaux 5' et 3' (Cary et al., 1989; Fraser et al., 1995; Fraser et al., 1996). Le système PB est généralement composé d'un plasmide donneur contenant le transposon, co-transfecté avec un plasmide helper exprimant la transposase. Les transgènes linéaires issus de la Cre Recombinase laissent

une cicatrice génomique, y compris le site loxP, après suppression, alors que le système PB est, en théorie, supprimé sans modifier la séquence du site d'intégration suite à la remobilisation de la transposase. En utilisant des vecteurs de reprogrammation avec le système PB, un certain nombre de groupes de recherches ont généré des cellules souches pluripotentes humaines et murines et ensuite supprimé les transgènes (Woltjen et al., 2009; Yusa et al., 2009) conduisant ainsi à des iPSCs théoriquement génétiquement non modifiées. Parmi les méthodes d'intégration, cette approche est la seule qui garantit une suppression précise des transgènes, même si des modifications sont parfois observées dans les sites d'insertion, dont les séquences doivent donc être vérifiées (Park et al., 2008b).

Les systèmes d'intégration permettent la production efficace d'iPSC avec insertions de transgènes simples, qui sont supprimés après la reprogrammation. La suppression abaisse les risques de mutagenèse d'insertion ou l'oncogenèse (en excluant la réactivation de MYC) et l'amélioration de la capacité de différenciation des iPSC. Même si ce sont des améliorations importantes pour la sécurité et la qualité des iPSC, leurs effets possibles au cours du processus de reprogrammation en termes de stabilité génomique ou de remodelage épigénétique aberrant doivent encore être évalués.

### **2.1.3.2. Approches non-intégratives**

Les approches non-intégratives permettent de contourner certaines limites des approches intégratives : la modification génétique permanente résultant de l'intégration des vecteurs rétroviraux ou lentiviraux classiques, ou les cicatrices génomiques laissées par la suppression de vecteurs Cre-lox inducibles, les transgènes d'ADN nu ou la remobilisation de transposons non conservatrices.

En fonction de la population de départ, certaines des approches non-intégratives sont difficiles à appliquer en raison d'une faible infection ou efficacité de transfection, une faible survie cellulaire, une cinétique de reprogrammation longue ou encore d'autres limitations. Ces considérations soulignent l'un des principaux inconvénients de ces méthodes: elles sont généralement inefficaces et peu reproductibles, ce qui est la principale raison pour laquelle aucun consensus n'a encore été trouvé dans la communauté en ce qui concerne une méthode de choix.

#### i) Vecteurs viraux non-intégratifs

L'une des premières tentatives pour générer des iPSC sans intégration a été rapportée par Stadtfeld et collègues (Stadtfeld et al., 2008), qui ont utilisé un vecteur adénoviral modifié pour la réplication. Les auteurs ont cloné les facteurs OSKM seul dans le vecteur et ont été en mesure de générer des iPSC sans transgène après l'infection d'hépatocytes de souris. Ces vecteurs transfèrent efficacement des gènes étrangers dans une large gamme de cellules hôtes (Tokusumi et al., 2002) et se répliquent sous la forme d'un ssRNA (ARN simple brin) anti-sens dans le cytoplasme des cellules infectées (Li et al., 2000; Inoue et al., 2003)

## ii) Vecteurs épisomiques transitoires

Comme une alternative à l'utilisation de vecteurs viraux, certains groupes de recherches ont développé des stratégies de reprogrammation à partir de vecteurs épisomiques réplicatifs ou non-réplicatifs (Okita et al., 2008; Gonzalez et al., 2009; Jia et al., 2010a). Les iPSC sont obtenues par transfection en série de deux plasmides exprimant respectivement, OSK et MYC (Okita et al., 2008; Okita et al., 2010), ou un seul plasmide exprimant l'ensemble des facteurs OSKM comme un polycistron (Gonzalez et al., 2009). Les cellules souches obtenues n'ont montré aucun signe d'intégration plasmidique.

Afin de diminuer la taille des épisomes de reprogrammation et la suppression des séquences du squelette procaryote potentiellement méthylés, des vecteurs minicirculaires représentent une solution intéressante afin d'assurer l'expression des facteurs de reprogrammation en tant qu'épisome non-intégratifs et non-réplicatifs (Jia et al., 2010a). Ces vecteurs sont superenroulés, et l'origine de réplication bactérienne ainsi que la cassette de sélection sont éliminées par une recombinaison intramoléculaire avant la purification (Chen et al., 2003b; Chen et al., 2005). En comparaison avec des plasmides, les vecteurs minicirculaires montrent une plus forte efficacité de transfection (leur taille est généralement réduite d'au moins de 3 kb, la taille moyenne des squelettes que l'on trouve habituellement dans des vecteurs épisomiques) et on retrouve une expression ectopique des transgènes due à l'activation moindre des mécanismes de « silencing ».

## iii) Manipulation d'ARN et de microRNA

Afin d'éliminer complètement les plasmides ou vecteurs viraux, Warren et collègues ont développé un système qui permet d'obtenir une reprogrammation efficace en iPSC en utilisant la livraison directe d'ARNm synthétiques (Warren et al., 2010). L'efficacité atteinte avec cette approche est beaucoup plus élevée que celle obtenue avec d'autres systèmes non-intégratifs. Ce système exige une modification *in vitro* des transcrits ARN afin d'échapper à la réponse endogène antivirale contre les ARN simple brin. En fournissant des

ARN synthétiques codant pour les facteurs OSKM et Lin28, la reprogrammation a été obtenue par des transfections en séries sur des populations cellulaires variées (Warren et al., 2010).

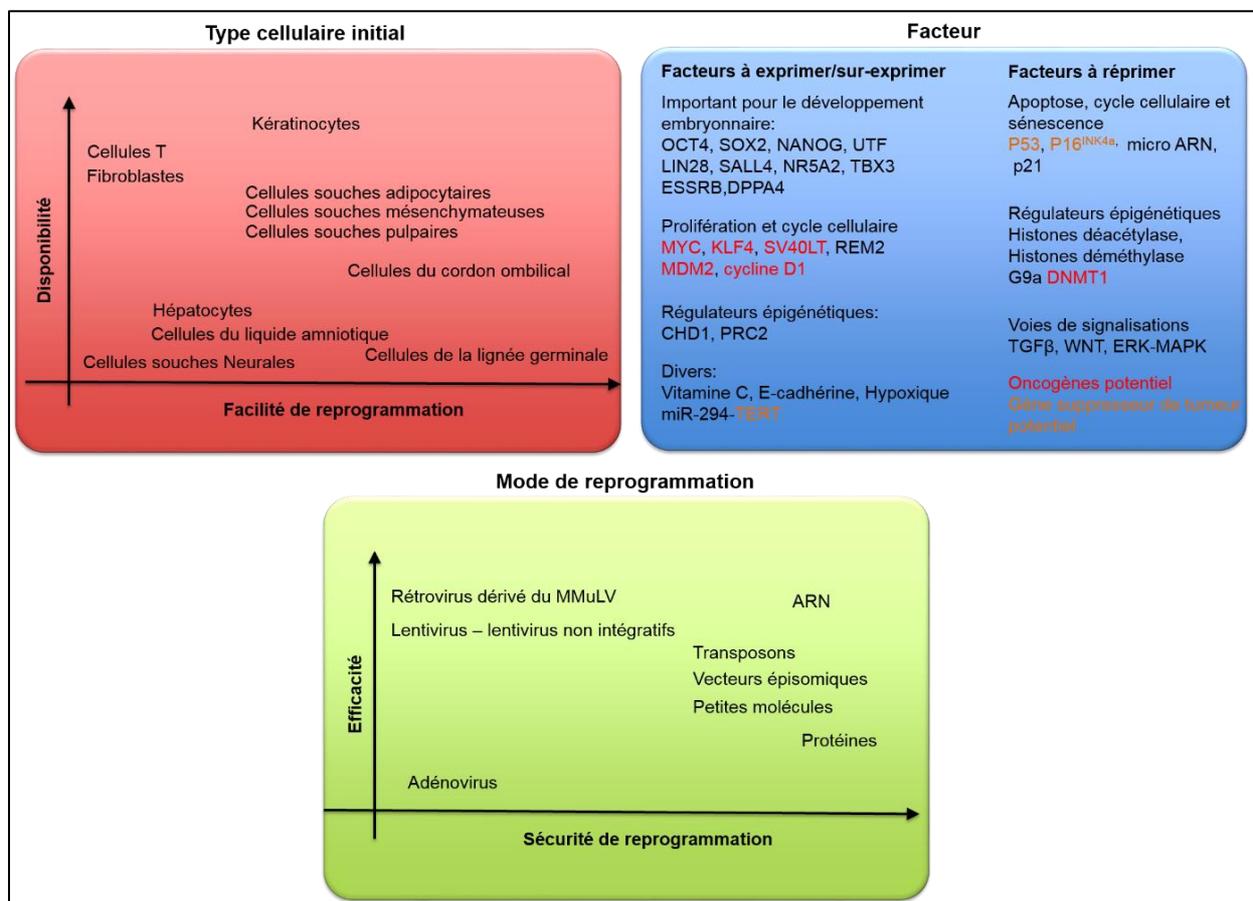
Les microARN sont de petits ARN non codants qui sont connus pour être critiques pour le contrôle de l'expression de plus d'un tiers de tous les gènes, suggérant leur implication potentielle dans la régulation de la reprogrammation nucléaire. Ils fournissent un moyen d'améliorer l'efficacité de la reprogrammation par la modulation des niveaux d'expression de certains miARN. En effet, certains miARN comme miR29b, cible directement l'ARNm codant pour plusieurs enzymes responsables de la méthylation de la cytosine (C) et la déméthylation de la 5-méthylcytosine (5-mC), via la 5-hydroxyméthylcytosine (5-HmC) (Tahiliani et al., 2009). L'équilibre entre la 5-mC et 5-HmC est lié à la reprogrammation somatique (Maherali et al., 2007).

L'étude des clusters miR-290-295, qui constituent plus de 70% de l'ensemble de la population miARN dans les ESC murines, a établi qu'ils étaient d'importants régulateurs du cycle cellulaire dans les ESC (Marson et al., 2008). Les clusters miARN tels que miR-291-3p, miR-294 et miR-295 ont quant à eux la capacité d'améliorer l'efficacité de reprogrammation médié par *Klf4*, *Oct4* et *Sox2*, mais pas en présence de MYC (Judson et al., 2009). Cela pourrait impliquer leur utilisation comme amplificateur de l'efficacité de reprogrammation, sans interventions exogènes dans l'ADN génomique des cellules hôtes

#### Protéines de transduction

Une autre façon d'éviter l'introduction de matériel génétique exogène dans les cellules initiales est de fournir les facteurs de reprogrammation sous forme de protéines. Plusieurs études ont démontré que les protéines peuvent être délivrées directement dans les cellules *in vitro* et *in vivo* fusionnées avec des peptides assurant leur transfection, tels que le transactivateur de la transcription du VIH (Tat) et la polyarginine (Wadia and Dowdy, 2002; Michiue et al., 2005; Inoue et al., 2006). En utilisant cette approche, Zhou et collègues ont généré des protéines OSKM recombinantes fusionnées à un domaine de transduction de polyarginine (Zhou et al., 2009). Ils ont exprimé ces protéines modifiées dans des corps d'inclusion chez *Escherichia coli*. Les protéines ont été ensuite solubilisées, repliées et purifiées. Bien que prometteuse, cette stratégie présente une cinétique très lente et une faible efficacité. En outre, les protéines recombinantes utilisées dans ces méthodes sont généralement difficiles à purifier de manière reproductible dans les quantités requises, ce qui les rend difficilement utilisables en routine.

À l'heure actuelle, il est toujours difficile de choisir une stratégie de reprogrammation qui convient à toutes fins (**Figure 28**). Depuis la première publication de la reprogrammation des fibroblastes par administration rétroviral de seulement quatre facteurs (OSKM), un nombre important d'autres approches ont été développées pour induire la pluripotence à partir de cellules somatiques. Un défi majeur dans le domaine iPSC sera de déterminer comment ces différentes méthodes affectent la qualité des iPSC en termes de signatures transcriptionnelles, l'état épigénétique, l'intégrité du génome, la stabilité, la différenciation et le potentiel tumorigène. Les plates-formes de séquençage du génome entier vont probablement jouer un rôle important à l'avenir dans l'évaluation de l'intégrité du génome d'iPSC et vont certainement améliorer notre compréhension du mécanisme par lequel la reprogrammation se produit dans un type de cellule spécifique.



**Figure 28 : « Menu » de reprogrammation.** Toute expérience de reprogrammation est déterminée par un certain nombre de choix préliminaires concernant le type de cellule initiale à reprogrammer, les facteurs à utiliser et méthode de livraison des facteurs. Ces choix dépendent non seulement de la disponibilité des cellules, mais aussi du but de la reprogrammation. Cette figure montre comment le type de cellule, les facteurs de reprogrammation et la méthode de livraison peuvent être évalués et choisis. CHD1, *chromodomain-helicase-DNA-binding protein 1*; DNMT1, *DNA methyltransferase 1*; DPPA4, *developmental pluripotency associated 4*; E-cadherin, *epithelial cadherin*; ERK, *extracellular*

*signal-regulated kinase*; MAPK, *mitogen-activated protein kinase*; MMLV, *Moloney murine leukaemia virus*; PRC2, *Polycomb repressive complex 2*; SV40LT, *SV40 large T antigen*; TERT, *telomerase reverse transcriptase*; TGF $\beta$ , *transforming growth factor- $\beta$* .

## 2.2. Caractéristiques spécifiques des iPSC

Une des questions les plus importantes concernant les iPSC est de savoir si elles sont différentes des hESC et, dans l'affirmative, si les différences qui existent sont pertinentes. Durant les premières années après les premières générations d'iPSC, la similarité entre iPSC et ESC faisaient des iPSC, source inépuisable de futures découvertes pour la médecine. Cependant, dès 2009, les scientifiques ont commencé à déclarer la présence de différences entre iPSC et ESC. Des analyses sur puces à ADN des lignées humaines d'ESC et d'iPSC ont montré une différence d'expression pour plus d'une centaine de gènes (Chin et al., 2009). Deux autres études ont également comparé l'expression globale des gènes entre iPSC et ESC, et ont identifié la présence d'un profil d'expression génique résiduel issue du donneur dans les iPSC (Marchetto et al., 2009; Ghosh et al., 2010). Deng et collègues ont rapporté des différences de méthylation de l'ADN entre les deux types cellulaires (Deng et al., 2009), notamment des gènes comme BMP3 (Doi et al., 2009). Enfin d'autres études rapportent des effets résiduels épigénétiques du donneur dans les iPSC (Kim et al., 2011; Lister et al., 2011; Ohi et al., 2011).

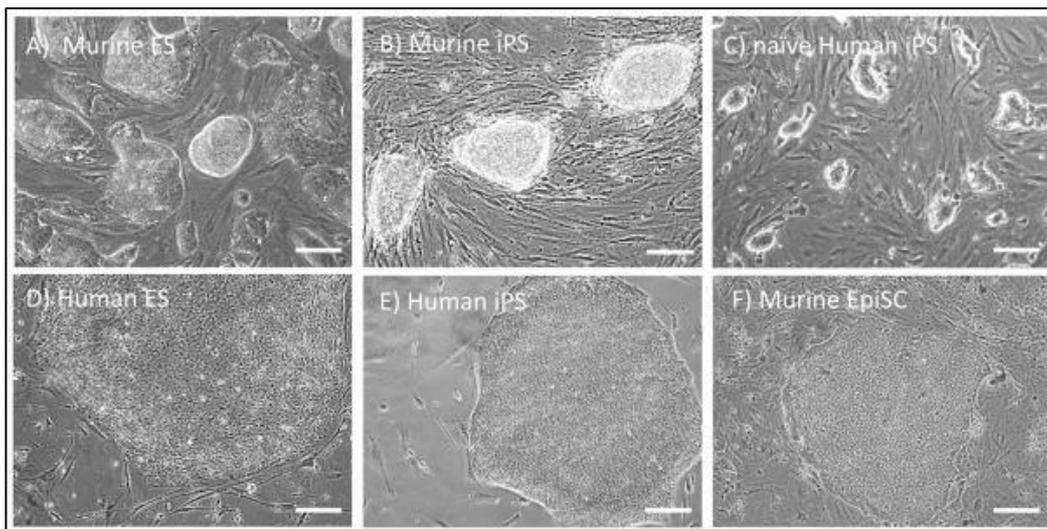
Cependant, d'autres études ont conclu qu'il était difficile de faire une distinction entre iPSC et ESC en analysant les données d'expression géniques, la méthylation de l'ADN ou encore la structure de la chromatine (Guenther et al., 2010; Newman and Cooper, 2010) et que les variations retrouvées étaient en partie induites par les conditions d'induction et de culture utilisées dans chaque laboratoire. De plus Bock et collègues ont montré que les iPSC et ESC sont très similaires de par leur expression génétique et leur méthylation de l'ADN (Bock et al., 2011) et que certaines clones iPSC ne peuvent pas être distingués des ESC. En comparant les différentes études, Shinya Yamanaka (Yamanaka, 2012) indique que les différentes études rapportant une différence entre les iPSC et ESC ont analysé un nombre faible de clones, contrairement aux études qui ne distinguent pas de différences et qui ont analysé de nombreux clones provenant de différents laboratoires.

Les iPSC sont appelées ES-like, du fait de leurs similitudes avec les cellules ES. Cependant, certains clones peuvent provenir d'une reprogrammation incomplète et, malgré des similitudes morphologiques ou phénotypiques avec les cellules ES, diffèrent par leur potentiel de pluripotence. Ainsi, la caractérisation des clones iPSC est indispensable afin de sélectionner les lignées véritablement pluripotentes et de vérifier l'absence d'anomalies

délétères, cytogénétiques ou moléculaires, engendrées par les techniques de reprogrammation.

i) Caractéristiques morphologiques

Le changement de morphologie est une des premières indications de la reprogrammation en iPSC. Les cellules souches pluripotentes deviennent des amas ronds que l'on nomme colonies. Elles sont visibles au microscope et très réfringentes à la lumière (**Figure 29**).



**Figure 29 : Morphologie des différents types de cellules souches pluripotentes** : Les ESC (a) et les iPSC (b) de souris forment des colonies en forme de dôme, réfractaires à la lumière. Ces colonies sont en contraste avec la morphologie aplatie des cellules souches épiblastiques de souris (f) qui ressemblent aux cellules souches embryonnaires humaines (d) et aux iPSC humaines (e) (Robinton and Daley, 2012).

ii) Caractéristiques moléculaires

Durant la reprogrammation, les cellules différenciées éteignent des gènes qui sont exprimés à un stade différencié et activent la transcription de gènes qui sont exprimés uniquement dans un stade indifférencié. Une des vérifications importantes est la vérification des marqueurs de pluripotence tel que l'expression de marqueurs membranaires (TRA1-60/81, SSEA3/4) ou intracellulaires (OCT4, NANOG, SOX2, KLF4) caractéristiques de l'état indifférencié. La réactivation de la télomérase est recherchée. Inactive dans la plupart des cellules somatiques, elle se réactive lors de la reprogrammation afin de permettre aux cellules de se diviser sans raccourcissement de leurs télomères.

### iii) Pluripotence

Un autre facteur à vérifier est la capacité des iPSC à se différencier vers les trois feuilletts embryonnaires – mésoderme, ectoderme et endoderme – qui est le marqueur d'une reprogrammation réussie en cellules pluripotentes. Cette caractéristique est validée *in vitro* par l'induction de tumeurs embryonnaires ou tératomes chez des animaux immunodéprimés (Takahashi and Yamanaka, 2006).

## **3. iPSC : modèle neurodéveloppemental**

Les iPSC, de par leur capacité de pluripotence, présentent un intérêt majeur en offrant des modèles pathologiques humaines *in vitro*. Dans le cadre de la maladie comme la MH, un autre attrait est leur capacité à se différencier en neurones (An et al., 2012a). Ces dernières années, de nombreuses iPSC patient- spécifiques ont été générées à partir de patients atteints de la maladie de Parkinson, la myopathie de Duchenne ou encore la maladie de Huntington (Park et al., 2008b). Il a aussi été montré la capacité des iPSC à se différencier en cardiomyocytes (Blazeski et al., 2012), en cellules souches neurales (Chambers et al., 2009), en hépatocytes (Gai et al., 2010) ; et en neurone adulte. Le développement des technologies iPSC et la capacité des iPSC à se différencier en cellules somatiques patient-spécifique offrent de nouvelles perspectives pour la modélisation de maladie d'origine génétique ou sporadique.

### **3.1. Caractéristiques fonctionnelles du modèle MH**

Les iPSC peuvent modéliser bon nombre de maladies. Les premières à être décrites furent les maladies monogéniques à début précoce (Ebert et al., 2009) facile à modéliser par leur déclenchement précoce et leur phénotype connu. Nombreuses des maladies neurodégénératives sont à présent modélisées et notamment la maladie de Huntington.

L'équipe dirigée par Lisa Ellerby a développé des modèles iPSC à partir des lignées de MH induites à l'origine par Daley et collègues (Park et al., 2008a). Ces lignées ont été soumises à un protocole de différenciation modifié pour générer des MSN (Aubry et al., 2008) qui sont DARPP-32<sup>+</sup> (Zhang et al., 2010). Comme la mHTT affecte spécifiquement les neurones du striatum, les cultures différenciées sont susceptibles de comporter moins de neurones DARPP-32<sup>+</sup> s'il s'avère que ces cellules sont plus sensibles que d'autres types de cellules en culture. Cependant, aucune différence dans le pourcentage des neurones DARPP-32-positives n'a été signalée entre les cellules MH et les cellules contrôle.

Cependant, le groupe de Lisa Ellerby (Zhang et al., 2010; An et al., 2012a) a montré d'autres phénotypes liés à la MH dans les lignées produites par Daley. Éliminer les facteurs de croissance à un stade cellules souches neurales entraîne une augmentation de l'activité des caspases 3/7 dans les cellules MH par rapport aux cellules contrôle, ce qui suggère que les cellules avec la mHTT sont plus sensibles au stress, même à un stade très précoce de la différenciation (Zhang et al., 2010). Par la suite, des phénotypes supplémentaires liés à la MH ont été rapportés et l'équipe de Lisa Ellerby a « corrigé » la longueur de la répétition de 72 CAG de la lignée iPSC-72Q (72Q/19Q). Par recombinaison homologue, ils ont pu obtenir des cellules iPSC sans huntingtine mutée avec 19 et 21 CAG générant ainsi un modèle isogénique de la MH avec une lignée iPSC-MH et une lignée iPSC contrôle (iPSC-Corrected) corrigée à partir de la lignée iPSC-MH. La restauration de la longueur des polyQ a pu rétablir des changements de transcription distincts dans les voies de signalisation E-cadhérine et TGF- $\beta$  à des niveaux que l'on peut considérer comme normaux, a pu empêcher la mort cellulaire, augmenter la transcription accrue du BDNF, restaurer une fonction mitochondriale correcte et normaliser l'activité des caspases 3/7, ce qui suggère que ces modifications ont été directement induites par la présence des polyQ et qu'elles ne sont pas causées par la variabilité interlignée cellulaire. D'autres iPSC issus de patients MH ont été générées à partir de deux individus homozygotes pour la mHTT (entre 39 et 44 CAG) et un hétérozygote avec 44 (Camnasio et al., 2012).

Les communautés iPSC et MH s'efforcent de développer et de caractériser ces lignées iPSC. Cet effort de collaboration a permis la découverte de nombreuses différences entre les lignées iPSC MH et les iPSC corrigées, et, surtout, la mise en évidence de phénotypes anormaux dans plusieurs lignées iPSC MH. Les analyses des profils de transcription et génétiques impliquées dans la signalisation, le développement neuronal et le guidage axonal confirme les changements anormaux précédemment décrits dans les tissus MH par rapport au contrôle. Cependant de nouvelles modifications qui apparaissent polyQ-dépendantes et intéressantes ont pu être également observées. En effet, une diminution des niveaux d'ATP/ADP ont été détectés dans les cellules souches neurales dérivées des iPSC-MH, révélant que les changements dans le métabolisme énergétique peuvent être une composante précoce de la MH. La différenciation des cellules souches neurales en neurones montre des altérations dans la production de potentiels d'action spontanées et évoquées ; et une altération de l'homéostasie calcique. Dans les cultures différenciées en neurones DARPP-32<sup>+</sup>, les lignées MH présentent des propriétés cellulaires propres aux cellules avec une répétition de polyQ incluant une mort cellulaire accrue et une susceptibilité aux facteurs de stress tels que le glutamate et ou la privation en facteurs trophiques (TheHD-Consortium,

2012). Ces résultats révèlent que les iPSC-MH présentent de nombreuses propriétés biologiques du cerveau humain HD.

Comme nous l'avons vu, d'autres types de cellules sont affectées par l'expression de la mHTT, tels que les astrocytes (Bradford et al., 2010). Les iPSC issues d'une forme juvénile (109 CAG) et des formes adultes (50 CAG) différenciées en astrocytes affichent une vacuolisation cytoplasmique importante qui augmente au fil du temps (Juopperi et al., 2012). La différenciation des iPSC-MH peut révéler de nouvelles perspectives sur les effets spécifiques de la mHTT sur les cellules et permettent l'étude de la pathogénicité sur un modèle humain, polyQ dépendant de la MH.

### **3.2. Différenciation des iPSC en cellules d'intérêt : les cellules souches neurales**

De nombreux protocoles ont été développés et adaptés successivement aux cellules souches embryonnaires murines et humaines puis aux iPSC murines et humaines respectivement pour permettre la différenciation en différents sous types.

Plusieurs protocoles ont été décrits pour générer des cellules souches neurales (NSC – neural stem cells) puis pour différencier ces précurseurs en neurones directement à partir d'iPSC. Le premier protocole décrit propose l'utilisation des facteurs de croissance bFGF et EGF pour induire la différenciation des iPSC en précurseurs neuronaux (Ebert et al., 2009) comme pour des cultures de neurosphères de rongeurs. Cette méthode génère des sphères en suspension qui, après dissociation et adhésion pendant plusieurs semaines, contiennent des cellules capables de se différencier en neurones et astrocytes. Cependant les sphères ne peuvent pas être gardées sur le long terme et les sphères semblent perdre de leur potentiel de différenciation avec les passages.

Pour assurer une différenciation spécifique vers la voie du neuroectoderme et empêcher la différenciation vers les autres feuilletts embryonnaires (endoderme et mésoderme), différentes molécules spécifiques, qui sont capables d'activer ou d'inhiber certaines voies, sont utilisées afin de guider la différenciation de manière spécifique. Chambers et collègues ont utilisé le SB431542 et la protéine Noggin, deux inhibiteurs de la voie du TGF $\beta$  sur des NSC dérivées d'iPSC. Ils ont ainsi pu obtenir une population de NSC beaucoup plus homogène avec plus de 80% de NSC contre 26% lorsque des cellules stromales étaient utilisées comme support nourricier pour induire la différenciation en neurones (Perrier et al., 2004). La différenciation était également plus rapide avec ce protocole. Kim et collègues ont aussi développé un protocole assurant la différenciation des iPSC en NSC en combinant la dorsomorphine et le SB431542. (Kim et al., 2010). La mise au

point de protocole impliquant une étape supplémentaire par la formation de structures neurales appelées rosettes, a permis l'obtention de population de NSC très pures (Hu and Zhang, 2009; Brennand et al., 2011). Ces structures sont composées de NSC exprimant spécifiquement le marqueur Nestine et le facteur de transcription PAX6. A partir de ces cultures de rosettes purifiées, des neurones dopaminergiques (Brennand et al., 2011), ou des motoneurons (Hu and Zhang, 2009) ont pu être obtenus.

### **3.3. Utilisation des iPSC : Elucider les mécanismes de la MH développementaux**

La technologie iPSC permet aux cellules obtenues directement à partir de patients atteints de la MH, de se propager indéfiniment et de se différencier en tous les sous-types de neurones sensibles offrant la promesse de découverte à effets uniques, spécifiques à l'homme—dû à la présence de la mHTT qui ne peuvent pas être révélés par des modèles rongeurs. Un modèle humain peut éventuellement révéler comment la mHTT affecte les changements moléculaires qui conduisent aux altérations comportementales, cognitives et motrices caractéristiques des patients atteints de la MH (Kaye and Finkbeiner, 2013). Les iPSC-MH peuvent également servir de base pour l'amélioration de criblage à haut débit médicamenteux, d'études bio-informatiques, et les analyses d'expression génique globale. Elles ont été proposées comme outils de diagnostic pour la stratification des patients dans les essais cliniques et les approches pour la médecine personnalisée. Par exemple, un traitement potentiel pourrait être testé d'abord sur les iPSC d'un patient afin de déterminer si ces cellules répondent au composé et si le patient peut donc être inclus dans l'essai clinique.

Le prochain défi sera d'employer les iPSC pour le dépistage de médicaments qui permettent d'atténuer la pathologie induite par la mHTT. Les iPSC ont permis de déterminer que l'exposition à l'IGF-1 et à la gentamicine restaure le nombre de synapses glutamatergiques dans les iPSC dérivées des patients atteints du syndrome de Rett (Marchetto et al., 2010) et qu'à haute dose, le BDNF peut augmenter les taux de survie cellulaire dans les iPSC-MH (TheHD-Consortium, 2012). Il a aussi été démontré que l'altération du métabolisme des ARN observée dans les iPSC dérivées de patient atteint de SLA, peut être atténuée par l'exposition à un inhibiteur de l'activité transcriptionnelle - l'acide anacardique- dans les neurones moteurs différenciés provenant des patients atteints de SLA (Egawa et al., 2012).

Les iPSC paraissent bien adaptées pour identifier les phénotypes réversibles qui apparaissent tôt dans l'évolution d'une maladie et à un moment où une intervention pharmacologique pourrait être efficace, bien avant que les conséquences dévastatrices prennent place au stade avancé. Comprendre le fonctionnement des phases précoces de la

MH notamment, représente un potentiel thérapeutique immense pour éviter les conséquences catastrophiques que l'on a décrit et qui sont induites par la présence de la mHTT.

Les cellules souches pluripotentes induites nous offrent l'opportunité de cultiver en laboratoire un grand nombre de cellules qui peuvent être patients-spécifiques et se différencier en une multitude de sous types cellulaires permettant l'étude de maladies sur d'autres modèles que les modèles rongeurs. Nous travaillons sur un modèle de cellules souches neurales dérivées de cellules souches pluripotentes induites issues de patients Huntington combinant stade précoce de la maladie de Huntington, fond génétique humain et les caractéristiques neuronales suffisantes pour étudier des mécanismes précoces qui perturbent la survie neuronale, plus tard dans la vie de l'adulte.

Nous avons utilisé ce modèle expérimental afin de caractériser des gènes cibles de FOXO3 pendant la phase de développement précoces ; et d'étudier l'impact de la huntingtine luttée sur les cibles de FOXO3. Cela nous a permis de mettre en évidence une reprogrammation des cibles de FOXO3 dans les cellules souches.

## **PARTIE II : Etude de la voie Wnt/Ryk dans les phases précoces de la MH**

# Introduction

Au travers de cette introduction générale, nous avons pu constater qu'un ensemble de mécanismes de réponse au stress cellulaire est important pour maintenir les fonctions cellulaires dans différents contextes, qu'ils soient normaux ou pathologiques (Kikis et al., 2010). Parmi ces mécanismes, la famille des facteurs de transcription FOXO apparaît être centrale dans les processus de longévité et d'homéostasie cellulaire (Essers et al., 2005b; Greer and Brunet, 2005). Dans une étude ultérieure, il a été montré que les facteurs FOXO sont importants pour la survie neuronale dans les maladies neurodégénératives telle que la maladie de Huntington (Neri, 2012; Parmentier et al., 2013). FOXO peut en effet favoriser la survie des neurones dans des modèles simples de la MH (Parker et al., 2005) et maintenir l'intégrité du protéome cellulaire dans des modèles simples de la MA (Cohen et al., 2006). La  $\beta$ -caténine, un des éléments de la voie Wnt canonique, peut se lier à FOXO suite à l'activation de la voie IIS ou suite à un stress oxydatif, ce qui augmente l'activité transcriptionnelle de FOXO3 (Essers et al., 2005b) ; et a un rôle neuroprotecteur dans les modèles des phases précoces du processus pathogénique de la MH (Parker et al., 2012a). Cela suggère que la voie de signalisation Wnt canonique participe à la régulation de l'activité transcriptionnelle de FOXO3 et ainsi agit sur la transcription des gènes impliqués dans la survie neuronale, ce qui renforce l'idée que les facteurs de différenciation neuronale, tel que Wnt, peuvent promouvoir la survie dans les neurones adultes (Inestrosa and Arenas, 2009).

Nous avons vu que les ligands Wnt sont une famille de glycoprotéines sécrétées dans le milieu extracellulaire au cours du développement (Logan and Nusse, 2004). Dans le système nerveux en développement, la signalisation Wnt participe à la croissance axonale et dendritique, à la polarisation neuronale et à la synaptogenèse (Bovolenta et al., 2006). De plus, la voie de signalisation Wnt a fait l'objet de nombreuses revues, notamment pour la caractérisation de trois voies qui sont la voie canonique  $\beta$ -caténine-dépendante, la voie non-canonique impliquée dans la polarité planaire cellulaire (PCP) et la voie non-canonique qui mobilise la signalisation calcique (Wnt/ $Ca^{2+}$ ) (Gordon and Nusse, 2006). La voie canonique Wnt est de loin la plus documentée. Elle passe par la liaison des ligands Wnt aux récepteurs Frizzled, et permet la stabilisation cytoplasmique de la  $\beta$ -caténine, ce qui favorise sa translocation dans le noyau où elle agit comme co-activateur pour les facteurs de transcription TCF/LEF. Ils vont alors activer la transcription de gènes cibles impliqués dans la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire.

A côté du rôle développemental de la signalisation Wnt, il semble que cette signalisation ait un rôle important dans les neurones adultes, et il apparaît qu'elle serait dérégulée dans les maladies neurodégénératives. De plus, Il semblerait que les effecteurs

de la signalisation Wnt soient diminués dans la MH et la MA (Gines et al., 2003a), ce qui soulève la possibilité que la voie Wnt ait un rôle dans la régulation de la neurodégénérescence.

Ici, nous avons supposé qu'une altération de la voie Wnt pourrait perturber le facteur de transcription FOXO3 et ainsi compromettre la réponse au stress cellulaire et la résistance neuronale dans la MH. Notre hypothèse est, que très tôt dans la maladie, avant la mort neuronale et avant la manifestation de la pathologie, les neurones ne seraient pas capables de résister de manière efficace au stress cellulaire lié à la toxicité médiée par la présence de la mHTT. Cette déficience précoce de la résistance neuronale due à la fragilité de la réponse au stress cellulaire dans les neurones serait induite par la sur-activation anormale de facteurs neurodéveloppementaux, avec pour effet la répression des capacités de défense cellulaire qui sont sous le contrôle des facteurs de transcription FOXO.

Pour tester cette hypothèse, nous avons utilisé un modèle *C. elegans* de dysfonction neuronale induit par la partie en N-terminale de la mHTT (128Q) qui récapitule les phases précoces de la maladie (Parker et al., 2001a). Au stade jeune adulte, ces animaux montrent une perte dramatique de la réponse au toucher induite par la présence de la mHTT dans les neurones mécano-sensoriels. Pour évaluer les mécanismes qui sous-tendent le dysfonctionnement de ces neurones sensoriels, nous avons effectué une analyse microarray sur des cellules neurales embryonnaires purifiées par FACS dans notre modèle *C. elegans* et plus largement, étudié l'intégration de ces données avec d'autres issues d'étude RNAi chez les nématodes 128Q (Lejeune et al., 2012), ou des données transcriptomiques chez la souris et chez l'Homme. Ces données suggèrent que le dysfonctionnement des voies développementales comme la voie Wnt est particulièrement important dans la MH. Cette analyse nous a permis de mettre en évidence une dérégulation de gènes de différenciation neuronale, notamment une augmentation des niveaux d'expression du récepteur Ryk chez les nématodes 128Q et dans le cerveau de patients atteints de la MH.

Ryk est un co-récepteur de la voie Wnt conservé de *C. elegans* à l'Homme (*lin-18* chez *C. elegans*) et est important pour la neurogenèse et le guidage axonal (Keeble et al., 2006; Lyu et al., 2008b). Il est impliqué dans la régulation des processus développementaux et post-développementaux tels que la polarité cellulaire planaire (Andre et al., 2012; Macheda et al., 2012), la régénération (Hollis and Zou, 2012), et le repeuplement hématopoïétique (Povinelli and Nemeth, 2014).

En approfondissant la suite de notre étude, nous avons montré que la perte de fonction de *lin-18/Ryk* chez les nématodes et la réduction des niveaux de Ryk dans les cellules striatales « *Knock-in* » pour la HTT (cellules STHdhQ111/Q111) sont protecteurs contre la

toxicité de la mHTT. La neuroprotection induite par la perte de fonction *lin-18* chez les nématodes 128Q, un processus cellulaire autonome, est dépendante du facteur neuroprotecteur *daf-16/FOXO* (Parker et al., 2005), ce qui suggère que *lin-18/RYK* réprime l'activité neuroprotectrice de *daf-16/FOXO3* chez ces animaux.

Le domaine intracellulaire de Ryk (Ryk-ICD), un produit issu du clivage par des gamma-sécrétases, est transloqué dans le noyau et permet la régulation de la neurogenèse (Lyu et al., 2008b; Zhong et al., 2011). Dans notre étude, nous avons également montré par co-immunoprécipitation que le fragment intracellulaire Ryk peut se lier au partenaire de FOXO3, la  $\beta$ -caténine. Ceci suggère que le fragment Ryk-ICD peut induire la répression de l'activité transcriptionnelle de FOXO3 suite à sa surexpression dans les neurones polyQ mutants. Pour étayer ce mécanisme, nous avons montré que la surexpression du fragment Ryk-ICD est suffisante pour réprimer l'activité transcriptionnelle de FOXO3. Chez *C.elegans* la perte de fonction du fragment *lin-18-ICD* à des effets neuroprotecteurs dans les neurones 128Q ; et l'expression du fragment *lin18-ICD* est suffisante pour supprimer cet effet neuroprotecteur.

Ce mécanisme est en outre appuyé par de nombreux résultats dans les cellules striatales STHdhQ111/Q111 qui montrent d'une part, que la surexpression Ryk-ICD abolie l'activité protectrice de la  $\beta$ -caténine, ce qui est cohérent avec l'idée qu'en excès le fragment Ryk-ICD peut se lier à la  $\beta$ -caténine et bloquer sa fonction de co-facteur. D'autre part la réduction des niveaux de Préséniline (PS1), un des éléments du complexe gamma-sécrétase compense la cytotoxicité induite par la forme Ryk pleine longueur mais pas celle induite par le fragment Ryk-ICD, ce qui suggère un rôle toxique du complexe gamma-sécrétase. Les niveaux nucléaires endogènes du fragment Ryk-ICD sont augmentés par rapport aux cellules normales, ce qui corrobore le rôle de la voie Ryk-ICD dans le déclenchement anormal d'une signalisation Ryk-dépendante dans les cellules mHTT. Enfin, il a été suggéré un rôle pathologique de Ryk dans la MH comme le souligne son augmentation chez les nématodes 128Q durant les stades précoces (avant ou lors de l'apparition de la pathologie) (Hickey et al., 2008) .

Collectivement, ces travaux fournissent un modèle présentant un rôle de la cytotoxicité de Ryk et de son fragment intracellulaire dans la MH. Ces résultats suggèrent que Ryk et son fragment ICD peuvent réduire la capacité des neurones polyQ mutants à fournir une réponse au stress cellulaire adéquat en réprimant l'activité protectrice du complexe  $\beta$ -caténine/FOXO3.

# Article 1 :

## The Wnt Receptor Ryk Reduces Neuronal and Cell Survival Capacity by Repressing FOXO Activity During the Early Phases of Mutant Huntingtin Pathogenicity.

Cendrine Tourette<sup>1,2,3,4</sup>, Francesca Farina<sup>1,2,3</sup>, Rafael P. Vazquez-Manrique<sup>1,2,3</sup>, Anne-Marie Orfila<sup>1,2,3</sup>, **Jessica Voisin**<sup>1,2,3</sup>, Sonia Hernandez<sup>1,2,3</sup>, Nicolas Offner<sup>1,2,3</sup>, J. Alex Parker<sup>1,2,3</sup>, Sophie Menet<sup>1,2,3</sup>, Jinho Kim<sup>5</sup>, Jungmok Lyu<sup>6</sup>, Si Ho Choi<sup>6</sup>, Kerry Cormier<sup>7</sup>, Christina K. Edgerly<sup>5</sup>, Olivia L. Bordiuk<sup>5</sup>, Karen Smith<sup>8</sup>, Anne Louise<sup>9</sup>, Michael Halford<sup>10</sup>, Steven Stacker<sup>10</sup>, Jean-Philippe Vert<sup>11,12,13</sup>, Robert J. Ferrante<sup>5</sup>, Wange Lu<sup>6</sup>, Christian Neri<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> CNRS, UMR 8256, Laboratory of Neuronal Cell Biology and Pathology, Paris, France, <sup>2</sup> Sorbonnes Universite's, University Pierre and Marie Curie (UPMC) Univ Paris 06, Paris, France, <sup>3</sup> INSERM, Unit 894, Paris, France, <sup>4</sup> Assistance Publique-Hopitaux de Paris (AP-HP), Charles Foix Hospital, Functional Exploration Unit, Ivry-sur-Seine, France, <sup>5</sup> Neurological Surgery Department, University of Pittsburgh, Pittsburgh, Pennsylvania, United States of America, <sup>6</sup> University of Southern California Keck School of Medicine, Eli and Edythe Broad Center for Regenerative Medicine and Stem Cell Research, Los Angeles, California, United States of America, <sup>7</sup> Department of Neurology, Boston University School of Medicine, Boston, Massachusetts, United States of America, <sup>8</sup> VA Bedford Geriatric Research Education and Clinical Center, Edith Nourse Rogers Memorial Veterans Hospital, Bedford, Massachusetts, United States of America, <sup>9</sup> Pasteur Institute, Cytometry Platform, Paris, France, <sup>10</sup> Peter MacCallum Cancer Center, East Melbourne, Victoria, Australia, <sup>11</sup> Mines ParisTech, Center for Computational Biology, Fontainebleau, France, <sup>12</sup> Curie Institute, Research Center, Paris, France, <sup>13</sup> INSERM, Unit 900, Paris, Franc



# The Wnt Receptor Ryk Reduces Neuronal and Cell Survival Capacity by Repressing FOXO Activity During the Early Phases of Mutant Huntingtin Pathogenicity

Cendrine Tourette<sup>1,2,3,4</sup>, Francesca Farina<sup>1,2,3</sup>, Rafael P. Vazquez-Manrique<sup>1,2,3,5a</sup>, Anne-Marie Orfila<sup>1,2,3</sup>, Jessica Voisin<sup>1,2,3</sup>, Sonia Hernandez<sup>1,2,3</sup>, Nicolas Offner<sup>1,2,3</sup>, J. Alex Parker<sup>1,2,3,5b</sup>, Sophie Menet<sup>1,2,3</sup>, Jinho Kim<sup>5</sup>, Jungmok Lyu<sup>6</sup>, Si Ho Choi<sup>6</sup>, Kerry Cormier<sup>7</sup>, Christina K. Edgerly<sup>5</sup>, Olivia L. Bordiuk<sup>5</sup>, Karen Smith<sup>8</sup>, Anne Louise<sup>9</sup>, Michael Halford<sup>10</sup>, Steven Stackler<sup>10</sup>, Jean-Philippe Vert<sup>11,12,13</sup>, Robert J. Ferrante<sup>5</sup>, Wange Lu<sup>6</sup>, Christian Neri<sup>1,2,3\*</sup>

**1** CNRS, UMR 8256, Laboratory of Neuronal Cell Biology and Pathology, Paris, France, **2** Sorbonnes Universités, University Pierre and Marie Curie (UPMC) Univ Paris 06, Paris, France, **3** INSERM, Unit 894, Paris, France, **4** Assistance Publique-Hopitaux de Paris (AP-HP), Charles Foix Hospital, Functional Exploration Unit, Ivry-sur-Seine, France, **5** Neurological Surgery Department, University of Pittsburgh, Pittsburgh, Pennsylvania, United States of America, **6** University of Southern California Keck School of Medicine, Eli and Edythe Broad Center for Regenerative Medicine and Stem Cell Research, Los Angeles, California, United States of America, **7** Department of Neurology, Boston University School of Medicine, Boston, Massachusetts, United States of America, **8** VA Bedford Geriatric Research Education and Clinical Center, Edith Nourse Rogers Memorial Veterans Hospital, Bedford, Massachusetts, United States of America, **9** Pasteur Institute, Cytometry Platform, Paris, France, **10** Peter MacCallum Cancer Center, East Melbourne, Victoria, Australia, **11** Mines ParisTech, Center for Computational Biology, Fontainebleau, France, **12** Curie Institute, Research Center, Paris, France, **13** INSERM, Unit 900, Paris, France

## Abstract

The Wnt receptor Ryk is an evolutionary-conserved protein important during neuronal differentiation through several mechanisms, including  $\gamma$ -secretase cleavage and nuclear translocation of its intracellular domain (Ryk-ICD). Although the Wnt pathway may be neuroprotective, the role of Ryk in neurodegenerative disease remains unknown. We found that Ryk is up-regulated in neurons expressing mutant huntingtin (HTT) in several models of Huntington's disease (HD). Further investigation in *Caenorhabditis elegans* and mouse striatal cell models of HD provided a model in which the early-stage increase of Ryk promotes neuronal dysfunction by repressing the neuroprotective activity of the longevity-promoting factor FOXO through a noncanonical mechanism that implicates the Ryk-ICD fragment and its binding to the FOXO co-factor  $\beta$ -catenin. The Ryk-ICD fragment suppressed neuroprotection by *lin-18*/Ryk loss-of-function in expanded-polyQ nematodes, repressed FOXO transcriptional activity, and abolished  $\beta$ -catenin protection of mutant htt striatal cells against cell death vulnerability. Additionally, Ryk-ICD was increased in the nucleus of mutant htt cells, and reducing  $\gamma$ -secretase PS1 levels compensated for the cytotoxicity of full-length Ryk in these cells. These findings reveal that the Ryk-ICD pathway may impair FOXO protective activity in mutant polyglutamine neurons, suggesting that neurons are unable to efficiently maintain function and resist disease from the earliest phases of the pathogenic process in HD.

**Citation:** Tourette C, Farina F, Vazquez-Manrique RP, Orfila A-M, Voisin J, et al. (2014) The Wnt Receptor Ryk Reduces Neuronal and Cell Survival Capacity by Repressing FOXO Activity During the Early Phases of Mutant Huntingtin Pathogenicity. *PLoS Biol* 12(6): e1001895. doi:10.1371/journal.pbio.1001895

**Academic Editor:** Hugo J. Bellen, Baylor College of Medicine, United States of America

**Received:** October 21, 2013; **Accepted:** May 15, 2014; **Published:** June 24, 2014

**Copyright:** © 2014 Tourette et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was supported by Inserm and Associated International Laboratory 'Neuronal longevity' (<http://www.inserm.fr/>), AP-HP (<http://www.aphp.fr/>), "Equipe FRM Ile-de-France" program of the Fondation pour la Recherche Médicale (<http://www.frm.org/>) Grant DEQ20061107955, the Agence Nationale de la Recherche (<http://www.agence-nationale-recherche.fr/>) Grants ANR-08-MNPS-024-01 and ANR-12-BSV4-0023-01 and the Association Française contre les Myopathies (<http://www.afm-teleton.fr/>), Paris, France, and the Hereditary Disease Foundation (<http://www.hdfoundation.org/home.php>) and CHDI Foundation (<http://chdifoundation.org/>), USA. C.T. is supported by AP-HP under the University Hospital Department 'Fight Aging and Stress' program. J.A.P. was supported by a Young Researcher Award from Inserm. R.V. was supported by a Poste Vert fellowship from Inserm. J.V. is supported by the Association Huntington France. J.K. is supported by the Bumpus Foundation. This work was also supported by National Institutes of Health (<http://www.nih.gov/>) Grants NS045242, NS045806, NS058793, and NS066912, and by the Veterans Administration (<http://www.va.gov/>) (R.J.F.). The Cell Imaging and Flow Cytometry facility of the IFR 83 (Paris, France) is supported by the Conseil régional Ile-de-France. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist. Dr. Robert Ferrante is listed as an author of our paper, but at the time of acceptance was not reachable or able to confirm details of his author contributions to the manuscript. The corresponding author, Christian Neri, has therefore supplied the information regarding his contribution to the manuscript and his competing interests and it is correct to the best of Christian Neri's knowledge.

\* Email: christian.neri@inserm.fr

<sup>5a</sup> Current address: Sensorineural Disorders, Health Research Institute-La Fe, Valencia, Spain.

<sup>5b</sup> Current address: Department of Neuroscience, University of Montreal, Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montreal (CRCHUM), Montreal, Quebec, Canada.

**Abbreviations:** AD, Alzheimer's disease; APP, amyloid precursor protein; CTF, C-terminal fragment; DAPI, diamidino-2-phenylindole; ECL, enhanced chemiluminescence; FACS, Fluorescence Activated Cell Sorting; FHRE, Forkhead responsive element; GSEA, Gene Set Enrichment Analysis; HD, Huntington's disease; HTT, huntingtin; ICD, intracellular domain; LOF, loss-of-function; NOS, nitric oxide synthase; polyQ, polyglutamines.

### Author Summary

Neuronal cell decline in neurodegenerative disease can be caused by inherited mutations and involves neuronal dysfunction followed by neuronal death. The ability of neurons to cope with the chronic stress induced by mutant protein expression may determine the course of their decline and eventual demise. Although the pathophysiological importance of these stress responses has been previously shown, very little is known about the signaling networks that regulate neuronal homeostasis during the early presymptomatic—but pathogenic—phases of a neurodegenerative disorder such as Huntington's disease (HD). In particular, it remains unclear whether neuronal differentiation factors regulate stress response pathways during neurodegenerative disease and how this might impact the overall capacity of neurons to cope with stress and maintain their function. Here, we show that the Wnt receptor Ryk, a protein known to be important for neurogenesis, is increased in different animal models of HD, before or during the early phases of the disease process. Interestingly, increased levels of Ryk repress activity of the FOXO proteins—a family of transcription factors that play a role in cell survival/longevity and in neuronal homeostasis and protection. Ryk represses FOXO protective activity, possibly directly, through its intracellular domain, a product of  $\gamma$ -secretase-mediated cleavage previously implicated in the birth of new cortical neurons. This highlights the regulation of HD neuron survival by a Ryk-dependent pathway that is distinct from canonical Wnt/Ryk signaling. From our findings, we postulate that neurons are unable to develop an efficient FOXO-mediated survival response during the very early, pathogenic phases of HD.

### Introduction

Cell stress response factors are important for cells to maintain function in a large variety of normal and pathological contexts, including diseases linked to proteotoxicity [1]. Among these factors, the FOXO family of Forkhead transcription factors is central to longevity and cellular homeostasis [2,3]. Additionally, FOXO factors may be important to the regulation of neuron survival in neurodegenerative diseases such as Huntington's disease (HD) [4,5], a dominantly inherited CAG repeat disorder caused by expanded polyglutamines (polyQ) in the N-terminal portion of huntingtin (HTT) and characterized by striatal and cortical degeneration [6]. FOXO may indeed promote neuron survival in simple models of HD [7] and cellular proteostasis in simple models of Alzheimer's disease (AD) [8]. Interestingly, the canonical Wnt pathway component  $\beta$ -catenin may functionally interact with FOXO in oxidative stress signaling [9] and has a neuroprotective role in models of the early phases of the pathogenic process in HD [10]. This suggests that the canonical Wnt pathway may interact with the FOXO pathway to promote diseased-neuron function and survival, which is in line with the notion that neuronal differentiation factors such as Wnts may promote adult neuron survival [11]. However, Wnt signaling effectors may be impaired in HD and AD [12–14], raising the possibility that Wnt pathways may have a dual role in the regulation of neurodegeneration. Here, we hypothesized that alteration of Wnt pathways might antagonize the FOXO pathway to compromise cell stress response and neuronal resistance during the earliest phases of the pathogenic process in neurodegenerative disease such as HD. To test for this hypothesis, we used

*Caenorhabditis elegans* transgenics that recapitulate an early phase of mutant HTT toxicity, namely neuronal dysfunction before cell death [15]. At the young adult stage, these animals show a dramatic loss of response to light touch produced by polyQ-expanded exon-1 like HTT fused to GFP in touch receptor neurons [15]. To assess the mechanisms that underlie the dysfunction of these neurons, we performed a microarray analysis of primary neurons upon Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) of embryonic cells. This analysis emphasized the deregulation of neuronal differentiation genes, notably genes that are up-regulated in expanded-polyQ nematodes and in the brain of HD patients such as Ryk. Ryk is an evolutionary-conserved Wnt receptor (*lin-18* in *C. elegans*) that is important to neurogenesis and axon guidance [16–18] and that is involved in the regulation of developmental/postdevelopmental processes such as planar cell polarity [19,20], regeneration [21], and hematopoietic repopulation [22]. Further investigation revealed that loss-of-function (LOF) of *lin-18*/Ryk in polyQ nematodes and reduction of Ryk levels in mouse striatal cells derived from HdhQ111 knock-in mice [23] strongly protected from expanded polyQ/mutant HTT. Neuroprotection by *lin-18* LOF in expanded-polyQ nematodes, a cell-autonomous process, required the neuroprotective factor *daf-16*/FOXO [7], suggesting that *lin-18* represses the neuroprotective activity of *daf-16* in these animals. The intracellular domain of Ryk (Ryk-ICD), a  $\gamma$ -secretase cleavage product that translocates in the nucleus to control neurogenesis [16,17], was found to bind to the FOXO partner  $\beta$ -catenin, suggesting that Ryk-ICD may trigger the repression of FOXO by increased levels of Ryk in mutant polyQ neurons. In support of this mechanism, Ryk-ICD overexpression was sufficient to repress the transcriptional activity of FOXO3a, a protein that promotes the survival of mutant htt striatal cells. Additionally, LIN-18 ICD expression was sufficient to suppress neuroprotection by *lin-18* LOF in expanded-polyQ nematodes. This mechanism was further supported by results in mutant htt cells showing that (i) Ryk-ICD overexpression abolished the protective activity of  $\beta$ -catenin, which is consistent with the possibility that an excess of Ryk-ICD may bind and block this survival protein; (ii) reducing presenilin PS1 levels (which is protective) compensated for the cytotoxicity of full-length Ryk but not that of Ryk-ICD, implicating this  $\gamma$ -secretase in the toxic effects of Ryk; and (iii) nuclear levels of endogenous Ryk-ICD were increased compared to normal htt cells, corroborating a role for the Ryk-ICD pathway in triggering abnormal Ryk signaling in mutant htt cells. Finally, Ryk was suggested to have a pathological role in HD as emphasized by the early stage (before or during the onset of pathology) increase of Ryk in expanded-polyQ nematodes [7] and the neostriatum of 140CAG knock-in mice [24]. Collectively, these results suggest that Ryk and its ICD fragment may reduce the ability of mutant polyQ neurons to handle cell stress and maintain function by repressing FOXO protective activity, which may occur during the earliest phases of the pathogenic process in HD.

### Results

#### Microarray Data Analysis Highlights Axon Guidance Pathways

To explore the pathways that underlie the early phases of expanded-polyQ neurotoxicity, we performed a microarray analysis of mRNAs extracted from *C. elegans* touch receptor cells. To this end, we used transgenic nematodes expressing polyQ-expanded (128Q) and normal (19Q) N-terminal HTT fused to GFP under the control of the *mec-3* promoter [15], and transgenic nematodes expressing only GFP under the control of the same

promoter as a control. In this model, expanded polyQ expression produces a strong level of neuronal dysfunction not found in normal polyQ animals, namely the loss of response to light touch [15]. GFP-positive cells were purified by cell sorting from primary cultures of embryonic cells prior to mRNA extraction and microarray analysis. Forty-one genes were deregulated in 19Q cells compared to cells expressing GFP only (Table S1). A total of 2,070 genes were deregulated in 128Q cells compared to 19Q cells (Table S2). Interestingly, only 18 of the 2,070 genes were also deregulated in 19Q nematode cells, suggesting that our microarray analysis has provided clean and specific information on the transcriptomic effects of expanded-polyQ expression. To analyze the biological content of these data, we used several methods including Gene Ontology analysis, Gene Set Enrichment Analysis (GSEA), and a powerful network-based method based on Fourier analysis (see Text S2). In contrast to the GO analysis (Figure S1), the GSEA and Fourier analyses highlighted several processes previously suspected to be altered in HD (see Text S1, Figure S2, Figure S3, and Tables S3–S5), suggesting that nematode data are relevant to HD pathogenesis. Additionally, cell differentiation pathways such as Wnt signaling were emphasized as components potentially involved in expanded-polyQ neuron dysfunction, a trend also emphasized by the network-based analysis of data resulting from a large-scale functional RNAi screen in our expanded-polyQ nematodes [25].

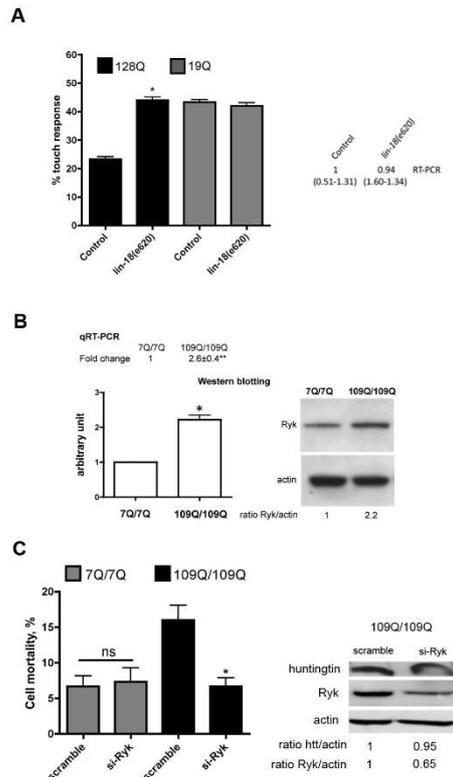
Among the up-regulated Fourier modules, module 40 (Wnt/TGF- $\beta$  signaling) was of particular interest (Figure S4). This module suggested that *lin-18/Ryk*, a Wnt receptor important during neurogenesis and axon guidance [26,27], is up-regulated in neurons expressing expanded polyQs, which was confirmed by qRT-PCR (Table S5). To enhance the prioritization of candidate genes, we focused on pathways and processes that were highlighted by GSEA and by the Fourier analysis and that contained evolutionary conserved druggable [28] genes (Table S6). Up-regulated module 40 was again pointed out, as it contained the largest number of genes in common with the GSEA and Fourier analyses (see Wnt, cell cycle, and TGF- $\beta$  in Table S4) as well as 3 of the 25 genes deregulated in 128Q nematode cells and in the caudate nucleus of HD patients [29], among which was *lin-18/Ryk*.

#### LOF of *lin-18/Ryk* Protects Nematode Neurons from Expanded PolyQs

In the up-regulated Fourier module 40 (Figure S4), the conserved *lin-18* gene was of interest in the Wnt pathway as a druggable gene that may be deregulated in the touch receptor cells of expanded-polyQ nematodes and caudate nucleus of HD patients. Although target gene activation is an option for developing disease-modifying strategies, target inhibition is usually regarded as a more easily achievable approach. Interestingly in this respect, neuronal dysfunction was abolished by *lin-18/Ryk* LOF in 128Q nematodes with no effect in 19Q nematodes and no change in transgene expression (Figure 1A). These results suggested that *lin-18* up-regulation is toxic to 128Q neurons and that Ryk inhibition may provide protection from mutant polyQ cytotoxicity.

#### Reducing Ryk Levels Decreases the Vulnerability of Mutant htt Striatal Cells

Having observed that neuronal dysfunction was suppressed by *lin-18/Ryk* LOF in 128Q nematodes, we tested if Ryk inhibition could decrease the cell death caused by full-length mutant HTT. To this end, we used striatal cells derived from the HdhQ111 knock-in mice [23]. Mutant htt (109Q/109Q) striatal cells are



**Figure 1. Analysis of Ryk in polyQ nematodes and striatal cells derived from HdhQ111 mice.** (A) Modulation of touch response of polyQ nematodes by LOF of *lin-18/Ryk*. Shown are the results in *C. elegans* transgenics expressing expanded (128Q) or normal (19Q) exon-1-like htt transgenes in touch receptor neurons. The 128Q-mediated loss of touch response is ameliorated by LOF of *lin-18/Ryk*. No effects are detected in 19Q nematodes. Data are mean  $\pm$  SEM with more than 200 animals tested per genotype. \* $p < 0.001$  versus 128Q controls. LOF of *lin-18/Ryk* does not modify 128Q transgene expression levels as tested by qRT-PCR (right panel, data are mean  $\pm$  SEM with  $n = 5$ ). Significance was tested using one-way ANOVA, with correction for multiple testing by Tukey's Multiple Comparison Test. (B) Mutant htt (109Q/109Q) striatal cells have increased Ryk levels. Data for qRT-PCR are mean  $\pm$  SEM ( $n = 7$ ). \*\* $p < 0.01$  versus normal htt (7Q/7Q) cells. Data for Western blotting are mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). \*\* $p < 0.01$  versus normal htt (7Q/7Q) cells. Significance was tested using paired  $t$  tests. (C) Reducing Ryk levels decreased the mortality of 109Q/109Q striatal cells induced by serum deprivation compared to scramble situation, with no effect detected in 7Q/7Q cells. Western blotting was used to test expression levels as 109Q/109Q cells do not display HTT aggregation. Mutant htt levels were unchanged by knockdown of Ryk. Data are mean  $\pm$  SD ( $n = 4$ ). \* $p < 0.01$  versus scramble. The RNA sequences shown are indicated in the Materials and Methods section. Significance was tested using paired  $t$  tests.  
doi:10.1371/journal.pbio.1001895.g001

abnormally susceptible to cell death as induced by serum deprivation [23], a phenotype suitable for identifying modifiers of cell vulnerability [30]. As indicated by qRT-PCR and Western

blotting, Ryk mRNA and protein levels are two times higher in 109/109Q cells compared to normal (7Q/7Q) cells (Figure 1B). To test whether reducing Ryk levels may promote mutant htt striatal cell survival, we subjected 109Q/109Q and 7Q/7Q cells to Ryk siRNA treatment. Ryk siRNA treatment enhanced the survival of 109Q/109Q cells with no effect on 7Q/7Q cells, an effect unrelated to a change in HTT expression (Figure 1C). This was consistent with neuroprotection by *lin-18*/Ryk LOF in 128Q nematodes, further suggesting that Ryk has a pathological role in HD neurons.

#### Neuroprotection by *lin-18*/Ryk LOF Requires *daf-16*/FoxO Activity

We next sought to examine the mechanisms underlying neuroprotection by Ryk inhibition. We first tested whether neuroprotection by *lin-18*/Ryk LOF in expanded-polyQ nematodes (see Figure 1A) occurred in a cell-autonomous manner. The expression of *lin-18* cDNA in touch receptor neurons (4 ng/ $\mu$ l) using the *mec-3* promoter abolished neuroprotection by *lin-18* LOF in 128Q nematodes with no effect detected in 19Q nematodes as observed in two independent arrays per polyQ genotype (Figure 2A), indicating that neuroprotection by *lin-18* LOF is cell autonomous. Ryk participates in canonical Wnt signaling [26] and there is a functional interaction between  $\beta$ -catenin, a downstream effector of canonical Wnt, and FOXO in oxidative stress signaling [9]. We thus tested whether *lin-18* required *bar-1*/ $\beta$ -catenin and *daf-16*/FoxO activity to modulate neuronal dysfunction in 128Q nematodes. In 19Q nematodes, LOF of *lin-18* (see Figure 1A), *daf-16* (see [1]), and *bar-1* (see [10]) had no effect on touch response. In 128Q nematodes, *bar-1* LOF exacerbated the loss of touch response (Figure 2B), with no change in transgenic protein expression (Figure 2C), suggesting that *bar-1* normally protects touch neurons from 128Q. The same applied to *daf-16* LOF (Figure 2B/C), as previously observed [7]. In 128Q;*lin-18(e620)* animals, neuroprotection by *lin-18* LOF was reduced by LOF of *bar-1* (Figure 2B) with no change in transgenic protein expression (Figure 2C), suggesting that *lin-18* activity requires *bar-1*. However, the effect of *bar-1* LOF in 128Q;*lin-18(e620)* nematodes was

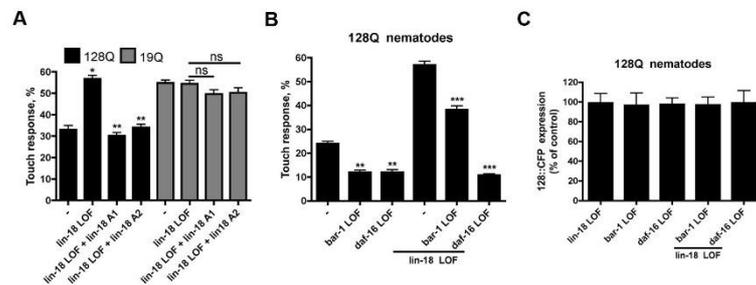
partial, suggesting a role for other genes. In contrast, neuroprotection by *lin-18* LOF was suppressed by *daf-16* LOF (Figure 2B), an effect unrelated to a change in transgenic protein expression (Figure 2C), indicating that neuroprotection by *lin-18* LOF fully requires *daf-16*. Given that *daf-16* is normally neuroprotective (Figure 2B), this indicated that *lin-18* may repress *daf-16* activity in 128Q nematodes, which led us to investigate the mechanisms by which Ryk may repress FOXO activity.

#### The Ryk ICD Binds to $\beta$ -Catenin

Ryk signals through multiple mechanisms such as the canonical Wnt pathway and the nuclear translocation of its cleaved ICD to regulate neuronal differentiation [16]. This suggests that one mechanism for Ryk to repress FOXO in mutant polyQ neurons might be the deregulation of canonical Wnt, a neuroprotective pathway [11]. However, LOF of *pop-1*/TCF does not appear to modulate 128Q neurotoxicity in *C. elegans* nematodes (unpublished data), suggesting that the outcome of the canonical Wnt pathway is not critical to mutant polyQ neuron survival. We thus hypothesized that another mechanism for Ryk to repress FOXO in mutant polyQ neurons could involve a noncanonical mechanism, namely the binding of the Ryk-ICD to FOXO or its partner  $\beta$ -catenin.

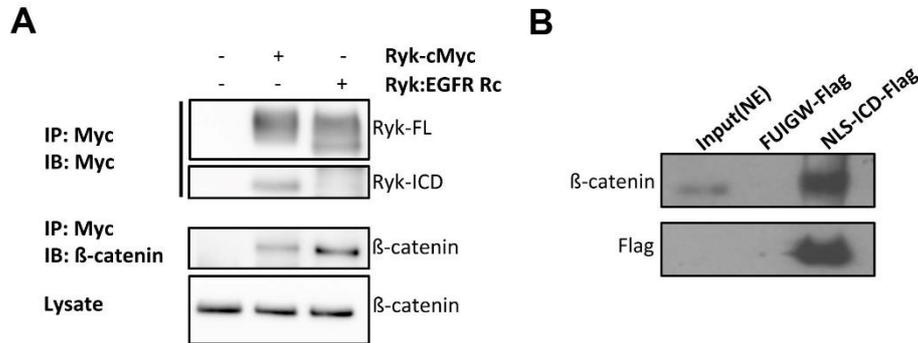
It was previously shown that  $\beta$ -catenin associates with Ryk [31]. Consistent with these findings, we also observed that  $\beta$ -catenin binds to Ryk by using constructs that code for Ryk with a Myc tag at the C-terminal end or an uncleavable Ryk mutant (Ryk:EGFRrc, a chimeric construct in which the transmembrane region was replaced with that of the EGF receptor) [16]. These constructs were transfected into 293T cells (derived from human kidney cells) and cell lysates subjected to immunoprecipitation using an anti-Myc antibody followed by immunoblotting. In the cells expressing Ryk or uncleavable Ryk, immunoprecipitation of Myc-tagged Ryk pulled down endogenous  $\beta$ -catenin (Figure 3A), as expected.

To examine if Ryk-ICD binds to  $\beta$ -catenin, Flag-tagged Ryk-ICD constructs were transfected into 293T cells.  $\beta$ -catenin was detected in the anti-Flag immunoprecipitate, suggesting that Ryk-ICD is sufficient to associate with  $\beta$ -catenin (Figure 3B). Similar



**Figure 2. Neuroprotection by *lin-18*/Ryk LOF is a cell-autonomous process that requires *daf-16*/FoxO activity.** (A) Expression of *lin-18* cDNA in touch receptor neurons using the *mec-3* promoter abolishes the neuroprotective activity of *lin-18* LOF in 128Q nematodes with no effect detected in 19Q nematodes as tested in two independent extrachromosomal arrays (A1, A2) per polyQ genotype. The expression of *lin-18* cDNA was confirmed by RT-PCR followed with enzymatic restriction for all of the arrays generated (unpublished data). Data are mean  $\pm$  SEM (more than 200 animals tested). \* $p$ <0.001 compared to 128Q transgenics; \*\* $p$ <0.001 compared to 128Q;*lin-18* nematodes. (B) Neuron dysfunction is aggravated by *bar-1*/ $\beta$ -catenin or *daf-16*/FoxO LOF in 128Q nematodes, and protection from 128Q toxicity by *lin-18* LOF is reduced by LOF of *bar-1* and suppressed by LOF of *daf-16*. Data are mean  $\pm$  SEM (more than 200 animals tested). \*\* $p$ <0.001 compared to 128Q transgenics; \*\*\* $p$ <0.001 compared to 128Q;*lin-18* nematodes. (C) *lin-18*, *bar-1* and *daf-16* LOF alone or in combination do not change transgenic protein expression levels in 128Q nematodes. Data are mean  $\pm$  SD ( $n$ =3). Significance was tested using one-way ANOVA, with correction for multiple testing by Tukey's Multiple Comparison Test.

doi:10.1371/journal.pbio.1001895.g002



**Figure 3. Ryk ICD binds to  $\beta$ -catenin.** (A)  $\beta$ -catenin binds to Ryk. Constructs of Myc-tagged Ryk or uncleavable Ryk (Ryk:EGFR Rc) were transfected into 293T cells. Ryk proteins were immunoprecipitated with anti-Myc antibody, and beta-catenin associated with Ryk was determined by immunoblotting. Ryk ICD can be detected in the cells expressing wild-type Ryk. (B) The ICD of Ryk binds to  $\beta$ -catenin. Cells expressing Flag-tagged Ryk-ICD were used for anti-Flag immunoprecipitation. The ICD and associated  $\beta$ -catenin were determined by Western blot. NE, nuclear extract; FUIGW-FLAG, vector FUIGW plus a Flag sequence.  
doi:10.1371/journal.pbio.1001895.g003

experiments aimed at testing for binding of Ryk-ICD to FOXO3a, a neuroprotective FOXO protein [32], did not detect any interaction (unpublished data). Together, these results suggested that Ryk might signal onto FOXO through binding of its ICD fragment to the FOXO co-factor  $\beta$ -catenin.

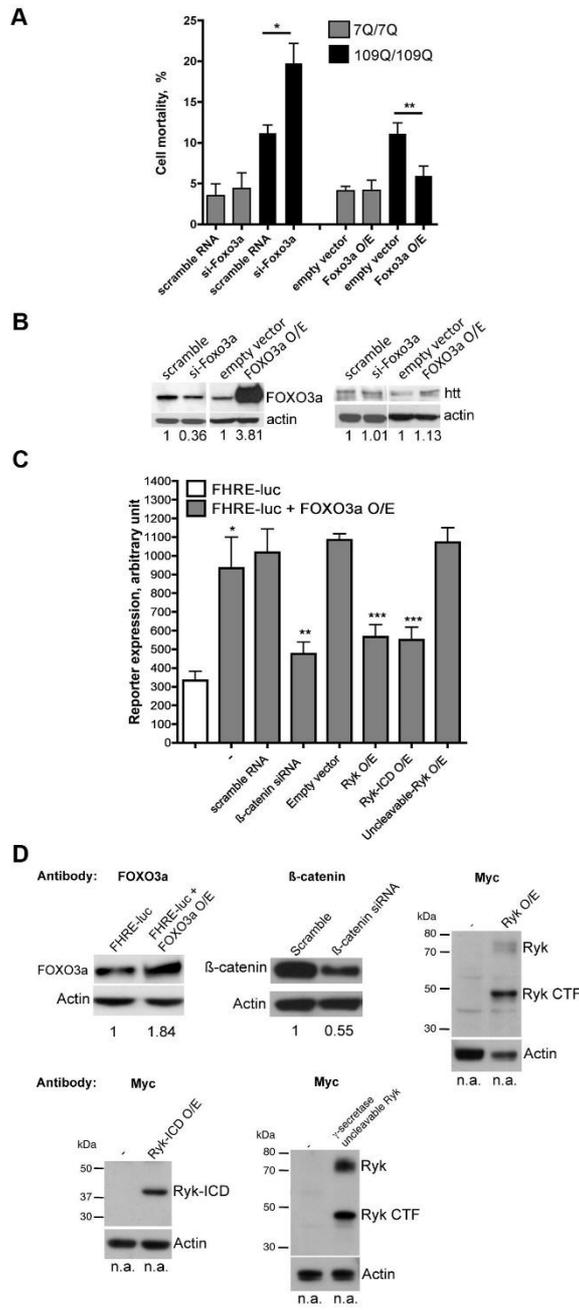
#### Ryk-ICD Represses FOXO3a Activity in Luciferase Reporter Assays

We then sought to test whether an excess of Ryk may repress FOXO transcriptional activity. We also tested whether an excess of the  $\gamma$ -secretase-cleaved ICD of Ryk may have a similar effect, as the Ryk-ICD fragment associates with  $\beta$ -catenin (see Figure 3B), a protein that promotes FOXO transcriptional activity [9]. We examined the activity of FOXO3a, a protein that is neuroprotective in models of motor neuron disease [32], also protecting against cell death associated with mutant HTT in striatal cells from HdhQ111 knock-in mice (Figure 4A/B). From here, we further examined the molecular relationships between FOXO3a,  $\beta$ -catenin, and Ryk in mutant polyQ toxicity. To this end, constructs encoding FOXO3a together with a Forkhead responsive element (FHRE)-luciferase reporter and internal control reporter were utilized to transfect mouse striatal cells that express normal HTT. Reducing  $\beta$ -catenin levels reduced luciferase activity compared to control cells (Figure 4C/D), which is consistent with the ability of  $\beta$ -catenin to promote FOXO transcriptional activity in mouse cells [9]. Overexpressing Ryk reduced luciferase activity to levels comparable to those observed for  $\beta$ -catenin siRNA treatment (Figure 4C), suggesting that Ryk up-regulation can repress FOXO3a transcriptional activity. Western blotting indicated that this effect might be attributable to full-length Ryk and to a Ryk C-terminal fragment (Ryk CTF) of ~47 kDa (Figure 4D). However, the CTF fragment is too large to be the  $\gamma$ -secretase cleavage product of Ryk (Ryk-ICD, ~40 kDa). The size of this fragment suggests that Ryk CTF contains the ICD plus the transmembrane domain and a portion of the extracellular domain, which is consistent with the possibility that other proteases might cleave the extracellular domain of Ryk near the transmembrane domain [33]. The Ryk-ICD fragment was not visible, which might be

attributable to a very short half-life of this fragment similar to what has been observed for the  $\gamma$ -secretase-cleaved intracellular fragment of transmembrane proteins such as the amyloid precursor protein (APP) [34]. Interestingly, Ryk-ICD overexpression produced a similar reduction of luciferase activity compared to Ryk overexpression (Figure 4C/D), indicating that Ryk-ICD is sufficient to repress FOXO3a transcriptional activity. Furthermore, overexpressing a mutant form of Ryk that cannot undergo  $\gamma$ -secretase cleavage (Ryk:EGFR Rc) showed no effect on luciferase activity (Figure 4C). Mutant Ryk was detected as one fragment corresponding to full-length Ryk and one fragment corresponding to Ryk CTF (Figure 4D). In contrast to cells transfected with wild-type Ryk, the full-length Ryk precursor appeared to be more abundant in cells transfected with mutant Ryk (Figure 4D). This suggests that blocking the  $\gamma$ -site of Ryk may also block Ryk CTF generation, an effect that was previously shown for APP [35] and that further points to putative similarities between Ryk and APP processing. Collectively, these results suggested that the generation of the Ryk-ICD fragment is important for the cytotoxic action of Ryk.

#### LIN-18 ICD Suppresses Neuroprotection by *lin-18* LOF in Expanded-PolyQ Nematodes

We next tested whether the Ryk ICD has a role in mutant polyQ cytotoxicity as predicted by its ability to repress FOXO transcriptional and neuroprotective activity. In 128Q nematodes, *lin-18*/Ryk LOF is neuroprotective, and this effect is cell autonomous, as LIN-18 overexpression in touch receptor neurons suppresses the neuroprotective effect of *lin-18* LOF (see Figure 2A). Interestingly, overexpression (at a dose of 4 ng/ $\mu$ l) of the LIN-18 ICD was sufficient to suppress the protective effect of *lin-18* LOF on touch response in 128Q nematodes with no effect detected in 19Q nematodes as tested in two independent arrays per polyQ genotype (Figure 5A). Although overexpressing LIN-18 ICD at higher doses (40 ng/ $\mu$ l) showed a trend towards exacerbation of 128Q cytotoxicity but did not reach statistical significance relative to control (Figure S5), overexpressing LIN-18 ICD at 40 ng/ $\mu$ l produced cytotoxicity in 19Q nematodes (Figure S5), suggesting



**Figure 4. The Ryk ICD represses the transcriptional activity of FOXO3a, a protein that protects from mutant HTT.** (A) Foxo3a siRNA treatment enhances the mortality of mutant *htt* striatal cells subjected to serum deprivation, whereas FOXO3a overexpression (O/E) has the opposite effect. Data are mean  $\pm$  SD ( $n=4$ ). \* $p<0.001$  compared to scramble; \*\* $p<0.001$  compared to empty vector control. (B) Representative Western blots showing decreased (si-Foxo3a) or increased (FOXO3a O/E) FOXO3a levels and no change in HTT protein levels. (C) FOXO transcriptional activity was measured in normal *htt* mouse striatal cells. Cells were cultured in normal conditions and co-transfected with a construct encoding FOXO3a together with the reporter FHRE-luciferase, which contains three canonical FOXO binding sites, and an internal *Renilla* luciferase reporter construct. Luciferase and *Renilla* luciferase activities were measured and the ratio (luciferase/*Renilla* luciferase)10,000 calculated. Data are mean  $\pm$  SD of four independent experiments performed in triplicate. Treatment with  $\beta$ -catenin siRNA, full-length Ryk cDNA, and Ryk-ICD cDNA reduces luciferase activity to similar levels, whereas treatment with uncleavable Ryk showed no effect. \* $p<0.001$  compared to FHRE-luc, \*\* $p<0.001$  compared to scramble RNA and \*\*\* $p<0.001$  compared to FOXO3a O/E. Significance was tested using one-way ANOVA, with correction for multiple testing by Tukey's Multiple Comparison Test. (D) Representative Western blots showing increased levels of FOXO3a and decreased levels of  $\beta$ -catenin, and expression of Myc-tagged Ryk, Myc-tagged Ryk-ICD, and Myc-tagged  $\gamma$ -secretase-uncleavable Ryk (all proteins with a Myc tag at the C-terminal end). The Myc-tagged Ryk and  $\gamma$ -secretase-uncleavable Ryk proteins were detected as two fragments, one corresponding to the full-length Ryk precursor (Ryk) and one corresponding to a Ryk CTF (Ryk CTF) resulting from proteolytic cleavage in the extracellular domain near the transmembrane domain. The full-length Ryk precursor is less abundant for wild-type Ryk expression compared to mutant Ryk expression (see Results for the discussion of Ryk expression profiles).  
doi:10.1371/journal.pbio.1001895.g004

that LIN-18 ICD has dose-dependent effects in polyQ;*lin-18* nematodes. The overexpression (4 ng/ $\mu$ l) of LIN-18 ICD was also sufficient to suppress the protective effect of *lin-18* LOF on axonal swelling (Figure 5B), accompanying the loss of touch response in 128Q nematodes [15]. Given that overexpressing the Ryk-ICD fragment is sufficient to reduce FOXO transcriptional activity (Figure 4C/D), this further suggested that the Ryk-ICD fragment mediates Ryk cytotoxicity.

#### Ryk-ICD Is Cytotoxic in Mouse Striatal Cells Expressing Mutant *htt*

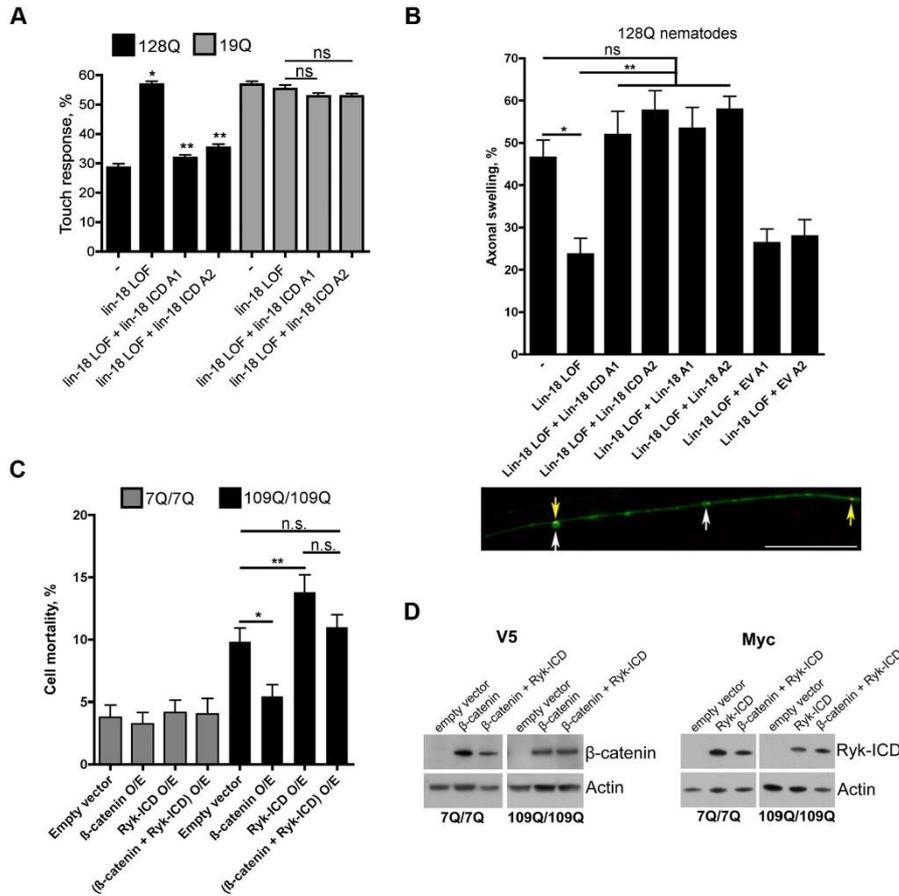
Next, we tested whether overexpressing the Ryk-ICD fragment may be cytotoxic in striatal cells derived from HdhQ111 knock-in mice [23] and whether this involves  $\beta$ -catenin activity. To this end, striatal cells were transfected with either a construct coding for Myc-tagged Ryk-ICD or a construct coding for V5-tagged  $\beta$ -catenin, or both, and these cells were subjected to serum deprivation. The overexpression of Ryk-ICD showed no effect on normal *htt* cell survival (Figure 5C/D). These results are consistent with the absence of toxicity for LIN-18 and LIN-18 ICD overexpression in normal-polyQ nematodes (see Figure 2A, Figure 5A), supporting a model in which Ryk up-regulation represses a mechanism (FOXO activity) that specifically promotes mutant polyQ neuron survival. Although mutant *htt* cells have high endogenous Ryk levels (see Figure 1B), overexpressing Ryk-ICD potentiated cell mortality (Figure 5C/D). This effect was moderate, however, suggesting that Ryk toxicity is close to a maximum in these cells. Consistent with the pro-survival role of  $\beta$ -catenin, overexpressing  $\beta$ -catenin reduced the cell death of mutant *htt* cells with no effect detected in normal *htt* cells (Figure 5C/D). The protective effect of  $\beta$ -catenin overexpression in mutant *htt* cells was abolished by Ryk-ICD overexpression (Figure 5C/D), suggesting that Ryk-ICD may antagonize  $\beta$ -catenin activity. There was no significant difference between the mortality of mutant *htt* cells transfected with Ryk-ICD alone and that of cells co-transfected with Ryk-ICD and  $\beta$ -catenin (Figure 5C/D). Nonetheless, cells co-transfected with Ryk-ICD and  $\beta$ -catenin showed similar levels of mortality compared to cells transfected with the empty vector (Figure 5C/D), suggesting that  $\beta$ -catenin overexpression may compensate for Ryk-ICD cytotoxicity to that extent. As such, these results might just reflect the parallel activity of two proteins with antagonistic properties in the regulation of cell survival. However, given that Ryk-ICD binds to  $\beta$ -catenin (see Figure 3), these results supported a model in which a functional cross-talk between Ryk-ICD and  $\beta$ -catenin contributes to Ryk-ICD cytotoxicity.

#### Reducing Presenilin 1 Levels Compensates for the Cytotoxicity of Full-Length Ryk in Mutant *htt* Mouse Striatal Cells

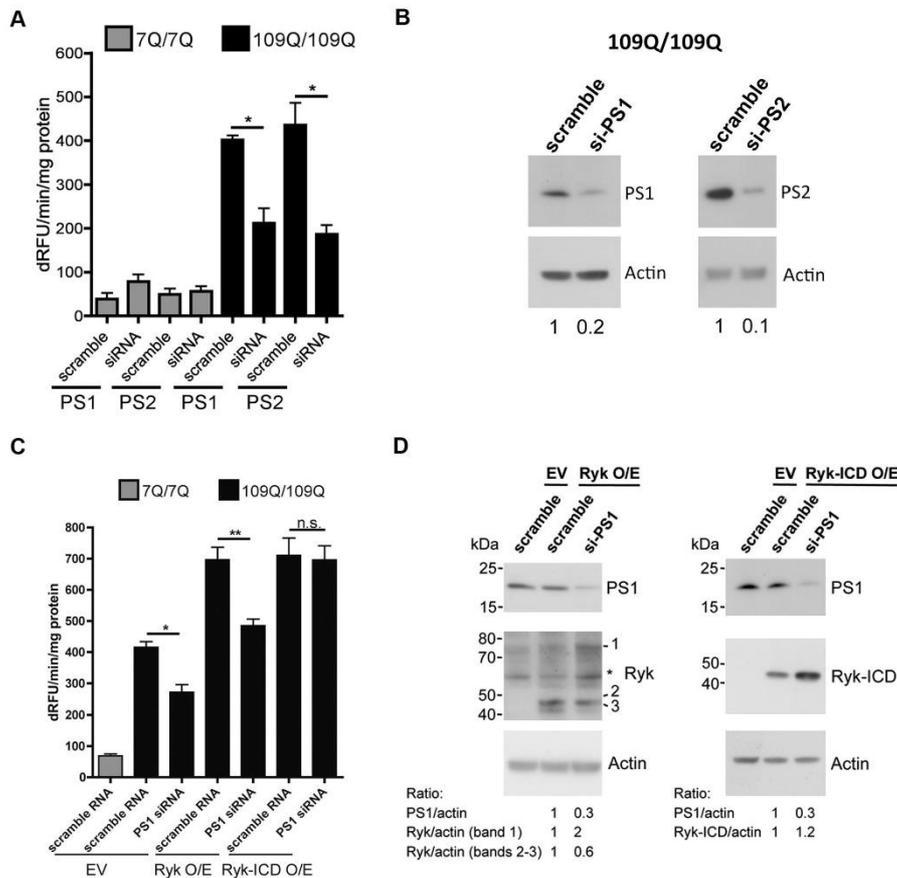
Our results in *C. elegans* neurons and mouse striatal cells suggest a model in which the repression of FOXO3a activity by Ryk in mutant polyQ cells is mediated by the Ryk-ICD fragment, a  $\gamma$ -secretase cleavage product. The  $\gamma$ -secretase complex has been previously implicated in HD through its role in HTT cleavage and production of N-terminal fragments CpA and CpB [36]. Here, we sought to investigate the protective role of the  $\gamma$ -secretase complex relative to the pathological activity of Ryk in mutant polyQ cells. To this end, we tested whether decreasing the activity of the  $\gamma$ -secretase complex might promote the survival of mutant *htt* mouse striatal cells and whether this effect might compensate for Ryk toxicity in these cells. At this point in our study, we elected to measure caspase 3/7 activity instead of counting picnotic nuclei in order to perform faster and complementary measures of striatal cell mortality. We observed that reducing the expression of presenilins PS1 or PS2 enhanced the viability of mutant *htt* striatal cells, with no effect detected in normal *htt* cells (Figure 6A/B). Most importantly, reducing the levels of PS1 compensated for the cytotoxic effect of overexpressing full-length Ryk but not that of overexpressing Ryk-ICD in mutant *htt* cells (Figure 6C). The compensatory effects of reducing PS1 levels on Ryk cytotoxicity was accompanied by an apparent increase of full-length Ryk levels as inferred from Western blot analysis (Figure 6D). A decrease of the CTFs that may be generated by the sequential proteolysis of Ryk such as Ryk-CTF and Ryk-ICD [33] was also apparent, however to a lesser extent (Figure 6D). Given that Ryk-ICD may result from PS1 cleavage, as previously investigated in PS1-deficient cells [16], these results suggested that Ryk toxicity may be triggered by the production of Ryk-ICD in mutant *htt* cells, which led us to analyze endogenous Ryk-ICD levels in these cells.

#### Ryk-ICD Is Increased in the Nucleus of Mutant *htt* Striatal Cells

The model supported by our data for Ryk to be toxic in HD suggests that Ryk-ICD levels might be increased in mutant polyQ cells. To explore this possibility, we used a newly obtained rabbit polyclonal Ryk-ICD antibody (anti-Ryk<sup>ICD</sup>) [33] to perform immunocytochemical staining of mouse striatal cells followed by confocal analysis. This antibody was raised against the Ryk-ICD fragment, and it recognizes Ryk species that contain the ICD including full-length Ryk and the Ryk-ICD fragment [33]. Depending on the type of cells and level of expression in these cells, this antibody may detect one or more of all possible Ryk species. The detection of



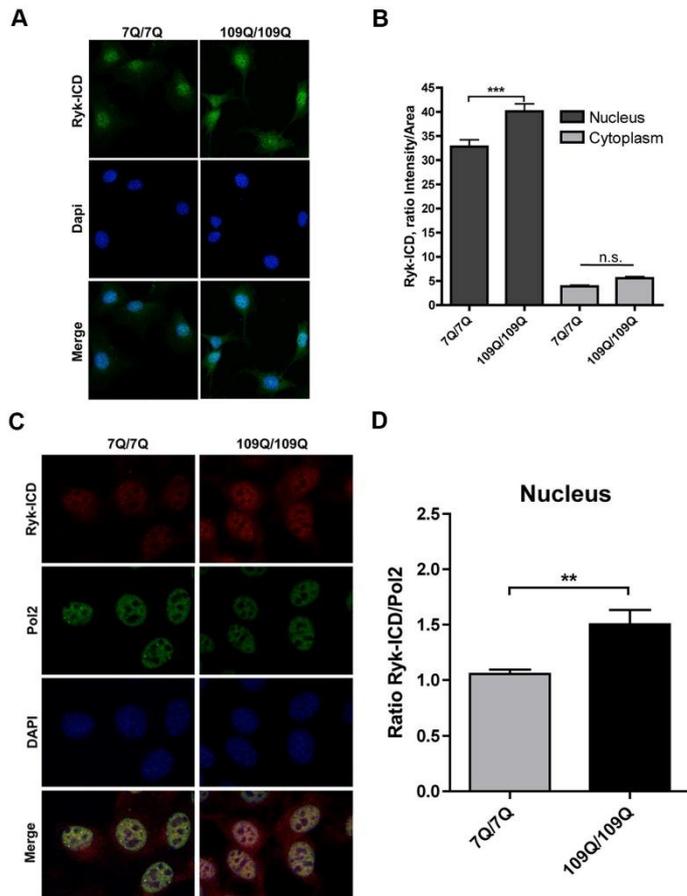
**Figure 5. The Ryk ICD is cytotoxic in *C. elegans* neurons and mouse striatal cells expressing expanded polyQs.** (A) Expression of LIN-18 ICD cDNA (4 ng/ $\mu$ l) in touch receptor neurons using the *mec-3* promoter is sufficient to abolish the neuroprotective activity of *lin-18* LOF in 128Q nematodes with no effect detected in 19Q nematodes as tested in two independent extrachromosomal arrays (128Q: A1 is ID1333, A2 is ID1334; 19Q: A1 is ID1331, A2 is ID1332; see also Table S8) per polyQ genotype. The expression of LIN-18 ICD cDNA was confirmed by RT-PCR for all of the arrays generated. Data are mean  $\pm$  SEM (more than 200 animals tested). \*\* $p < 0.001$  compared to 128Q animals, \*\* $p < 0.001$  compared to 128Q/*lin-18* animals. ns, not significant. Significance was tested using one-way ANOVA, with correction for multiple testing by Tukey's Multiple Comparison Test. (B) Expression of LIN-18 ICD cDNA (4 ng/ $\mu$ l) in touch receptor neurons using the *mec-3* promoter is also sufficient to abolish the protective activity of *lin-18* LOF on axonal swelling in the PLM neurons of 128Q nematodes as tested in two independent extrachromosomal arrays (Lin-18 ICD: A1 is ID1333, A2 is ID1334; Lin-18: A1 is ID1325, A2 is ID1326). The expression of LIN-18 ICD cDNA was confirmed by RT-PCR for all of the arrays generated. Expression of empty vector (4 ng/ $\mu$ l) showed no effect as tested in two independent extrachromosomal arrays (A1 is ID1339, A2 is ID1340). Data are mean  $\pm$  SEM (more than 200 animals tested). \* $p < 0.001$  compared to 128Q animals, \*\* $p < 0.001$  compared to 128Q/*lin-18* animals. ns, not significant. Significance was tested using one-way ANOVA, with correction for multiple testing by Tukey's Multiple Comparison Test. The lower panel shows a representative image of axonal swelling in the anterior process of posterior touch receptor neurons of 128Q nematodes co-expressing HTT1-57::CFP and YFP [7]. Swelling (white arrows, YFP signals are pseudocolored in green) and HTT::CFP aggregation (yellow arrows, CFP signals are pseudocolored in red) are shown. Magnification is 100 $\times$  and scale bar is 5  $\mu$ m. (C) Overexpressing either V5-tagged  $\beta$ -catenin or Myc-tagged Ryk-ICD or both has no effect on the mortality induced by serum deprivation in normal htt striatal cells. Overexpressing  $\beta$ -catenin reduces the mortality induced by serum deprivation in mutant htt striatal cells, whereas overexpressing the Ryk-ICD aggravates cell mortality. Co-expressing Ryk-ICD and  $\beta$ -catenin resulted in cell mortality levels that are similar to those induced by empty vector overexpression. Data are mean  $\pm$  SD ( $n = 4$ ). \* $p < 0.01$  and \*\* $p < 0.05$  compared to empty vector. ns, not significant. Significance was tested using paired  $t$  tests. (D) Representative Western blot showing increased V5-tagged  $\beta$ -catenin and Myc-tagged Ryk-ICD levels after transfection of 7Q/7Q and 109Q/109Q striatal cells. doi:10.1371/journal.pbio.1001895.g005



**Figure 6. Reducing presenilin 1 expression counteracts the cytotoxicity of full-length Ryk overexpression in mutant htt striatal cells.** Assays were performed using caspase 3/7 activity in cells subjected to serum deprivation. (A) PS1 and PS2 siRNA treatment enhances the viability of mutant htt striatal cells. Data are mean  $\pm$  SD ( $n=3$ ),  $*p<0.01$  compared to scramble RNA. Significance was tested using one-way ANOVA, with correction for multiple testing by Tukey's Multiple Comparison Test. (B) Representative Western blots showing decreased levels of PS1/PS2. (C) Knockdown of PS1 reduces the cytotoxic effects of overexpressing full-length Ryk in mutant htt striatal cells, with no effect detected on the cytotoxic effects of overexpressing Ryk-ICD. Data are mean  $\pm$  SD ( $n=4$ ),  $*p<0.05$  and  $**p<0.01$  compared to scramble RNA. Significance was tested using one-way ANOVA, with correction for multiple testing by Tukey's Multiple Comparison Test. EV, empty vector; ns, not significant. (D) Representative Western blots showing decreased levels of PS1 and expression of Myc-tagged Ryk species and Myc-tagged Ryk-ICD. \*Nonspecific signal. doi:10.1371/journal.pbio.1001895.g006

Ryk species is also dependent on the methods used for expression analysis (see Western blot in Figure S6) and likely to be dependent on epitope accessibility. Immunocytochemical staining of mouse striatal cells indicated that Ryk-ICD immunoreactivity was primarily localized in the nucleus, with little signal detected in the cytoplasm and no signal detected at the membrane (Figure 7A/B). Additionally, the intensity of nuclear staining was decreased if Ryk expression is reduced (Figure S7). These results suggested that full-length Ryk might be rapidly processed to produce intracellular fragments that localize to the nucleus. Interestingly, nuclear Ryk-ICD levels

appeared to be increased by about 25% in mutant htt cells compared to normal htt cells, with no change detected in the cytoplasm (Figure 7A/B). This effect was observed for normal and mutant htt cells cultured on the same slides and for cell nuclei having similar sizes between genotypes. We further investigated the possibility that nuclear Ryk-ICD levels may be increased by using an internal control for improved comparison of Ryk-ICD levels between normal and mutant htt cell nuclei. We elected to use Pol2 immunostaining as a second antigen, as we observed that Pol2 levels are similar between normal and mutant htt cells.



**Figure 7. The ICD of Ryk is increased in the nucleus of mutant htt striatal cells.** (A) Representative confocal microscopy images showing the pattern of Ryk-ICD immunoreactivity in normal htt (7Q/7Q) and mutant htt (109Q/109Q) striatal cells under normal culture conditions (no serum starvation) as detected using the rabbit polyclonal antibody anti-Ryk<sup>ICD</sup>. (B) Quantification of Ryk-ICD immunoreactivity in mouse striatal cells. 7Q/7Q and 109Q/109Q cells were grown on the same slides. Comparisons were performed for cells with a nucleus size in the range of 150–250 pixels. Ryk-ICD immunoreactivity was increased in the nucleus of 109Q/109Q cells compared to 7Q/7Q cells. Data are mean  $\pm$  SEM for the ratio Intensity/Area as detected in either nucleus or cytoplasm ( $n = 3$  for a total of at least 100 cells analyzed),  $***p < 0.0001$  compared to normal htt cells; n.s., not significant. Significance was tested using one-way ANOVA, with correction for multiple testing by Tukey's Multiple Comparison Test. Ryk siRNA treatments were observed to reduce nuclear Ryk-ICD immunoreactivity in 109Q/109Q cells (see Figure S6). (C) Representative confocal microscopy images showing the pattern of Ryk-ICD immunoreactivity in normal htt (7Q/7Q) and mutant htt (109Q/109Q) striatal cells under normal culture conditions (no serum starvation) as detected using the rabbit polyclonal antibody anti-Ryk<sup>ICD</sup> and mouse Pol2 antibody 7C2. (D) Quantification of Ryk-ICD and Pol2 immunoreactivity in mouse striatal cells. 7Q/7Q and 109Q/109Q cells were grown on the same slides. Comparisons were performed for cells with a nucleus size in the range of 150–250 pixels. The ratio for Ryk-ICD/Pol2 immunoreactivity was increased in the nucleus of 109Q/109Q cells compared to 7Q/7Q cells. Data are mean  $\pm$  SEM for the ratio Intensity Ryk-ICD/Intensity Pol2 as detected in the nucleus ( $n = 4$  for a total of at least 100 cells analyzed),  $**p < 0.002$  compared to normal htt cells. Significance was tested using Welch's  $t$  test. doi:10.1371/journal.pbio.1001895.g007

Nuclear Ryk-ICD levels were increased by about 40% in mutant htt cells in these experiments (Figure 7C/D). Collectively, these observations suggested that nuclear Ryk-ICD levels may be significantly increased in mutant htt cells, corroborating the *C.*

*elegans* and striatal cell data on the toxic effects of Ryk-ICD overexpression (see Figures 5 and 6) and further supporting a model in which the ICD of Ryk triggers the detrimental effects of Ryk increase in mutant polyQ cells.

### Striatal Ryk Expression Profiles in 140CAG Knock-in Mice and HD Patients

In 128Q nematodes, *lin-18/Ryk* is up-regulated at an early stage of touch receptor neuron genesis (see Figure S4, Table S5)—that is, before the onset of pathology (loss of touch response) as detected in late larvae/young adults [7]. This led us to explore whether Ryk might be increased before or at an early stage of pathology in HD mice. Although there are a number of fragment and full-length genetic mouse models of HD, each possessing useful experimental outcomes that can be used to provide a greater understanding of the human disease process, full-length knock-in HD mice such as 140CAG mice [24] may provide the best possible genetic comparability to human HD. Western blot analysis of protein extracts from the striatum of 140CAG mice using a N-terminal Ryk antibody showed that Ryk can be detected as two bands, one band corresponding to full-length Ryk and a weaker band of ~28 kDa (Figure S8A). The weaker band likely corresponds to an extracellular fragment of Ryk that is generated by proteolytic cleavage near the transmembrane domain, illustrating again (see Figure 4D) the possibility that Ryk may be cleaved by several proteases [33]. Densitometric analysis of Ryk showed an increase of immunofluorescence activity in the neostriatum of 140CAG HD mice at 8 mo of age (Figure S8B). To explore the chronological features of Ryk increase in the striatum of 140CAG mice, we performed immunohistochemical analysis and observed a significant age-dependent increase of Ryk levels at 2, 4, 6, and 8 mo of age (Figure S8C). Because running wheel and sensorimotor deficits may begin at 4 mo in the 140CAG HD mice with climbing deficits detected at 1.5 mo [24], this observation suggested that Ryk might be increased prior to the onset or during the early phases of motor decline in these mice.

We next explored striatal Ryk expression in HD brains. Human HD brain tissue specimens were age-matched and postmortem interval-matched. Densitometric analysis of Ryk showed a significant increase of immunofluorescence in grade 1/2 HD patients (Figure S9A). In contrast to large cholinergic neurons and medium-sized NADPH-diaphorase aspiny neurons, medium-sized spiny GABAergic projection neurons of the HD striatum are affected early and most severely [37]. To further explore Ryk immunoreactivity within the striatum of HD patients, we performed double immunofluorescence for Ryk in combination with either calbindin or NOS immunoreactivities, labeling degenerating and relatively unaffected striatal neurons, respectively. Ryk co-localized with calbindin-positive striatal neurons, with no cross-reactivity with spared NOS-positive neurons (Figure S9B), suggesting that Ryk immunoreactivity might correlate with the selective neuronal loss observed in HD. Additionally, we tested whether Ryk immunoreactivity might correlate with HD severity. Little positive Ryk immunoreactivity was present in the control specimens, with marked expression of Ryk immunoreactivity in all HD tissue samples in neurons, neuropil, and other cell types with increased degrees of neuropathological severity (Figure S9C). Densitometric analysis showed grade-dependent increases in Ryk immunoreactivity (Figure S9C). Finally, we used combined Ryk GFAP immunofluorescence to test whether Ryk might be increased in cells other than neurons for the most severe HD grade (grade 4), in which few medium spiny neurons are left in the caudate nucleus. Compared with age-matched normal specimens, Ryk immunofluorescence was increased within astroglia from caudate nucleus grade 4 HD, but not on a one-to-one basis (Figure S10). Although Ryk immunofluorescence signals were observed in the GFAP-negative area, and although there were glial figures without co-localized Ryk, Ryk immunoreactivity appeared to be predominantly from astrocytes (Figure S10), a possibility also

suggested by the densitometric analysis of Ryk immunoreactivity in mouse striata (Figure S8B).

Collectively, these results suggested that Ryk may have discrete patterns of increased expression in striata and caudate nuclei, an aspect that will be the subject of future studies that include additional Ryk antibodies and brain samples.

### Discussion

Wnt signaling regulates several developmental processes, including synaptic differentiation, as well as adult neurogenesis [11]. The activation of canonical and noncanonical Wnt pathways may be neuroprotective in neurodegenerative disease as indicated by studies of A $\beta$  oligomer toxicity [11]. Studies of polyglutamine expansion [7] and A $\beta$  toxicity [8] indicates that the same applies to the activation of the FOXO pathway, a pathway that is central to cell survival/longevity [38] as well as neuronal cell homeostasis [39]. Here, we found that Ryk, a Wnt receptor important to axon guidance [40,41], is increased in mutant polyQ neurons and represses FOXO neuroprotective activity, highlighting a pathological situation in which the Wnt and FOXO pathways interact to promote neuron dysfunction and degeneration. The Ryk protein is involved in canonical Wnt to regulate neurite outgrowth, being required for TCF-driven transcription through binding to Frizzled and Dishevelled [26]. This raised the possibility that Ryk might repress FOXO activity via the alteration of the canonical Wnt/Fzd  $\beta$ -catenin pathway. However, Wnt ligands such as *cwn-1/WNT4*, *cwn-2/WNT5*, and *egl-20/WNT16* and the transcription factor *pop-1/TCF* did not appear to modulate 128Q neurotoxicity in *C. elegans*, suggesting that canonical Ryk signaling may not contribute to the toxicity of Ryk in mutant polyQ neurons. Besides its ability to signal through the planar cell polarity pathway [19,20], the Ryk protein can also signal through another noncanonical pathway, namely the nuclear translocation of its ICD (Ryk-ICD), a  $\gamma$ -secretase cleavage product that is required for cortical neurogenesis [16]. Here, we provide a model in which the repression of FOXO by Ryk in mutant polyQ neurons may primarily occur through the nuclear translocation of the Ryk-ICD fragment. Our data noticeably indicate that (i) the free Ryk-ICD fragment may be sufficient to repress FOXO activity in mutant polyQ cells, (ii) the *lin-18/Ryk* ICD fragment is sufficient to suppress the protective effects of *lin-18* knock-out on the function of polyQ-expanded nematode neurons, and (iii) the free Ryk-ICD fragment may bind to  $\beta$ -catenin, and there is a functional cross-talk between Ryk-ICD and  $\beta$ -catenin in the modulation of Ryk-ICD cytotoxicity. These data support the possibility that abnormally high amounts of Ryk-ICD may prevent the activity of  $\beta$ -catenin, a survival protein [9,14,42] that promotes FOXO transcriptional activity [9] and protects against the early phases of mutant polyQ cytotoxicity [10]. This model is further supported by our data linking Ryk and  $\gamma$ -secretase PS1 in the modulation of mutant htt striatal cell viability, and by our data on the increase of endogenous Ryk-ICD levels in the nucleus of these cells. Collectively, these observations point to the Ryk-ICD fragment as an important mediator of the detrimental effects of Ryk increase. The  $\gamma$ -secretase complex is involved in the role of Ryk in cortical neurogenesis [16] and has been previously implicated in HD through its effect on HTT proteolysis and production of N-terminal HTT species [36]. Our data suggest that  $\gamma$ -secretases may also have a role in the regulation of cell stress response in HD by mediating the detrimental effects of Ryk increase on FOXO3a activity. Here, it is noticeable that *aph-1*, the *C. elegans* homologue of APH-1B [43], may be up-regulated by expanded polyQs, as suggested by our microarray data from touch receptor cells, which

might further contribute to the toxicity of the Ryk-ICD pathway in mutant polyQ cells. Future research will build on these observations to further investigate the mechanisms that may underlie the pathological role of the Ryk-ICD/FOXO3a pathway in HD. Besides testing whether Ryk cytotoxicity might be modulated by mammalian Wnt ligands or Ryk inhibitory antibodies [33] and studying whether an excess of the Ryk-ICD fragment might tether  $\beta$ -catenin away from FOXO, it will be interesting to identify the FOXO3a transcriptional targets that may be deregulated by Ryk in mutant polyQ neurons and understand how this may impact brain longevity mechanisms as the pathogenic process develops in HD. The type and activity of FOXO target genes may greatly depend on the cellular context in which FOXO operates [4,44], which may also be true in HD, as suggested by the study of context dependence in FOXO interaction networks across mouse and human datasets [25]. Interestingly, the transcriptomic signature of 128Q nematode touch receptor cells contains 84 genes that were previously identified as putative *daf-16*/FOXO targets in *C. elegans*, including 31 genes that are highly conserved in mice (Table S7), suggesting that FOXO target genes may be altered by mutant polyQ expression. The deregulation status of most of these 31 genes appeared to be greatly context-dependent, as evaluated by using entropy-based feature selection across 14 HD-associated conditions including murine striatum and human (postmortem brains, blood samples, induced pluripotent stem cells) datasets (Table S7) [5], which emphasizes the importance of context (e.g., cell type, time requirement) in future analyses of the physiological impact of abnormal Ryk signaling on FOXO activity in HD.

*Lin-18*/Ryk is up-regulated in 128Q nematode touch cells before the loss of touch response—that is, prior to pathology in *C. elegans*. In the neostriatum of 140CAG mice, Ryk increase is first detected during the early phases of pathology in these mice, which further links increased expression of Ryk with the early phases of HD pathology. The alteration of Ryk may also be associated with the human disease, as suggested by the grade-dependent increase of Ryk immunoreactivity in the human HD caudate nucleus. However, although the increase of Ryk detected in the neostriatum of 140CAG mice is unlikely to result from abnormal Ryk degradation or age-dependent accumulation of Ryk as it was observed in young mice, Ryk immunoreactivity in postmortem HD brains might be influenced by several factors such as alteration of cyto-architectural structure and disease-unrelated factors. Similarly to other membrane proteins, Ryk might be processed by several proteases that cleave Ryk in the vicinity of its transmembrane domain [33], which might generate Ryk C-terminal and N-terminal fragments with distinct localization and half-life in brain tissues. Selective Ryk antibodies such as inhibitory anti-Ryk antibody RWD1 were recently described [33], and these antibodies will be useful in additional studies of Ryk expression in the HD mouse and human HD brain.

The Ryk protein is solely represented in several genomes, and reducing its pathological levels is anticipated to ameliorate neurological disease, which makes this receptor an attractive candidate for therapeutic intervention. Ryk is acutely induced in models of CNS injury and in concert with Wnt signaling proteins inhibits axon regeneration [45,46], suggesting that Ryk inhibition may promote axon regeneration upon injury. Our findings identify the inhibition of Ryk-ICD signaling as a therapeutic strategy to restore cell stress response and neuronal function in HD and perhaps in other neurodegenerative diseases. The up-regulation of Ryk prior to pathology in 128Q nematodes, the up-regulation of Ryk at the mRNA and protein levels in mutant *htt* striatal cells derived from HdhQ111 mice, and the converging evidence for

nuclear Ryk-ICD to mediate Ryk neurotoxicity by altering FOXO activity suggest that the inhibition of the Ryk-ICD pathway may have therapeutic potential in HD.

In summary, our study reveals that Ryk activity is altered in mutant polyQ neurons, with Ryk up-regulation promoting neuronal dysfunction via the early-stage repression of FOXO neuroprotective activity. Regardless of a possible contribution from other mechanisms, our findings support a model in which the ICD of Ryk, a  $\gamma$ -secretase cleavage product, may be important for the neurotoxic action of Ryk increase by altering the protective activity of the  $\beta$ -catenin/FOXO complex. These data highlight a pathological process in which neurodevelopmental pathways may be altered during the early stages of the pathogenic process in neurodegenerative disease to repress cell stress response and “neuronal longevity” mechanisms such as those controlled by FOXO and its co-factors. Importantly, our data reveal that neurons may be unable to develop an efficient FOXO-mediated survival response against the earliest stages of mutant *HTT* toxicity. This suggests that the early-stage restoration of neuronal resistance capacity through the stimulation of cell-stress response networks and mechanisms that are under FOXO control might efficiently delay the pathogenic process in HD, which may have significant implications for the prioritization of disease-modifying strategies and identification of disease modifiers.

## Materials and Methods

### Ethics Statement

All the animal experiments were performed in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee at the University of Pittsburgh. Work involving human brain tissue samples was approved by the institutional review board and the Committee for Oversight of Research Involving the Dead at the University of Pittsburgh.

### *C. elegans* Assays

Nematode strains were handled using standard methods [47]. The integrated polyQ strains used in this study were previously described [15,48] and all assays were performed blindly. Some nematode strains used in this work were provided by the Caenorhabditis Genetics Center, which is funded by the National Institutes of Health National Center for Research Resources. The complete list of strains used in this study is shown in Table S8. Constructs encoding LIN-18 were generated as follows. The *lin-18* cDNA was obtained from wild-type animals by RT-PCR, using *lin-18\_attB5* (5'-GGGGACAACCTTGTATACAAAAGTTGATGTTTCATCAGCAAAGAGGA) and *lin-18\_attB2* (5'-GGGG-ACCAC'TTTGTACAAGAAAGCTGGGTATTAGATGTATTGACTGAGT) primers. These primers contain, respectively, attB5 and attB2 sequences for recombination in the pDONR221-P5-P2 vector, using the Gateway system (Invitrogen). In parallel, we produced a clone, in pDONR221-P1-P5r, containing the promoter of *mec-3*, *mec-3p*, using primers RV3 (5'-GGGGAC-AAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTCTGCGAGGTACCGGAGTAGTTG) and RV4 (5'-GGGGACAACCTTTTGTATACAAAAGTTGTTGGCGCGCAATGCGCGAAATTGTG GCTACTC). Both clones were used to assemble *mec-3p* and *lin-18*, using Gateway technology, in the destination vector pDEST-AN [49], which is suitable for *C. elegans* transgenesis. To produce the construct coding for the LIN-18 ICD, we used the same strategy. Briefly, we used as a reverse primer *lin-18\_attB2*, and a forward primer located after the sequence that encodes LIN-18 ICD, RV61 (5'-GGGGACAACCTTGTATACAAAAGTTGAAAATGTTCAAGCGCTC-

TAAAAAGAAGA). Constructs were verified for sequence integrity and were then injected at 4–40 ng/μl in 19Q;*lin-18(e620)* and 128Q;*lin-18(e620)* nematodes, together with pPD118.33 (a plasmid containing *myo-2p::GFP*) at 10 ng/μl as a marker to follow transgenesis and pUC18 as a DNA carrier to a final total DNA concentration of 100–150 ng/μl, using standard methods. We isolated at least two independent strains from each construct based on GFP expression in the pharynx to perform touch assays and axonal swelling assays. Touch response assays were carried out as described [7]. Touch tests involved scoring for the response to light touch at the tail by using a fine hair. Touch tests were performed by scoring 10 touches at the tail of an animal for a minimum of 200 animals per genotype. Ordinarily, wild-type animals will respond by backing away from the touch. The responses were recorded for every animal such that, for example, 3 responses out of 10 at the tail is given as 30% responsiveness, and the mean values for responsiveness were retained for comparison of nematode groups. Touch tests were performed by two groups of two experimenters, and maximum baseline variation was 9%. Axonal swelling was scored as previously described [7]. Briefly, 128Q nematodes were mounted on agar pads and immobilized using levamisole 20 mM, prior to examination on a 40× objective of a Leica Axioplan microscope, equipped with fluorescence. A total of more than 150 animals per strain were examined for axonal swelling in PLM neurons. Animals containing at least one swollen axon were scored as positive. For strains expressing extrachromosomal arrays, only animals expressing the transgenic marker (i.e., GFP expressed in the pharynx under the control of *myo-2p*) were assayed. Extraction of protein from whole worms and Western blotting was conducted using standard methods [50] and the following primary antibodies: GFP antiserum (Abcam, 1:5,000) and actin antibody (Molecular Probes, 1:5,000). Secondary antibodies used were as follows: goat-anti-rabbit IgG HRP-conjugated (Abcam, 1:10,000) and goat-anti-mouse IgG HRP-conjugated (Biorad, 1:10,000). Proteins were detected by using ECL+ (ECL for actin) and evaluated by densitometry. Unpaired *t* tests were used for statistics.

#### Primary Cultures of Embryonic Nematode Cells

Embryonic cells were obtained as previously described [51]. Briefly, embryos were isolated from gravid adults following lysis in a hypochlorite solution. Eggshells were removed by incubation in 0.5 ml chitinase/chymotrypsin (1 U/ml and 3,000 U/ml, respectively, in egg buffer) for 20 min. Following resuspension in egg buffer, the embryos were dissociated by 0.25% trypsin treatment for 5 min and resuspended in L-15 supplemented with antibiotics and 20% FBS (L15-CM). Cells were plated on TESPA (4%, Sigma) coated glass plates at a density of ~300,000 cells/cm<sup>2</sup> and maintained in L15-CM media. Cells were incubated at 20°C overnight. Wild-type (N2) cells were isolated and treated similarly.

#### Microarray Experiments and Data Analysis

The materials and methods used for FACS sorting, RNA extraction, microarray analysis, microarray data analysis, and RT-PCR are described in Text S1.

#### Striatal Cell Mortality Assays

We used striatal cells homozygous for normal (7Q/7Q) or mutant (109Q/109Q) htt derived from HdhQ111 knock-in mice [23] and handled them as previously described [30]. Low-passage (P9–P11) cell lines were used in all experiments. We used jetPEI-FluoR for transfection with cDNA, jetSI-ENDO for siRNA assays, and JetPrime for co-transfection with siRNA and cDNA as indicated by the manufacturer (PolyPlus Transfection). The siRNAs (si-Ryk, si-Foxo3a) and scramble RNAs were obtained

from QIAGEN and Operon, respectively. Mixes of 3–4 different siRNA sequences per gene (each sequence at 25 or 33 nM) were systematically tested for modulation of cell survival and target gene expression, followed by the evaluation of individual siRNA sequences at optimal concentration (100 nM). Effects on cell survival were considered to be reliable if two different siRNAs showed similar effects on target expression and cell survival and if the scramble RNAs (100 nM; unique sequence that does not match with any sequence in the mouse genome) did not show any effect. The active siRNA sequences shown in the figures are as follows: si-Ryk, 5'-GCAAATTAGTAGAAGCCAA-3' (100 nM); si-Foxo3a, 5'-GCTTCATGCGCGTTCAGAA-3' (100 nM); siPS1, 5'-GGAGCATTCTAACGAGTGA-3' (100 nM); and siPS2, 5'-CTATCAAGTCTGTGCGTTT-3' (100 nM). The corresponding scramble RNAs shown in the figures are as follows: Ryk, 5'-GCGAAAGACCTATAATGA-3' (100 nM); Foxo3a, 5'-GAGCTGTACCGATGACCTT-3' (100 nM); PS1, 5'-ACGTAGTCAATTCCGGAGAG-3' (100 nM); and PS2, 5'-GGTATTCCGTTATTCTCTA-3' (100 nM). For transfection with cDNA constructs, we used 1 μg pcDNA3.1-FOXO3a-HA (a gift from Lisa Ellerby), pcDNA3.1/nV5-DEST-β-catenin (Addgene), or pcDNA3.1-Myc-Ryk ICD. The Ryk-ICD fragment (amino acids 239 to 595) was amplified from mouse cell RNAs by RT-PCR using the Ryk-ICD att-B1 5'-GGGGACCACATTGTGTAAGAAGAAAGCTGGTATCAGACTGAGGGCTCCCAGGGCAG-3' and Ryk-ICD att-B2 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGCCGCCACCATTGAAACAAAACTTATTTCGAGAA-GATCTGAAAAGGATTGAACCTGATGACG-3' primers. The reverse primer contained a sequence (italicized) coding for a Myc tag. PCR products were subcloned into the pDONR221 vector and then into the final destination vector pcDNA3.1 using Gateway technology and verified for sequence integrity.

Cell mortality assays were performed as described previously by counting picnotic nuclei [52] or measuring caspase 3/7 activity [53]. Briefly, low passage number (P9–P12) 7Q/7Q and 109Q/109Q cells were subjected to a 24-h serum deprivation 48 h after cell transfection. Cells were then fixed and subjected to DAPI staining, and cell mortality was scored by counting picnotic versus normal nuclei in DAPI- and jetPEI-FluoR-, or JetSI-ENDO-positive cells. Alternatively, caspase assays were used and transfected cells were plated on collagen-coated 96-well plates for 48 h. After 24-h serum starvation, the activation of caspase 3/7 was measured in cells using the Apo 3/7 HTS High Throughput Screen Assay kit (Cell Technology). The activity of caspase 3/7 was measured using a Tecan infinite F500 microplate reader, with excitation and emission wavelengths of 485 and 535 nm, respectively. Caspase assays were performed using six replicates per point and data expressed as dRFU/min/mg of protein.

For qRT-PCR analysis, we used the forward 5'-TGAGAGCTGACACACCCAA and reverse 5'-CACTTCGCAAGTCGTCTCTC primers for amplification of Ryk mRNAs and forward 5'-TTTGCGCGAGCCG and reverse 5'-TAACCTGGTT-CATCATCGCTAATC primers for amplification of HPRT mRNAs as a control. For Western blotting, proteins were extracted as previously described [30], separated by SDS-PAGE, and analyzed by Western blotting using the following primary antibodies: mouse anti-HTT (4C8, Chemicon, 1:5,000), rabbit anti-RYK (Abgent, 1:100), mouse anti-FOXO3a (Cell Signaling, 1:1,000), rabbit anti-PS1 and rabbit anti-PS2 (Cell Signaling, 1:1,000), rabbit anti-Myc tag (Cell Signaling, 1:1,000), mouse anti-V5 tag (Invitrogen, 1:2,000), and mouse anti-actin (MP Biomedicals, 1:5,000). Secondary antibodies used were as follows: goat-anti-mouse IgG HRP-conjugated (Biorad, 1:10,000) and goat-anti-rabbit IgG HRP-conjugated (Biorad, 1:10,000). Proteins were

detected by using ECL+ (ECL for actin) and evaluated by densitometry. Statistical analyses were performed using unpaired *t* tests.

### Immunoprecipitation Assays

To test for interaction between Ryk and  $\beta$ -catenin, transfection of 293T cells with wild-type Myc-tagged Ryk, Flag-tagged RYK ICD, or an uncleavable Ryk mutant (Ryk, EGFRRC) [16] was performed using a calcium phosphate precipitation method [54]. Cells were lysed in a lysis buffer containing 25 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100, 10 mM sodium pyrophosphate, 10 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 1 mM sodium orthovanadate, 10% glycerol, and protease inhibitors (Roche). For immunoprecipitation, cell lysates were incubated with a specific antibody for 2 h at 4°C and then with Protein A/G agarose beads (Pierce) overnight. Immunoprecipitates were eluted using SDS sample buffer and separated using 8% or 10% SDS-PAGE. After blocking, the blots were incubated with a primary antibody and then with a peroxidase-conjugated secondary antibody. The bound secondary antibody was then detected using enhanced chemiluminescence (ECL) reagent (Santa Cruz Biotechnology). To test for an interaction between Ryk ICD and FOXO3a, mouse striatal cells were transfected with Foxo3a-HA and Myc-tagged Ryk-ICD using Jet PEI (PolyPlus Transfection) as described by the manufacturer. Cells were lysed in PBS 0.1% tween-20 supplemented with PMSF and protease inhibitors (Roche). For immunoprecipitation, cell lysates were incubated with a specific antibody for 2 h at 4°C and then with fastflow Protein A agarose beads (Sigma) overnight at 4°C. Immunoprecipitates were eluted using SDS sample buffer and separated using 4%–12% SDS-PAGE (Invitrogen). The Ryk-ICD fragment (amino acids 239 to 595) construct used in these experiments was the same as above (see striatal cell vulnerability assays).

### Luciferase Reporter Assays

Normal hit mouse striatal cells derived from HdhQ111 mice and used at low passage numbers (P9–P12) were seeded in 96-well plates, at a density of 25,000 cells/well, and were co-transfected using Amaxa technology with 0.5  $\mu$ g of the plasmid(s) pcDNA3.1-Foxo3a-HA (a gift from Lisa Ellerby) together with pcDNA3.1-Myc-Ryk (see below), pcDNA3.1-Myc-Ryk ICD (see above), pcDNA3.1-Myc-uncleavable-Ryk (see above), 100 nM of  $\beta$ -catenin siRNAs (QIAGEN) or scramble RNAs (Operon), 0.5  $\mu$ g of the luciferase reporter (FHRE-luc, Addgene) [55], which contains three canonical FOXO binding sites, and 50 ng of the Renilla luciferase construct (Promega). The pcDNA3.1-Myc-Ryk construct was generated as follows: the Myc-Ryk coding sequence was amplified from pCMV6-Myc-Ryk (Origene) by using the primers forward 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAG-CAGGCTGCCGCCACCATGCGCGCGGGCCGGGGC and reverse 5'-GGGGACCACTTTGTACAAAGAAAGCTGGGT-ATCAGAGCTAGGCTCCAGGGCAG and subcloned into pcDNA3.1, and the resulting plasmid was verified for sequence integrity. The pmaxGFP construct (Amaxa) was used as a control for cotransfection. Transfection efficiency was greater than 80%. One day after transfection, cells were lysed in 20  $\mu$ l of lysis buffer and the luciferase and Renilla luciferase activities assayed using Stop & Glo reagents (Promega) according to the manufacturer's protocol. For the  $\beta$ -catenin siRNA experiments, effects were considered to be reliable if two different siRNAs showed similar effects on  $\beta$ -catenin expression and luciferase activity and if a scramble RNA did not show any effect. The active  $\beta$ -catenin siRNA and the scramble RNA that are shown in the figures are

5'-GATAGAAATGGTCCGATTA-3' and 5'-GTGTGAATG-CATGAAACTA-3', respectively.

### Confocal Analysis of Ryk ICD Signals

Endogenous Ryk-ICD levels were analyzed in 7Q/7Q and 109/109Q mouse striatal cells [23] by using the rabbit Ryk-ICD antibody anti-Ryk<sup>ICD</sup> [33]. Low-passage (P9–P11) cell lines were grown in normal conditions (no serum starvation) and treated with Ryk siRNAs or scramble RNAs as described above (see striatal cell mortality assays) using Lab-Tek eight-chamber glass slides (BD Biosciences). For comparison of Ryk-ICD levels between 7Q/7Q and 109/109Q cells, cells were grown on the same slides. Cells were fixed and permeabilized using the Cytotfix/Cytoperm Kit (BD Biosciences) following the manufacturer's protocol. Cells were then incubated with anti-Ryk<sup>ICD</sup> (1:100) followed by incubation with the anti-rabbit secondary antibody Alexa Fluor 488 (Invitrogen, 1:500) and subjected to diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining. Alternatively, cells were co-incubated with anti-Ryk<sup>ICD</sup> (1:100) and the Pol2 antibody 7C2 (1:500) followed by co-incubation with the anti-rabbit secondary antibody Alexa Fluor 555 (Invitrogen, 1:500) and the anti-mouse secondary antibody Alexa Fluor 488 (1:500), and cells were then subjected to DAPI staining. Fluorescent signals were quantified using a confocal microscope (Leica TCS SP5) and images analyzed using ImageJ. For each of the focal planes, anti-Ryk<sup>ICD</sup> signals were quantified from the nucleus (DAPI staining). The comparison of 7Q/7Q and 109/109Q cells was based on cell nuclei that have a size of 150–250 pixels in each of the cell lines. To assess cytoplasmic expression, nuclear anti-Ryk<sup>ICD</sup> signals were blackened, and the remaining signals were quantified. Cytoplasmic analysis was performed only if nuclear anti-Ryk<sup>ICD</sup> signals were detected in the same confocal plane and cell.

### Brain Tissue Specimens

**Mouse.** Male full-length knock-in mice heterozygous for the 140CAG repeat mutation were obtained from an established colony at the Bedford VA Medical Center and were backcrossed with B6CBA females from Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). The offspring were genotyped using a PCR assay on tail DNA. Disease expression is present in these mice by 8 mo of age [56]. Groups (*n* = 10) of 1-, 2-, 4-, or 8-mo-old mutant and littermate wild-type control mice were deeply anesthetized and transcardially perfused with 2% buffered paraformaldehyde (100 ml), with care to avoid the introduction of any perfusion artifact. Brains were removed, cryoprotected, and serially sectioned (50  $\mu$ m). Serial cut mouse tissue sections were subsequently immunostained for RYK immunofluorescence.

**Human.** Postmortem striatal tissue specimens from 15 adult-onset HD patients (two Grade 1, four Grade 2, four Grade 3, and five Grade 4 cases; mean age of death, 65.3 y; range, 54–72 y) and six age-matched patients without any known neurological sequella (mean age, 67.2 y; range, 60–78 y) were dissected fresh and placed in cold (4°C) 2% paraformaldehyde-lysine-periodate solution for 24–36 h. Brain tissue specimens were received from the Bedford VA Medical Center Brain Tissue Archive. The postmortem intervals did not exceed 15 h (mean time, 10.7 h; range, 4–15 h) and were similar for controls and HD patients. CAG repeat length analysis was performed on the HD specimens (mean number of CAG repeats, 44.6). The range of CAG repeats in the adult-onset HD patients was 41–49. Each HD patient had been clinically diagnosed based on known family history and phenotypic symptoms of HD. The diagnosis of HD was confirmed by neuropathological examination and graded by severity [57]. Striatal tissue blocks were rinsed in 0.1 M sodium phosphate

buffer and placed in cold cryoprotectant in increasing concentrations of 10% and 20% glycerol, 2% DMSO solution for 24–36 h. Frozen serial sections of the striatal tissue blocks from the anterior commissure to the rostral extent of the globus pallidus were cut at 50- $\mu$ m intervals in the coronal plane and placed within a six-well collection container. The cut sections were stored in 0.1 M sodium phosphate buffer and 0.08% sodium azide at 4°C for subsequent Nissl and immunohistochemical techniques. The cut sections were stored in 0.1 M sodium phosphate buffer with 0.08% sodium azide at 4°C for subsequent immunocytochemistry, immunofluorescence, and combined immunofluorescence methods for tyrosine-protein kinase RYK precursor (RYK), calbindin, and nitric oxide synthase (NOS) antibodies. Tissue sections were examined using a Nikon Eclipse E800 microscope with a Spot RT digital camera.

### Immunocytochemistry and Fluorescent Immunocytochemistry

The methods used for immunocytochemistry and fluorescent immunocytochemistry analyses of mouse tissue samples and human tissue specimens are described in Text S2.

### Western Blot Image Processing

Western blot membranes were exposed to films. After exposure, films were scanned at high resolution (1,200 dpi) using a regular scanner (Epson), and scans (tiff files) were opened into Photoshop and Western blot images processed using PowerPoint and Photoshop (Microsoft) for constructing final figures. Alternatively, Western blot membranes were scanned at high resolution (692 dpi) using a luminescent image analyzer (FUJIFILM LAS-4000), and scans (tiff files) were opened into ImageJ and Western blot images processed as previously mentioned for constructing final figures.

### Statistical Analysis

Statistical analysis of variance (ANOVA), *t* tests, and Welch's *t* tests were performed using Prism. One-way ANOVA was followed by correction for multiple testing by Tukey's Multiple Comparison Test. The statistical analysis of microarray data and statistical methods used for biological annotations are described in Text S2.

### Supporting Information

**Figure S1** Gene Ontology classification of genes specifically deregulated by expanded polyQ expression in nematode neurons (*Pmec-3* targets). Genes were classified based on their functional annotations in the GO categories “Biological Process,” “Molecular Function,” and “Cellular Component.” The number of genes is indicated. (TIF)

**Figure S2** Stable Fourier analysis modules containing genes up-regulated in 128Q nematode neurons (*Pmec-3* targets). The genes up-regulated (FDR < 0.01) in nematode neurons are indicated by green nodes. Node borders in purple and blue indicate down- and up-regulation ( $p < 0.01$ ) of the human best ortholog in the caudate nucleus of HD patients, respectively, as previously reported [29]. Square nodes indicate druggable genes [28]. The enrichment in GO annotations was generated using Gostat and enrichments considered significant for  $p < 0.001$ . Four modules described the extracellular matrix (Nos. 1–3, No. 5), three modules membrane proteins (Nos. 4–6), two modules the cytoskeleton (Nos. 7–8), nine modules the mitochondria (Nos. 9–13, 22–23, 26, 37), one module the golgi apparatus (No. 14), and five modules the nucleus (Nos.

15–20), with other modules corresponding to carbohydrate metabolism (Nos. 21–24), lipid metabolism (Nos. 25–27), chaperones (Nos. 37–39), and general metabolism (Nos. 28–36). Of note, module 40 contained components involved in signaling pathways (Wnt and TGF- $\beta$ ), axonal guidance, and cell cycle. (PDF)

**Figure S3** Stable Fourier analysis modules containing genes down-regulated in 128Q nematode neurons (*Pmec-3* targets). The genes down-regulated (FDR < 0.01) in nematode neurons are indicated by red nodes. Node borders in purple and blue indicate down- and up-regulation ( $p < 0.01$ ) of the human best ortholog in the caudate nucleus of HD patients, respectively, as previously reported ([29]; see [3]). Square nodes indicate druggable genes [28]. The enrichment in GO annotations was generated using Gostat and enrichments considered significant for  $p < 0.001$ . The modules obtained described extracellular components (Nos. 1–3), membrane (Nos. 4–10), transport (No. 11), nucleus (Nos. 13–15), calcium sensors (No. 21), metabolism (Nos. 16–19), and signal transducers such as neuropeptides and the Ras and hedgehog pathways (Nos. 23–28). (PDF)

**Figure S4** Fourier analysis module containing the Wnt, TGF- $\beta$ , and nonsense-mediated mRNA decay pathways (up-regulated module 40). Green nodes indicate up-regulated nematode genes with FDR < 0.01. Node borders in purple and blue indicate down- and up-regulation, respectively, of human homologs in HD caudate nucleus [29] with  $p < 0.01$ . Square shapes indicate druggable genes [28]. (TIF)

**Figure S5** Effects of overexpressing LIN-18 ICD at 40 ng/ $\mu$ l in polyQ/*lin-18* nematodes. Overexpressing LIN-18 ICD cDNA at 40 ng/ $\mu$ l in touch receptor neurons using the *mec-3* promoter abolishes the neuroprotective activity of *lin-18* LOF in 128Q nematodes. This effect showed a trend toward exacerbation of 128Q cytotoxicity but did not reach statistical significance relative to 128Q nematodes. Overexpressing LIN-18 ICD at 40 ng/ $\mu$ l produced cytotoxicity in 19Q nematodes. Two independent *lin-18* ICD extrachromosomal arrays (A1, A2) were tested per polyQ genotype. The expression of LIN-18 ICD cDNA was confirmed by RT-PCR for all of the arrays generated. EV, empty vector overexpression. Data are means  $\pm$  SEM (more than 200 animals tested). \* $p < 0.001$  compared to 19Q animals. ns, not significant. Significance was tested using one-way ANOVA, with correction for multiple testing by Tukey's Multiple Comparison Test. (TIF)

**Figure S6** Effects of Ryk siRNA treatment and Ryk-ICD overexpression on the detection of Ryk species by antibody anti-Ryk<sup>ICD</sup> in protein extracts from 109/109Q mouse striatal cells. Representative Western blot showing that Ryk siRNA treatment reduces the detection of full-length Ryk (Ryk FL), an effect accompanied by decreased Ryk mRNA levels as tested by qRT-PCR (left panel). Although the antibody anti-Ryk<sup>ICD</sup> does not detect endogenous levels of Ryk-ICD in these experiments, it detects Ryk-ICD when this Ryk fragment is overexpressed (Ryk-ICD O/E), with no signal detected for empty vector (right panel). (TIF)

**Figure S7** Ryk siRNA treatment decreases nuclear Ryk-ICD immunoreactivity in 109/109Q mouse striatal cells. (A) Representative confocal images showing the pattern of Ryk-ICD immunoreactivity in 109Q/109Q striatal cells upon scramble RNA or Ryk siRNA treatment as detected using the rabbit polyclonal antibody anti-Ryk<sup>ICD</sup>. The Ryk-ICD signals were

primarily detected in the nucleus, with weak signals detected in the cytoplasm. (B) Quantification of anti-Ryk<sup>ICD</sup> nuclear signals in 109Q/109Q striatal cells. Nuclear Ryk-ICD immunoreactivity was decreased by about 25% by Ryk siRNA treatments. Data are mean  $\pm$  SEM for the ratio Intensity/Area as detected in nuclei ( $n=3$  for a total of at least 90 cells analyzed), \*\*\* $p<0.0001$  compared to scramble RNA. Reduction of Ryk mRNA levels (mean reduction, 54%) was tested by qRT-PCR.

(TIF)

**Figure S8** Ryk is increased in the striatum of 140CAG HD mice. (A) Western blot analysis of Ryk expression in striatal protein lysates from 4-wk-old 140CAG homozygous mutant mice ( $n=3$ ). Using the N-terminal Ryk antibody Ab7577a without or with preincubation with blocking peptide BP7577a, two specific bands were detected, including one band corresponding to the full-length protein and a weaker band of ~28 kDa likely corresponding to a Ryk extracellular domain fragment (see comments in the Results section). (B) Densitometric analysis showed an increase of Ryk immunofluorescence from the striata of 8-mo-old 140CAG HD mice (lower panel) compared with controls (upper panel) ( $n=10$  per genotype), \* $p<0.04$ . Scale bar, 50  $\mu$ m. Significance was tested using one-way ANOVA. (C) Chronological immunohistochemical analysis of Ryk expression in the striatum of 140CAG mice. Left panels show example images for 140CAG mice at 1, 2, 4, 6, and 8 mo of age (a–e). Scale bar, 100  $\mu$ m. Right panels show example images for wild-type mice at 1, 2, 4, 6, and 8 mo (a\*–e\*). 140CAG mice show a significant age-dependent increase of Ryk levels at 2, 4, 6, and 8 mo of age. Data are means  $\pm$  SD with  $n=10$  in each group. \* $p<0.001$  compared to control. Significance was tested using one-way ANOVA, with correction for multiple testing by Tukey's Multiple Comparison Test.

(TIF)

**Figure S9** Ryk is increased in human HD caudate nucleus. Ryk immunofluorescence was assessed using the same Ryk antibody as in Figure S7. (A) Compared with age-matched controls (upper panel), Ryk immunofluorescence was increased in human caudate nucleus of grade 1/2 patients (lower panel). Densitometric analysis (right panel) showed increased Ryk protein levels in HD caudate nucleus (right) compared with controls (left) ( $n=6$  per group), \* $p<0.02$ . Scale bar, 50  $\mu$ m. Significance was tested using one-way ANOVA. (B) Selective Ryk expression in brain striata. Combined immunofluorescence showed that Ryk co-localized (white arrows) with calbindin (degenerating neurons) but not with NOS immunoreactivity (spared neurons) in caudate neurons in brains from HD patients. Some level of co-localization was detected in control brain striata. (C) Densitometric analysis showed a disease grade-dependent increase of RYK immunoreactivity in human HD caudate nucleus. Level of Ryk expression in control ( $n=5$ ), Grade 1 HD ( $n=4$ ), Grade 2 HD ( $n=5$ ), Grade 3 HD ( $n=5$ ), and Grade 4 HD ( $n=4$ ) samples. \* $p<0.05$  compared to control; \*\* $p<0.02$  compared to Grade 1 HD; \*\*\* $p<0.01$  compared to Grade 2 HD; \*\*\*\* $p<0.01$  compared to Grade 3 HD. Also shown are images of Ryk immunostaining. (a) Immunoreactivity of Ryk was low in the brain tissues of age-matched controls. (b–e) Increased Ryk immunoreactivity correlated with the degree of neuropathological severity (b, Control; c, Grade 1; d, Grade 2; e, Grade 3; f, Grade 4). Scale bar, 100  $\mu$ m. Significance was tested using one-way ANOVA, with correction for multiple testing by Tukey's Multiple Comparison Test.

(TIF)

**Figure S10** Partial co-localization of Ryk and GFAP immunofluorescence in Grade 4 HD caudate nucleus. Combined Ryk GFAP immunofluorescence shows co-localization with Ryk and

GFAP in both Grade 4 HD (HD G4) striatum and, to a much smaller degree, in normal age-matched (Control) specimens. Compared with age-matched control specimens (a–d), Ryk immunofluorescence was increased within astroglia from human caudate nucleus Grade 4 HD patients (e–f), but not on a one-to-one basis. Several Ryk immunofluorescence signals were observed in the GFAP-negative area (white arrows), and there are multiple glial figures without co-localized Ryk. Ryk immunofluorescence was assessed using the same Ryk antibody as in Figure S8. Scale bar, 20  $\mu$ m.

(TIF)

**Table S1** Genes deregulated in 19Q nematode cells versus control (GFP alone) cells. Forty-one worm genes were found to be deregulated. Most of them were down-regulated (34/41) and about a half of them encoded extracellular and catalytic proteins or were associated to membranes. Gene Ontology (GO) enrichment tests indicated that Pepsin A activity (GO:0004194) was enriched ( $p<0.01$ ). Among these 41 genes, six genes conserved in humans. Also shown are the best homologous genes in humans with their expression levels in the HD brain (caudate and cortex) versus control brains [29]. Human genes deregulated in HD caudate nucleus and cortex are labeled in orange and green, respectively ( $p<0.01$ ).

(PDF)

**Table S2** Genes deregulated in 128Q nematode cells versus 19Q nematode cells. We found 2,070 worm genes to be deregulated. Only 18 of the 2,070 genes were also deregulated in 19Q nematode cells versus GFP cells, including *pqm-48*, a lysosomal thiol reductase, and four nematode-specific genes encoding membrane proteins: *sg-64*, *nspb-2*, *nspb-5*, and *str-180*. Also found were nematode genes with no human homologs as inferred from Inparanoid [58], including a lectine (*lec-219*), innexin (*inx-4*), and xylosyltransferase enzyme (*xpw-6*). Among the 2,070 dysregulated genes, 516 genes are conserved in humans. Also shown are the best homologous genes in humans with their expression levels in HD brains (caudate and cortex) versus control brains [29]. Human genes deregulated in HD caudate nucleus and cortex are labeled in orange and green, respectively ( $p<0.01$ ).

(PDF)

**Table S3** GSEA of deregulated genes in nematode cells. For each enrichment category shown, gene sets are shown by increasing normalized enrichment score (NES) values. No enrichment was detected for 19Q cells. Enrichments were considered to be significant for FDR  $q$ -Val  $<0.25$  as previously described [59]. This analysis was performed using gene sets from wormbook<sup>\*</sup>, KEGG annotations<sup>§</sup>, and Gene Ontology annotations with<sup>#</sup> or without<sup>¶</sup> Inferred from Electronic Annotation.

(DOCX)

**Table S4** Pathways and processes enriched in genes specifically deregulated by 128Q expression as shown by GSEA.  $n$  is the count of genes found in the gene set enriched in deregulation versus the total Gene Set. \*Underlined are the genes deregulated in 128Q cells (FDR $<0.01$ ) or human HD caudate nucleus as previously reported [29] ( $p<0.01$ ) or both. \*\*%H is the percent of core genes with human homolog(s) as indicated by Inparanoid clusters. Gene sets are from Wormbook<sup>\*\*</sup>, KEGG annotations<sup>§</sup>, and Gene Ontology annotations with<sup>#</sup> or without<sup>¶</sup> Inferred from Electronic Annotation.

(DOCX)

**Table S5** RT-PCR analysis for hits of interest as emphasized by microarray data analysis.

(DOCX)

**Table S6** Pathways/processes highlighted by Fourier analysis and GSEA. (DOCX)

**Table S7** Putative *daf-16*/FOXO transcriptional targets that are also found in the transcriptomic signature of expanded-polyQ nematode touch cells. Data on putative *daf-16*/FOXO targets are from the studies of Murphy et al. [60], MacElwee et al. [61], and Oh et al. [62]. \*Microarray data. \*\*Chromatin immunoprecipitation data. \*\*\*Gene expression entropy was assessed using entropy-based feature selection as previously described [5] across 14 HD-associated conditions including the striatum of N-terminal htt transgenic mice R6/2 (at 6 wk and 12 wk) and D9-N171-98Q (a.k.a. DE5; at 14 mo) [63,64], full-length htt transgenic mice YAC128 (at 12 mo and 24 mo), knock-in mice CHL2 (at 22 mo) and HdH(Q92/Q92) (at 18 mo), caudate nucleus and BA4/BA9 cortex from post-mortem HD brains [29], blood samples from presymptomatic and symptomatic HD carriers [65], and HD-induced pluripotent stem (iPS) cells that were differentiated into neural stem cell (NSC) lines and that expressed 60 or 180 CAG repeats [66]. Most putative *daf-16* targets that are highly conserved in the mouse have moderate to high entropy values, suggesting that their behavior is significantly dependent on the HD-associated context (cell type, time requirement) in which they operate. NA, not applicable. (DOCX)

**Table S8** Names and genotypes of the *C. elegans* strains used in this study. (DOCX)

**Text S1** Supplementary materials and methods. (DOC)

**Text S2** Supplementary results. (DOC)

## References

- Kikis EA, Gidalevitz T, Morimoto RI (2010) Protein homeostasis in models of aging and age-related conformational disease. *Adv Exp Med Biol* 694: 138–159.
- Eijkelenboom A, Burgering BM (2013) FOXOs: signalling integrators for homeostasis maintenance. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14: 83–97.
- Salfin DA, Brunet A (2008) FoxO transcription factors in the maintenance of cellular homeostasis during aging. *Curr Opin Cell Biol* 20: 126–136.
- Neri C (2012) Role and therapeutic potential of the pro-longevity factor FOXO and its regulators in neurodegenerative disease. *Front Pharmacol* 3: 15.
- Parmentier F, Lejeune FX, Neri C (2013) Pathways to decoding the clinical potential of stress response FOXO-interaction networks for Huntington's disease: of gene prioritization and context dependence. *Front Aging Neurosci* 5: 22.
- Gil JM, Rego AC (2008) Mechanisms of neurodegeneration in Huntington's disease. *Eur J Neurosci* 27: 2803–2820.
- Parker JA, Arango M, Abderrahmane S, Lambert E, Tourette C, et al. (2005) Resveratrol rescues mutant polyglutamine cytotoxicity in nematode and mammalian neurons. *Nat Genet* 37: 349–350.
- Cohen E, Bieschke J, Perciavalle RM, Kelly JW, Dillin A (2006) Opposing activities protect against age-onset proteotoxicity. *Science* 313: 1604–1610.
- Essers MA, de Vries-Smits LM, Barker N, Polderman PE, Burgering BM, et al. (2005) Functional interaction between beta-catenin and FOXO in oxidative stress signaling. *Science* 308: 1181–1184.
- Parker JA, Vazquez-Manrique RP, Tourette C, Farina F, Offner N, et al. (2012) Integration of beta-catenin, sirutin, and FOXO signaling protects from mutant huntingtin toxicity. *J Neurosci* 32: 12630–12640.
- Inestrosa NC, Arenas E (2010) Emerging roles of Wnts in the adult nervous system. *Nat Rev Neurosci* 11: 77–86.
- Caricasole A, Bakker A, Copani A, Nicoletti F, Gaviraghi G, et al. (2005) Two sides of the same coin: Wnt signaling in neurodegeneration and neuro-oncology. *Biosci Rep* 25: 309–327.
- Carmichael J, Sugars KL, Bao Y, Rubinsztein DC (2002) GSK-3beta inhibitors prevent cellular polyglutamine toxicity caused by the Huntington's disease mutation. *J Biol Chem* 277: 313–319.
- Gines S, Ivanova E, Seong IS, Saura CA, MacDonald ME (2003) Enhanced Akt signaling is an early pro-survival response that reflects N-methyl-D-aspartate

## Acknowledgments

We thank Cheryl Wellington and Michael Hayden (University of British Columbia, Canada) for providing constructs encoding HTT with 128 Glns; Elena Cattaneo (University of Milano, Italy) for cell lines derived from HdH(Q111) mice; Marie-Françoise Chesselet, Nick Franish, and Vincent Lemesre (University of California, Los Angeles) for 140CAG mouse brain extracts; Lisa Ellerby (Buck Institute, CA) for the construct encoding FOXO3a; Anne Brunet (Stanford University, CA) for the FOXO3a antibody N1L; Karine Merienne (IGBMC, Illkirch, France) for the Pol2 antibody 7C2; Stéphane Le Crom and the Plateforme Transcriptome's team of ENS (Paris, France) for microarray analysis; Jean-François Gilles and the Cell Imaging and Flow Cytometry facility of the IFR 83 (Paris, France) for precious help in microscopy and image analysis; Céline Lefebvre (Institut Gustave Roussy, Villejuif, France) for advice on bioinformatics; and Aurélie Darbois and Cedric Biecp for technical assistance.

## Author Contributions

The author(s) have made the following declarations about their contributions: Conceived and designed the experiments: CT FF RV AP WL CN. Performed the experiments: CT FF RV JV AMO SH NO AP SM JK JL SHC KC CE OB KS AL. Analyzed the data: CT FF RV JV AP MH SS RJF WL CN. Contributed reagents/materials/analysis tools: MH SS JPV WL. Wrote the paper: CT SS RJF WL CN. Designed and conducted the experiments in nematodes and the analysis of microarray data and designed and conducted immunostaining assays in mouse cells: CT. Designed and conducted luciferase reporter assays, mouse cell viability assays, immunostaining assays, and co-immunoprecipitation assays: FF. Designed and conducted genetic analyzes in nematodes: RV AP. Conducted *C. elegans* assays, binding assays, luciferase reporter assays, and mouse cell viability assays: AMO JV SH NO SM. Conducted experiments in 293T cells: JL SHC. Conducted the experiments in the human HD and 140CAG mice brain tissue samples: JK KC OB CE KS. Conducted bioinformatic analyses: CT JPV. Conducted cell sorting: AL. Provided essential reagents and interpreted western blot patterns of Ryk expression: MH SS. Supervised the experiments in mice (140CAG) and HD brains: RJF. Supervised the experiments in 293T cells and provided essential materials: WL. Supervised the project: CN.

- receptor activation in Huntington's disease knock-in striatal cells. *J Biol Chem* 278: 50514–50522.
- Parker JA, Gonnolly JB, Wellington C, Hayden M, Dausset J, et al. (2001) Expanded polyglutamines in *Caenorhabditis elegans* cause axonal abnormalities and severe dysfunction of PLM mechanosensory neurons without cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 13318–13323.
- Lyu J, Yamamoto V, Lu W (2008) Cleavage of the Wnt receptor Ryk regulates neuronal differentiation during cortical neurogenesis. *Dev Cell* 15: 773–780.
- Zhong J, Kim HT, Lyu J, Yoshikawa K, Nakafuku M, et al. (2011) The Wnt receptor Ryk controls specification of GABAergic neurons versus oligodendrocytes during telencephalon development. *Development* 138: 409–419.
- Keeshle TR, Halford MM, Seaman C, Kee N, Macheda M, et al. (2006) The Wnt receptor Ryk is required for Wnt5a-mediated axon guidance on the contralateral side of the corpus callosum. *J Neurosci* 26: 5840–5848.
- Macheda ML, Sun WW, Kupathasan K, Hogan BM, Bower NL, et al. (2012) The Wnt receptor Ryk plays a role in mammalian planar cell polarity signaling. *J Biol Chem* 287: 29312–29323.
- Andre P, Wang Q, Wang N, Gao B, Schilit A, et al. (2012) The Wnt coreceptor Ryk regulates Wnt/planar cell polarity by modulating the degradation of the core planar cell polarity component Vangl2. *J Biol Chem* 287: 44518–44525.
- Hollis ER, 2nd, Zou Y (2012) Reinduced Wnt signaling limits regenerative potential of sensory axons in the spinal cord following conditioning lesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 14663–14668.
- Povinelli BJ, Nemeth MJ (2013) Wnt5a regulates hematopoietic stem cell proliferation and repopulation through the Ryk receptor. *Stem Cells* 32: 105–115.
- Trettel F, Rigamonti D, Hilditch-Maguire P, Wheeler VC, Sharp AH, et al. (2000) Dominant phenotypes produced by the HD mutation in STHdh(Q111) striatal cells. *Hum Mol Genet* 9: 2799–2809.
- Hickey MA, Kosmalska A, Enayati J, Cohen R, Zeitlin S, et al. (2008) Extensive early motor and non-motor behavioral deficits are followed by striatal neuronal loss in knock-in Huntington's disease mice. *Neuroscience* 157: 280–295.
- Lejeune FX, Mesrob L, Parmentier F, Biecp C, Vazquez-Manrique RP, et al. (2012) Large-scale functional RNAi screen in *C. elegans* identifies genes that regulate the dysfunction of mutant polyglutamine neurons. *BMC Genomics* 13: 91.

26. Lu W, Yamamoto V, Ortega B, Baltimore D (2004) Mammalian Ryk is a Wnt coreceptor required for stimulation of neurite outgrowth. *Cell* 119: 97–108.
27. Colavita A, Krishna S, Zheng H, Padgett RW, Culotti JG (1998) Pioneer axon guidance by UNC-129, a C. elegans TGF-beta. *Science* 281: 706–709.
28. Russ AP, Lampel S (2005) The druggable genome: an update. *Drug Discov Today* 10: 1607–1610.
29. Hodges A, Strand AD, Aragaki AK, Kuhn A, Sengstag T, et al. (2006) Regional and cellular gene expression changes in human Huntington's disease brain. *Hum Mol Genet* 15: 965–977.
30. Arango M, Holbert S, Zala D, Brouillet E, Pearson J, et al. (2006) CA150 expression delays striatal cell death in overexpression and knock-in conditions for mutant huntingtin neurotoxicity. *J Neurosci* 26: 4649–4659.
31. Berndt JD, Aoyagi A, Yang P, Anastas JN, Tang L, et al. (2011) Mindbomb 1, an E3 ubiquitin ligase, forms a complex with RYK to activate Wnt/beta-catenin signaling. *J Cell Biol* 194: 737–750.
32. Mojsilovic-Petrovic J, Nedelsky N, Boccitto M, Mano I, Georgiades SN, et al. (2009) FOXO3a is broadly neuroprotective in vitro and in vivo against insults implicated in motor neuron diseases. *J Neurosci* 29: 8236–8247.
33. Halford MM, Macheda ML, Parish CL, Takano EA, Fox S, et al. (2013) A fully human inhibitory monoclonal antibody to the Wnt receptor RYK. *PLoS ONE* 8: e75447. doi:10.1371/journal.pone.0075447
34. Cupers P, Orlans I, Craessaerts K, Annaert W, De Strooper B (2001) The amyloid precursor protein (APP)-cytoplasmic fragment generated by gamma-secretase is rapidly degraded but distributes partially in a nuclear fraction of neurons in culture. *J Neurochem* 78: 1168–1170.
35. Sastre M, Steiner H, Fuchs K, Capell A, Multhaup G, et al. (2001) Presenilin-dependent gamma-secretase processing of beta-amyloid precursor protein at a site corresponding to the S3 cleavage of Notch. *EMBO Rep* 2: 835–841.
36. Kegel KB, Sapp E, Alexander J, Reeves P, Bleckmann D, et al. (2010) Huntingtin cleavage product A forms in neurons and is reduced by gamma-secretase inhibitors. *Mol Neurodegener* 5: 58.
37. Hersch SM, Rossa HR, Ferrante RJ (2004) Neuropathology and pathophysiology of Huntington's disease. *Watts, RL and Koller, WC (eds), Movement disorders: neurologic principles and practice.* New York: McGraw-Hill: 503–523.
38. Landis JN, Murphy CT (2010) Integration of diverse inputs in the regulation of *Caenorhabditis elegans* DAF-16/FOXO. *Dev Dyn* 239: 1405–1412.
39. Renault VM, Rafalski VA, Morgan AA, Salih DA, Brett JO, et al. (2009) FoxO3 regulates neural stem cell homeostasis. *Cell Stem Cell* 3: 527–539.
40. Liu Y, Shi J, Lu CC, Wang ZB, Lyuksytova AL, et al. (2005) Ryk-mediated Wnt repulsion regulates posterior-directed growth of corticospinal tract. *Nat Neurosci* 8: 1151–1159.
41. Bovolenta P, Rodriguez J, Esteve P (2006) Frizzled/Ryk mediated signalling in axon guidance. *Development* 133: 4399–4408.
42. Zhang Z, Hartmann H, Do VM, Abramowski D, Sturchler-Pierrat C, et al. (1998) Destabilization of beta-catenin by mutations in presenilin-1 potentiates neuronal apoptosis. *Nature* 395: 698–702.
43. Francis R, McGrath G, Zhang J, Ruddy DA, Sym M, et al. (2002) *aph-1* and *pen-2* are required for Notch pathway signaling, gamma-secretase cleavage of betaAPP, and presenilin protein accumulation. *Dev Cell* 3: 85–97.
44. Webb AE, Pollina EA, Vierbuchen T, Urban N, Ucar D, et al. (2013) FOXO3 shares common targets with ASCL1 genome-wide and inhibits ASCL1-dependent neurogenesis. *Cell Rep* 4: 477–491.
45. Li X, Li YH, Yu S, Liu Y (2008) Upregulation of Ryk expression in rat dorsal root ganglia after peripheral nerve injury. *Brain Res Bull* 77: 178–184.
46. Liu Y, Wang X, Lu CC, Kerman R, Steward O, et al. (2008) Repulsive Wnt signaling inhibits axon regeneration after CNS injury. *J Neurosci* 28: 8376–8382.
47. Brenner S (1974) The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77: 71–94.
48. Parker JA, Metzler M, Georgiou J, Mage M, Roder JC, 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: 11056–11064.
49. Vazquez-Manrique RP, Nagy AI, Legg JC, Bales OA, Ly S, et al. (2008) Phospholipase C-epsilon regulates epidermal morphogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet* 4: e1000043.
50. Duerr JS (2006) Immunohistochemistry. *WormBook*: 1–61.
51. Zhang Y, Ma C, Delohery T, Nasipak B, Foat BC, et al. (2002) Identification of genes expressed in C. elegans touch receptor neurons. *Nature* 418: 331–335.
52. Gauthier LR, Charrin BC, Borrell-Pages M, Dompierre JP, Rangone H, et al. (2004) Huntingtin controls neurotrophic support and survival of neurons by enhancing BDNF vesicular transport along microtubules. *Cell* 118: 127–138.
53. Miller JP, Holcomb J, Al-Ramahi I, de Haro M, Gafni J, et al. (2010) Matrix metalloproteinases are modifiers of huntingtin proteolysis and toxicity in Huntington's disease. *Neuron* 67: 199–212.
54. Lyu J, Wesselschmidt RL, Lu W (2009) Cdc37 regulates Ryk signaling by stabilizing the cleaved Ryk intracellular domain. *J Biol Chem* 284(19): 12940–12948.
55. Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, et al. (1999) Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96: 857–868.
56. Menalled LB, Sison JD, Dragatsis I, Zeitlin S, Chesselet MF (2003) Time course of early and neuropathological anomalies in a knock-in mouse model of Huntington's disease with 140 CAG repeats. *J Comp Neurol* 465: 11–26.
57. Vonsattel JP, Myers RH, Stevens TJ, Ferrante RJ, Bird ED, Richardson EP Jr (1983) Neuropathological classification of Huntington's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 44: 559–577.
58. Remm M, Storm CE, Sonnhammer EL (2001) Automatic clustering of orthologs and in-paralogs from pairwise species comparisons. *J Mol Biol* 314: 1041–1052.
59. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, 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: 15545–15550.
60. Murphy CT, McCarroll SA, Bargmann CI, Fraser A, Kamath RS, et al. (2003) Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 424: 277–283.
61. McElwee J, Bubb K, Thomas JH (2003) Transcriptional outputs of the *Caenorhabditis elegans* forkhead protein DAF-16. *Aging Cell* 2: 111–121.
62. Oh SW, Mukhopadhyay A, Dixit BL, Raha T, Green MR, et al. (2006) Identification of direct DAF-16 targets controlling longevity, metabolism and diapause by chromatin immunoprecipitation. *Nat Genet* 38: 251–257.
63. Kuhn A, Goldstein DR, Hodges A, Strand AD, Sengstag T, et al. (2007) Mutant huntingtin's effects on striatal gene expression in mice recapitulate changes observed in human Huntington's disease brain and do not differ with mutant huntingtin length or wild-type huntingtin dosage. *Hum Mol Genet* 16: 1845–1861.
64. Thomas EA, Coppola G, Tang B, Kuhn A, Kim S, et al. (2011) In vivo cell-autonomous transcriptional abnormalities revealed in mice expressing mutant huntingtin in striatal but not cortical neurons. *Hum Mol Genet* 20: 1049–1060.
65. Borovecki F, Lovrecic L, Zhou J, Jeong H, Then F, et al. (2005) Genome-wide expression profiling of human blood reveals biomarkers for Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 11023–11028.
66. The HD iPSC Consortium (2012) Induced pluripotent stem cells from patients with Huntington's disease show CAG-repeat-expansion-associated phenotypes. *Cell Stem Cell* 11: 264–278.

# Discussion

Dans ce papier, nous avons pu établir un modèle unique dans lequel anomalies des voies neurodéveloppementales et déficit précoce de la réponse au stress cellulaire chronique sont deux phénomènes liés au cours du déclin neuronal dans la MH.

Dans un modèle *C. elegans* de dysfonction neuronale (128Q) (Parker et al., 2001b) développé dans le laboratoire, l'analyse de données transcriptomiques à partir de cellules neurales purifiées et l'intégration de ces données avec celles issues d'une étude RNAi chez les nématodes 128Q (Lejeune et al., 2012) et des données transcriptomiques chez la souris et chez l'Homme, suggèrent que le dysfonctionnement de voies développementales comme la voie Wnt est particulièrement importante dans la MH. Il est un fait que la voie de signalisation Wnt régule plusieurs processus du développement, y compris la différenciation synaptique, ainsi que la neurogenèse adulte (Inestrosa and Arenas, 2009). Dans une étude sur la toxicité des oligomères A $\beta$ , l'activation des voies canoniques et non-canoniques de Wnt peut être neuroprotectrice (Inestrosa and Arenas, 2009). Précédemment, nous avons aussi montré qu'il en va de même pour la voie de signalisation FOXO3 (Parker et al., 2005), qui est importante pour la survie cellulaire et la longévité ainsi que pour le maintien et l'homéostasie des cellules souches (Landis and Murphy, 2010; Gopinath et al., 2014).

Nous avons constaté une augmentation de Ryk, dans les neurones polyQ mutants chez le nématode. Cette augmentation réprime la capacité neuroprotectrice de FOXO3 mettant en évidence une situation pathologique dans laquelle les voies Wnt et FOXO3 interagissent et conduisent à un dysfonctionnement neuronal et à la neurodégénérescence. Il a été montré que Ryk peut réguler la croissance des neurites (Liu et al., 2005), en activant la transcription de TCF suite à sa liaison avec Frizzled (FZD) et Dishevelled (DSH) (Lu et al., 2004). Ceci a soulevé la possibilité que Ryk puisse réprimer l'activité de FOXO via la modification de la voie canonique Wnt/ $\beta$ -caténine. En effet, en plus de sa capacité à activer la voie de polarité planaire dans les cellules (PCP) (Andre et al., 2012; Macheda et al., 2012), la protéine Ryk peut également, au travers d'une autre voie non-canonique, induire la translocation nucléaire de son domaine intracellulaire (Ryk-ICD) qui est requis pour la neurogenèse corticale (Lyu et al., 2008b).

Nos résultats ont permis de préciser un nouveau mécanisme qui implique la répression de l'activité neuroprotectrice de FOXO3 par l'augmentation de Ryk dans les neurones 128Q mutants, intervenant à la suite de la translocation nucléaire du fragment Ryk-ICD. En effet, nos données indiquent nettement que 1) le fragment Ryk-ICD peut être suffisant pour moduler l'activité transcriptionnelle de FOXO3 dans les cellules striatales, 2) que le fragment

*lin-18/Ryk-ICD* est suffisant pour réprimer les effets neuroprotecteurs liés à la perte de fonction de *lin 18-Ryk* dans les neurones chez *C. elegans*; et que 3) le fragment Ryk-ICD peut se lier à la  $\beta$ -caténine. La  $\beta$ -caténine est une protéine de survie (Gines et al., 2003b; Essers et al., 2005b) co-activatrice de FOXO3 (Essers et al., 2005b) et protège les cellules contre les premières phases de la cytotoxicité dans les mutants 128Q (Parker et al., 2012b). On observe un effet fonctionnel réciproque entre le fragment Ryk-ICD et la  $\beta$ -caténine dans la modulation de la cytotoxicité induite par le fragment Ryk-ICD. Ces données soutiennent la possibilité que des quantités anormalement élevées de Ryk-ICD peuvent empêcher l'activité normale de la  $\beta$ -caténine.

D'autre part, l'idée de la toxicité du fragment Ryk-ICD est appuyée par nos données qui lient Ryk et la Préséniline 1, un des éléments du complexe gamma-sécrétase qui est impliqué dans la neurogenèse corticale (Lyu et al., 2008b). La Préséniline 1 perturbe la viabilité des cellules striatales mutantes, et nous avons montré qu'il existe une augmentation des niveaux endogènes du fragment Ryk-ICD dans le noyau de ces cellules (Tourette et al., 2014b). L'ensemble de ces observations souligne que le fragment Ryk-ICD apparaît comme le médiateur des effets toxiques de l'augmentation de Ryk-ICD tout en sachant qu'un lien a déjà été établi entre la Préséniline 1 et la maladie d'Alzheimer (Berezovska et al., 2005). Le fragment Ryk-ICD est impliqué dans le processus pathologique de la MH. En effet, il a une action sur la protéolyse de la HTT et la production de différents fragments N-terminaux (Kegel et al., 2010), ce qui nous laisse suggérer que le complexe gamma-sécrétase peut aussi avoir un rôle dans la régulation de la réponse au stress cellulaire dans la MH. Il est intéressant de voir que le gène *aph-1* (une sous-unité du complexe gamma-sécrétase et l'homologue du gène APH-1B humain chez *C. elegans*) (Francis et al., 2002), peut être augmenté dans les cellules qui expriment la huntingtine mutée, ce qui pourrait potentialiser la toxicité de la voie Ryk-ICD. L'expression de Ryk est également augmentée dans les modèles de lésion du SNC, ce qui va de concert avec les études montrant l'inhibition de la régénération axonale par la signalisation Wnt (Li et al., 2008).

Au vu de ces résultats, il aurait été intéressant de considérer le récepteur Ryk comme une potentielle cible thérapeutique. Cependant, des données du laboratoire montrent que l'effet toxique du fragment Ryk-ICD serait indépendant des ligands Wnt dans la mesure où la perturbation de ces ligands ne modifie pas les niveaux nucléaires de Ryk-ICD. De plus, les anticorps dirigés contre Ryk et plus particulièrement le fragment toxique Ryk-ICD s'avèrent peu efficaces et peu spécifiques. D'autres voies peuvent être explorées, notamment l'inhibition du complexe gamma-sécrétase. En effet de nombreuses études ciblent ce complexe pour des essais cliniques dans la maladie d'Alzheimer. Cependant, ces études montrent qu'aucun des inhibiteurs du complexe gamma-sécrétase s'est avéré être

pleinement efficace et ces études mettent en avant l'importance du rôle physiologiques des gamma-sécrétases et des présénilines dans la progression de la maladie d'Alzheimer (Tan et al., 2016).

La surexpression précoce de Ryk avant la pathologie dans les nématodes 128Q, l'augmentation du niveau d'ARN messager et du niveau protéique de Ryk dans les cellules murines striatales, et la répression transcriptionnelle de FOXO3, régulateur central de survie cellulaire et longévité par Ryk-ICD, suggèrent que l'inhibition de la voie Ryk-ICD peut avoir un potentiel thérapeutique dans la MH.

Indépendamment d'une éventuelle contribution d'autres mécanismes, nos résultats appuient un modèle dans lequel le fragment Ryk-ICD présente un gain de propriété neurotoxique en modifiant l'activité protectrice du complexe  $\beta$ -caténine/FOXO. Ces données mettent en évidence un processus pathologique dans lequel les voies neurologiques du développement peuvent être modifiées au cours des premières étapes du processus pathogène des maladies neurodégénératives en réprimant la réponse au stress cellulaire et les mécanismes de "longévité neuronale" tels que ceux contrôlés par FOXO3 et ses co-facteurs. Les neurones semblent incapables de développer une réponse au stress efficace. Cela suggère que la restauration à un stade précoce de la capacité de résistance des neurones par la stimulation des réseaux de gène et des mécanismes qui sont sous le contrôle de FOXO3 pourrait efficacement retarder le processus pathogénique de la MH.

Basée sur ces observations, la suite de ce travail est axée sur l'étude des mécanismes qui peuvent sous-tendre le rôle pathologique de la voie Ryk-ICD/FOXO3 dans la MH. En outre, tester comment un excès du fragment Ryk-ICD pourrait perturber le complexe  $\beta$ -caténine/FOXO3 et identifier des cibles transcriptionnelles de FOXO3 qui peuvent être dépendantes de Ryk et/ou de la mHTT et ainsi comprendre comment sont influencés les mécanismes de longévité dans les neurones ainsi que la pathogénèse de la MH.

Le statut de la dérégulation de la plupart des gènes cibles de FOXO3 semble être fortement dépendant du contexte (Neri, 2012; Webb et al., 2013a), d'où notre choix de travailler sur des cellules progénitrices neurales humaines afin de rester dans un environnement attestant des phases précoces de la MH.

## **PARTIE III : Etudes des cibles transcriptionnelles de FOXO3**

# Introduction

La voie Ryk-ICD/ $\beta$ -caténine/FOXO3 apparaît donc comme un élément clé pour la neuroprotection chez *C.elegans* et dans les cellules striatales de souris. FOXO3 lui-même a des effets protecteurs contre la protéotoxicité induite par des protéines mutées dans de nombreuses maladies neurodégénératives tels que la huntingtine (Kannike et al., 2014), l'alpha-synucléine (Pino et al., 2014) et le peptide précurseur de l'amyloïde (Shi et al., 2016). Dans la MH cet effet peut être perturbé par l'augmentation du fragment Ryk-ICD dans les cellules, qui en se liant à la  $\beta$ -caténine, modifie l'activité transcriptionnelle de FOXO3; l'interaction de FOXO3 avec son co-facteur, la  $\beta$ -caténine étant altérée.

Au regard de ces informations, nous avons voulu comprendre comment le complexe  $\beta$ -caténine/FOXO3 pouvait être perturbée par la voie non-canonique Ryk-ICD dans la MH et surtout de dégager un dynamisme des cibles transcriptionnelles directes de FOXO3 (F3T) qui sont perturbées par une signalisation Ryk-ICD anormale dans des cellules souches neurales exprimant la HTT mutée.

Dans un premier temps nous avons étudié l'interaction entre le complexe  $\beta$ -caténine/FOXO3 et le fragment Ryk-ICD et nous avons pu mettre en évidence que ces trois protéines formaient un complexe tripartite. Il semblerait que le fragment Ryk-ICD ne fait pas pleinement compétition avec FOXO3 pour la  $\beta$ -caténine mais pourrait éventuellement déplacer FOXO3 de son site de liaison à la  $\beta$ -caténine par encombrement stérique; ou alors, on peut supposer que la liaison de Ryk sur la  $\beta$ -caténine entrainerait également la liaison d'un autre partenaire qui perturberait l'activité transcriptionnelle de FOXO3. Il apparaît donc que le fragment Ryk-ICD fait partie du complexe FOXO3/  $\beta$ -caténine et qu'il agit comme un modulateur de l'activité transcriptionnelle de FOXO3 en perturbant sa liaison avec la  $\beta$ -caténine. Pour en comprendre les effets physiologiques, nous nous sommes intéressés aux cibles transcriptionnelles de FOXO3.

L'étude des cibles transcriptionnelles de FOXO3 est un grand sujet de recherche ces dernières années au vu de son implication dans de nombreux processus cellulaires tels que la survie, la régulation du cycle cellulaire, et récemment le maintien des pools de cellules souches. La méta-analyse réalisée par Webb et collègues (Webb et al., 2016) au travers d'un ensemble de données issues de modèles souris, humains, drosophiles et nématodes, donne un aperçu de l'évolution du réseau FOXO et met en évidence des gènes et cofacteurs qui peuvent être particulièrement importants pour la fonction de facteurs de transcription FOXO dans l'homéostasie et la longévité chez l'adulte.

Les cibles de FOXO3 sont relativement bien connues dans les modèles souris, nématodes et drosophiles, cependant chez l'Homme, même si l'intérêt pour ces cibles est grandissant, elles sont encore peu répertoriées, notamment inconnues dans les cellules neurales d'origine humaine.

Nous avons donc étudié les cibles directes de FOXO3 dans un modèle de la maladie basée sur l'utilisation de cellules souches neurales humaines (NSC-MH, et leur contrôle isogénique "NSC-contrôle". Nous avons séquencé les ARN messagers (RNA-seq) et les sites de liaison de FOXO3 à l'ADN (ChIP-seq), dans les NSC-MH ou les NSC contrôle, avec ou sans inhibition de l'expression du gène *RYK*. L'analyse de ces cibles montre que l'inhibition de l'expression du gène *RYK* (par siRNA) augmente considérablement le nombre de cibles directes de FOXO3 dans les NSC-MH en comparaison des cellules NSC-contrôle. Il apparaît aussi au travers de l'analyse des sites de liaison que cet effet n'est pas directement corrélé avec une augmentation de la liaison de FOXO3 sur les régions promotrices ou amplificatrices. Nous avons aussi observé que, malgré le grand nombre de cibles gagnées ou perdues dans les NSC-MH, seule une petite fraction de ces gènes est pleinement dépendante de Ryk, à la fois dans les cellules NSC-MH et les cellules NSC-contrôle. De plus, la combinaison des analyses RNA-seq et ChIP-seq et les analyses de motifs de liaison montrent que les motifs de type *Forkhead* sont effectivement retrouvés dans tous les génotypes étudiés.

A partir de critères basés sur la force des effets et la densité de ces effets sur les cartes d'annotation fonctionnelle, nous avons mis en évidence un groupe de gènes cibles de FOXO3 dépendante de Ryk qui présenterait un intérêt particulier dans la maintenance du pool de cellules souches en outre.

L'ensemble de ces données apportent de nouvelles informations sur la régulation de FOXO3 et de ses cibles transcriptionnelles qui pourraient réguler le stock de cellules souches pendant le développement. Ces nouveaux éléments nous donnent de nouvelles voies à explorer pour la compréhension des mécanismes perturbés dans les phases précoces de la maladie de Huntington, la question étant de savoir si ces effets persistent en tout ou en partie dans les neurones différenciés, une question abordée par la différenciation des NSCs en neurones DARP32 positifs, et dans le cerveau adulte, en l'occurrence dans les modèles souris, un aspect abordé dans le laboratoire au travers de l'intégration mathématique et informatique des données Huntington.

## Article 2:

### Reprogramming of FOXO3 targets in Huntington's disease neural stem cells alters the regulation of cell cycle and neuronal differentiation genes

**Jessica Voisin**<sup>1,2</sup>, Francesca Farina<sup>1,2</sup>, Satish Sasidharan Nair<sup>1,2</sup>, François-Xavier Lejeune<sup>1,2</sup>, Jacques Boddaert<sup>1,2,3</sup>, Lisa Ellerby<sup>4</sup> and Christian Neri<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup> CNRS, UMR 8256, Laboratory of Neuronal Cell Biology & Pathology and University Hospital Department Fight Aging and Stress (DHU FAST), Paris, France, <sup>2</sup> Sorbonnes Universités, University Pierre and Marie Curie (UPMC) Univ Paris 06, Paris, France, <sup>3</sup> AP-HP, Pitié-Salpêtrière Hospital, Geriatrics, Paris, France, <sup>4</sup> Buck Institute for Aging Research, Novato, CA,

# Reprogramming of FOXO3 targets in Huntington's disease neural stem cells alters the regulation of genes involved in cell cycle and neuronal differentiation

Jessica Voisin<sup>1,2</sup>, Francesca Farina<sup>1,2</sup>, Satish Sasidharan Nair<sup>1,2</sup>, François-Xavier Lejeune<sup>1,2</sup>, Jacques Boddaert<sup>1,2,3</sup>, Lisa Ellerby<sup>4</sup> and Christian Neri<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>CNRS, UMR 8256, Laboratory of Neuronal Cell Biology & Pathology and University Hospital Department Fight Aging and Stress (DHU FAST), Paris, France, <sup>2</sup>Sorbonnes Universités, University Pierre and Marie Curie (UPMC) Univ Paris 06, Paris, France, <sup>3</sup>AP-HP, Pitié-Salpêtrière Hospital, Geriatrics, Paris, France, <sup>4</sup>Buck Institute for Aging Research, Novato, CA,

\*Correspondence: christian.neri@inserm.fr

## Abstract

The stress response and transcription factor FOXO3 has neuroprotective effects in several models of neurodegenerative diseases, including Huntington's disease (HD). However, how FOXO3 precisely regulates cellular homeostasis in neurodegenerative diseases such as HD remains unknown. Additionally, FOXO3 neuroprotection is repressed during the earliest phases of the HD process by abnormal and non-canonical signaling from the Wnt receptor Ryk. This is mediated by increased nuclear amounts of the Ryk intracellular domain (Ryk-ICD), a cleavage product that binds to  $\beta$ -catenin, a FOXO3 co-factor, and how this impacts on FOXO3 gene regulation also remains unknown. Here, we found that Ryk-ICD is able to form a protein complex together with  $\beta$ -catenin and FOXO3, suggesting that Ryk-ICD signaling may act as a co-regulator of FOXO3 transcriptional activity. In support of this model, we found that FOXO3 direct targets (F3T) are reprogrammed in human HD (19Q/72Q) neural stem cells (NSCs), which involves losses or gains of F3Ts in neuronal differentiation and cell growth pathways, a phenomenon that is partially corrected back to normal by Ryk silencing. This noticeably applies to genes that are important for the regulation of cell proliferation and DNA damage repair such as the regulators of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16<sup>INK4a</sup>, a key activator of cellular senescence and regulator of stem cell dynamics. Together, these results show that the FOXO3 target repertoire is significantly altered in human HD NSCs, raising the possibility that FOXO3 can modify the growth and senescence status of neural stem cells in response to mutant huntingtin at early developmental time points in HD.

## Introduction

The FOXO (Forkhead Box O) family of transcription factors is central to the regulation of stress response and maintenance of cell survival in several organisms and cell types (Salih and Brunet, 2008). FOXO factors such as *C. elegans daf-16* may also have pro-longevity effects (Lee et al., 2003) and single nucleotide polymorphisms in the FOXO3a gene have been associated to longevity in human centenarians (Flachsbart et al., 2009; Li et al., 2009b). Additionally, FOXO factors such as DAF-16 and FOXO3 have protective effects against the cytotoxicity of several neurodegenerative disease proteins including huntingtin (*HTT*) (Parker et al., 2012b; Tourette et al., 2014a), SOD1 and p150(glued) (Mojsilovic-Petrovic et al., 2009), alpha-synuclein (Pino et al., 2014) and A $\beta$  (Cohen et al., 2009), suggesting that FOXO gene regulation is an important mechanism for cells to compensate for the biological consequences of proteotoxic stress in neurodegenerative diseases. However, although FOXO3 gene regulation has been studied in multiple cell types and organisms (Webb et al., 2016), the transcriptional targets that could be specifically engaged by FOXO3 in response to proteotoxic stress in neurodegenerative diseases are unknown. Additionally, whether FOXO factors may be fully able to achieve neuroprotection in neurodegenerative diseases has remained unclear. In Huntington's disease (HD), the neuroprotective effects of FOXO3 are repressed during early developmental time points by increased mRNA expression and protein levels of Ryk, a Wnt receptor that is important to axon guidance and neurogenesis (Lyu et al., 2008a; Andre et al., 2012; Blakely et al., 2013). Increase of Ryk, a phenomenon that is likely part of the widespread effects of mutant HTT on gene expression (Kuhn et al., 2007; Langfelder et al., 2016), leads to increased levels of the intracellular domain of Ryk (Ryk-ICD) in the nucleus where it can impair the capacity of FOXO3 to activate gene transcription as indicated by using luciferase assays (Tourette et al., 2014a). This may involve binding of the Ryk-ICD fragment to  $\beta$ -catenin, a FOXO3 co-factor that is important to FOXO3 regulation of oxidative stress response and gene transcription (Essers et al., 2005a) and that has neuroprotective effects during the early phases of HD pathogenesis, before cell death (Parker et al., 2012b). To understand how the Ryk-ICD pathway in mutant HTT expressing cells may alter the activity of the  $\beta$ -catenin/FOXO3 complex, we tested whether the Ryk-ICD fragment may normally belong to this complex. In complement, we used RNA-seq and FOXO3 ChIP-seq profiling to determine how FOXO3 gene regulation may be altered in mutant huntingtin expressing cells and whether this could be dependent on Ryk signaling. To this end, we used a human and isogenic induced pluripotent stem cell (iPSC)/neural stem cell (NSC) model of neurodevelopmental alteration in HD (An et al., 2012b; Ring et al., 2015).

We found that the Ryk-ICD fragment co-immunoprecipitates with  $\beta$ -catenin and FOXO3, raising the possibility that the Ryk-ICD fragment may normally act as a co-factor of FOXO3 transcriptional activity and could alter the homeostasis of the FOXO3/ $\beta$ -catenin complex to impact on FOXO3 gene regulation when it is in excess in the cell, as observed during the differentiation of

mutant *HTT* expressing neurons (Tourette et al., 2014a). In support of this model, we found that the size of the FOXO3 target repertoire is greatly enlarged upon silencing Ryk in normal *HTT* human NSCs, an effect unrelated to a change of FOXO3 binding at gene promoters and enhancers. We also found that the FOXO3 target repertoire is significantly modified in human HD NSCs, with losses and gains of FOXO3 targets (F3T) that are involved in neuronal differentiation, synaptic homeostasis, apoptosis and cell cycle regulation. These effects are accompanied by increased FOXO3 binding to chromatin in human HD cells and partially corrected back to normal upon silencing Ryk in these cells. Interestingly, F3Ts that are either lost or gained in a Ryk-dependent manner are predicted to change the regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16<sup>INK4a</sup>, a key regulator of cellular senescence and inhibitor of cell cycle in response to DNA damage (Baker et al., 2016). Our results show that FOXO3 gene regulation is significantly reprogrammed in human HD NSCs compared to control NSCs, which may noticeably alter a series of target genes that are engaged in the regulation of cell proliferation and neuronal differentiation. These data provide a resource to understand how this phenomenon may impact on the integrity, proliferation and differentiation of neural stem cell pools in response to the HD protein.

## Results

### **The Ryk-ICD fragment co-immunoprecipitates together with $\beta$ -catenin and FOXO3.**

We previously reported that increased nuclear amounts of the Ryk-ICD fragment in mutant Htt mouse striatal cells may repress FOXO3 neuroprotection and transcriptional activity, an effect that may be mediated by Ryk-ICD binding to the FOXO3 co-factor  $\beta$ -catenin (Tourette et al., 2014a), a FOXO3 co-factor that also has neuroprotective effects in models of the early phases of the pathogenic process in HD (Parker et al., 2012b). To determine the mode of action by which an excess of the Ryk-ICD may alter FOXO3 transcriptional activity, we performed co-immunoprecipitation assays in HEK293T cells. These assays involved the overexpression of a Myc-tagged Ryk-ICD fragment as cells normally produce relatively small amounts of this gamma-secretase cleavage product (Tourette et al., 2014a). The Myc-tagged Ryk-ICD fragment co-precipitates with  $\beta$ -catenin when endogenous FOXO3 is used as a bait (Figure 1A). Additionally, the Myc-tagged Ryk-ICD fragment co-precipitates with FOXO3 when endogenous  $\beta$ -catenin is used as a bait (Figure 1B). Together, these results suggest that the Ryk-ICD fragment may normally be an integral part of the  $\beta$ -catenin/FOXO3 complex.

### **FOXO3 direct targets are reprogrammed in Huntington's disease human neural stem cells and this is partially dependent on Ryk**

Binding between  $\beta$ -catenin, Ryk-ICD and FOXO3 (Figure 1) raises the possibility that the Ryk-ICD fragment may normally participate in the regulation of FOXO3 transcriptional activity and that increased nuclear amounts of Ryk-ICD in mutant huntingtin cells (Tourette et al., 2014a) could impair the homeostasis of the  $\beta$ -catenin/Ryk-ICD/FOXO3 complex and modify FOXO3 gene regulation. If both possibilities are true, then reducing Ryk expression might (i) change the F3T repertoire in normal cells without impacting on other features of FOXO3 gene regulation such as FOXO3 occupancy at gene promoters and enhancers and (ii) change the F3T repertoire in HD cells, potentially suppressing some of the changes in FOXO3 gene regulation that are induced by mutant huntingtin in these cells. To test for these hypotheses, we used massively paralleled RNA sequencing (RNA-seq) complemented by genome-wide chromatin immunoprecipitation followed by sequencing (ChIP-seq) in order to identify the direct targets of FOXO3 (F3Ts) and explore how F3Ts might be changed by mutant huntingtin expression or Ryk silencing, or both. To test for this in human cells at early developmental time points in HD, *i.e.* the phases at which Ryk expression is increased (Tourette et al., 2014a), we performed these studies using a human isogenic induced pluripotent stem cell (iPSC) model of HD pathogenesis, namely human stem cells that express mutant (72Q/19Q) *HTT* or control (CAG-corrected) *HTT* (21Q/19Q) (An et al., 2012b; Ring et al., 2015). These cells were differentiated into neural stem cells (NSCs) followed by Ryk siRNA or scramble RNA treatment. RNA-seq and FOXO3 ChIP-seq data were then collected upon inducing FOXO3 into the nucleus (see Methods).

Silencing of Ryk and nuclear induction of FOXO3 was validated prior to and verified in the course of these experiments (Figure S1). Although FOXO3 gene regulation may proceed through promoters, a significant part of this activity may proceed through enhancer regions (Eijkelenboom et al., 2013b). Specifically, previous reports indicate that statistical association between FOXO3 binding and gene regulation may be observed up to 20 kb around transcriptional start sites in human cells (Eijkelenboom et al., 2013a). FOXO3 direct targets are thus defined herein as to genes that (i) show FOXO3 binding throughout promoter and enhancer regions ( $\pm 20$  kb) as indicated by ChIP-seq data and (ii) are up- or down-regulated upon FOXO3 induction into the nucleus as indicated by RNA-seq data (Table S1). We observed that FOXO3 binding is increased in human HD cells (Figure 2A) and that FOXO3 binding loci can be specifically detected in either normal or HD cells (Figure 2B). The integration of FOXO3-binding and RNA-seq data shows two major phenomena. Firstly, the F3Ts repertoire is changed in human HD versus CAG-corrected NSCs (Figure 3A). This effect is accompanied by increase of the proportion of genes with FOXO3 binding ( $\pm 20$  kb) (Figure 3B, left panel) as well as FOXO3 binding levels at individual gene loci (Figure 3B, right panel), suggesting that FOXO3 occupancy may be facilitated in human HD cells. Secondly, Ryk silencing greatly increases the number of F3Ts in normal *HTT* cells (Figure 3A), an effect that is not accompanied by a significant change of FOXO3 binding (Figure 3B, right panel). Silencing Ryk in human HD NSCs also increases the number of F3Ts, however to a much lower extent compared to the effect of

silencing Ryk in CAG-corrected NSCs, and this again is unrelated to a change of FOXO3 binding (Figure 3B, right panel), suggesting that Ryk signaling may normally function as a co-repressor of FOXO3 transcriptional activity. However, silencing Ryk in CAG-corrected NSCs may also result in the loss of F3Ts, and this applies equally to F3Ts that are positively or negatively regulated by FOXO3 in these cells (Table S2, as extracted from Table S1). Additionally, the increase of FOXO3 occupancy detected in human HD NSCs is true for the F3Ts that are gained in these cells (Table S3, as extracted from Table S1) as well as those that are conserved (Table S4, as extracted from Table S1) between human HD and control NSCs. Therefore, it appears that Ryk signaling may function as a co-repressor or co-activator of FOXO3 transcriptional activity with discrete effects on the F3T repertoire that depend on the cellular context, *i.e.* cells with normal (19Q/21Q) or heterozygous mutant (19Q, 72Q) *HTT* genotype. Noticeably, the number of F3Ts that are dependent on Ryk in both normal and HD NSCs — a group of genes of particular interest as they are likely to be highly sensitive to the effects of the Ryk-ICD fragment on the homeostasis of the  $\beta$ -catenin/FOXO3 complex — is relatively small, reaching a total of 54 genes (Figure 3C). Collectively, these results suggest that the F3T repertoire is reprogrammed in HD during neurogenesis, at the NSC stage (Figure 3C). These results also suggest that the underlying cause for reprogramming of F3Ts in human HD NSCs cannot be fully attributed to a higher FOXO3 occupancy as this is a general phenomenon that encompasses all types of F3Ts (conserved, lost, gained) in these cells. Other mechanisms may be involved such as abnormal intracellular signaling onto FOXO3, as suggested by the existence of F3Ts that are fully dependent on Ryk signaling in both human HD and normal NSCs.

### **FOXO3 binding sites are enriched for candidate co-regulator motifs that are shared across *HTT* genotypes or unmasked in human HD neural stem cells.**

Several studies have suggested that FOXO gene regulation may involve other transcription factors, which could function synergistically or antagonistically with FOXO proteins (Webb et al., 2013b; Webb et al., 2016). However, how this could apply to human NSCs and whether this can be altered by the expression of proteotoxic proteins such as mutant huntingtin remains unknown. To identify candidate FOXO3 co-factors in human NSCs with or without expression of a mutant *HTT* allele, we performed *in silico* motif analysis of FOXO3 binding sites across the four conditions tested in this study, namely in HD or CAG-corrected NSCs and with or without Ryk silencing. Motifs commonly and highly enriched across the four conditions include Forkhead, as expected, Homeobox, Sp/KLF, ETS, E2F, Pou domain, PAS domain, JUN, Zinc finger, TCF, C/EBP and MEF. The Forkhead family of motifs appeared to show a stronger enrichment and higher frequency in HD cells compared to CAG-corrected cells, regardless of Ryk silencing (Figure 4), which is consistent with the higher FOXO3 occupancy detected in human HD NSCs (see Figure 3B). Other shared motifs such as Homeobox, Sp/KLF, E2F and Pou domain show similar features, and some motifs appear to be

specifically enriched in HD NSCs including ASCL, bHLH and p53 (Figure 4). The motifs SRF and Tbrain were found to be specifically enriched in human HD NSCs and human HD NSCs with Ryk silencing, respectively (Figure 4). This could be attributable to a better sampling of DNA fragments in the vicinity of FOXO3 binding sites due to a modification of chromatin state in cells expressing mutant *HTT*, a possibility that has been previously documented in the HD mouse striatum (Achour et al., 2015a). Finally, silencing Ryk did not appear to significantly impact on the enrichment and frequency of motif profiles in either HD or CAG-corrected NSCs, except however to the family of Tbrain factor motifs that is specifically detected in HD cells with Ryk silencing (Figure 4). This comes in support of a regulatory model in which Ryk signaling could primarily modulate FOXO3 human gene regulation by altering the homeostasis of the FOXO3/ $\beta$ -catenin/Ryk-ICD complex (see Figure 1). Together, these analyzes highlight potential co-factors of FOXO3 in human NSCs, some of them that may be specific to HD cells, which provides a resource for studying how FOXO3 might cooperate with other transcription factors to regulate human NSC homeostasis in normal or HD conditions.

### **FOXO3 direct targets in human neural stem cells partially overlap with FOXO targets in other species and/or cell types**

Although some FOXO3 targets may be conserved across species and cell types such as those important for the regulation of growth factor signaling, metabolism, stress resistance, and proteostasis, suggesting an ancestral role in the regulation of these processes (Webb et al., 2016), F3T repertoires may significantly vary depending on the cell type in which FOXO3 operates (Webb et al., 2016). Consistently, the F3Ts herein identified in normal *HTT* (19Q/21Q) human NSCs (N= 219) show a limited overlap with F3Ts in mouse NSCs (Paik et al., 2009b; Renault et al., 2009), FOXO3 or FOXO1 targets in mouse (*e.g.* B and T cells (Ochiai et al., 2012; Ouyang et al., 2012; Kim et al., 2013) or F3T human colon carcinoma DLD1-F3 cells (Eijkelenboom et al., 2013a) (Table S5). As expected, these overlaps are limited to targets that may correspond to conserved functions of FOXO factors such as the capacity to trigger cell apoptosis. For instance, this is illustrated by 60 genes that are common to our list of F3Ts in human CAG-corrected NSCs and FOXO3/FOXO1 targets previously identified in at least one mouse cell type including NSCs (Webb et al., 2013b), B cells and T cells (Ochiai et al., 2012; Ouyang et al., 2012; Kim et al., 2013) (Table S5) and that are enriched for genes (FOS, CJUN) in TNF signaling (Enrichr,  $P < 5 \cdot 10^{-3}$ ). These results suggest that the FOXO3 target repertoire has biological features that are specific to human NSCs.

## **Reprogramming of FOXO3 targets in human HD neural stem cells is predicted to impact on cell growth and neuronal differentiation.**

To predict how reprogramming of FOXO3 targets in human HD NSCs most significantly impacts on cell homeostasis, we applied a knowledge-based gene prioritization approach in which we tested for the biological content of F3T categories and accounted for the strength and convergence of reprogramming effects within these gene categories. We performed these analyzes for three categories of F3Ts including targets that (i) are conserved between HD and CAG-corrected NSCs, (ii) are reprogrammed (lost or gained) in a Ryk-independent manner (no change of target status upon Ryk silencing in mutant *HTT* cells, regardless of their status upon Ryk silencing in control cells) and (iii) are dependent on Ryk in mutant *HTT* cells (target status corrected back to normal upon Ryk silencing in mutant *HTT* cells, regardless of the status upon Ryk silencing in control cells), the F3T category of greatest interest in this study.

Firstly, we performed Enrichr analyzes. Top 1-3 annotations indicate that conserved F3Ts (Table S6: 82 genes) are enriched for the Insulin/IGF (Panther 2016:  $P < 6 \cdot 10^{-03}$ ) and TNF signaling (KEGG 2016:  $P < 1 \cdot 10^{-04}$ ) pathways and the biological process "Response to progesterone" (Gene Ontology 2015:  $P < 3 \cdot 10^{-04}$ , e.g. *FOS* and *JUNB* genes), which may correspond to conserved roles of FOXO factors in the regulation of cell growth/apoptosis. These analyzes also indicate that the F3Ts that are lost or gained in human HD NSCs with no effect of Ryk silencing on the status of these targets (Table S7: 240 genes) are enriched for the PI3-AKT signaling (KEGG 2016:  $P < 1.8 \cdot 10^{-04}$ ), integrin signaling (KEGG 2016:  $P < 1.2 \cdot 10^{-02}$ ), Notch signaling (KEGG 2016:  $P < 2.6 \cdot 10^{-02}$ ) and Toll receptor signaling (KEGG 2016:  $P < 4.7 \cdot 10^{-02}$ ) pathways and the Gene Ontology 2015 biological processes "Negative regulation of phosphorylation ( $P < 5.1 \cdot 10^{-03}$ , e.g. *GADD45B*, *DUPS7* and *PINK1*), "Regulation of protein serine/threonine kinase activity" ( $P < 5.4 \cdot 10^{-03}$ , e.g. *GADD45B*, *DUPS7* and *TLR4*) and "Regulation of potassium homeostasis" ( $P < 3.3 \cdot 10^{-04}$ ), highlighting a potential impact on neuronal differentiation and activity. Finally, these analyzes suggest that F3Ts that are lost or gained in HD NSCs in a Ryk-dependent manner (Table S8: 54 genes) are enriched for the TNF signaling and circadian clock system (KEGG 2016:  $P < 0.05$ ) pathways, however at low significance as contributed by the *GRIN2B/NR2B* gene, and for the biological processes "Regulation of translation" and "Post transcriptional regulation of gene expression", however again at low significance ( $P < 0.05$ ), and as given by genes such as *PPP1R15A (GADD34)*, *BCL3* or *CDKN2AIP (CARF)*. This suggests that the F3Ts in this group might have a role in both conserved and neural or neuronal functions of FOXO3.

While Enrichr analyzes provided some insights into the biology of the abovementioned F3T categories, the precision of these analyzes for gene prioritization was rather limited, which is a common problem of gene set enrichment analysis especially when gene lists are rather small in size or pathway/process membership lacks discriminative power in ontological databases. To overcome these limitations, we applied a network based approach in which we used F3T genes as seed genes for

extracting high-confidence networks with a reasonable number of neighbors from the probabilistic functional network STRING (Szklarczyk et al., 2015) (see Methods). Although several F3Ts remained unconnected as expected, these analyzes highlight several F3Ts that are directly or indirectly (through STRING interactors) inter-connected and that may be involved in the core functions of FOXO3 such as the regulation of transcription, translation, protein quality control, mitochondrial homeostasis and cell homeostasis (Salih and Brunet, 2008; Webb et al., 2016). This includes F3Ts that, in the conserved (Figure S2) or reprogrammed (Figure S3: Ryk-independent; Figure 5: Ryk-dependent) groups of F3Ts, belong to the Wnt, Hippo/TGF- $\beta$ , Toll-like receptor or mTOR signaling pathways. For instance, this raises the possibility that cell homeostasis might be altered in HD NSCs through the inhibition of Hippo signaling — a pathway which has a critical role in cell apoptosis, stem-cell expansion and tissue regeneration (Zhao et al., 2011) — as suggested by the gain of LATS2 as a positively-regulated F3T (Figure S3). Interestingly, these analyzes also highlighted how reprogramming of F3Ts in human HD NSCs may modify the activity of signaling pathways that are important to neuronal differentiation (e.g. dendrite spine formation), synaptic homeostasis (e.g. glutamate signaling) and cell cycle checkpoints (e.g. cyclin-dependent kinases) through converging and/or strong change of FOXO3 gene regulation. Specifically, this applies to losses/gains of Ryk-independent F3Ts that are associated to axon guidance (e.g. *RND1*), axon integrity (e.g. *TIAM2*), dendrite spine formation (e.g. *LRRC4*, *PALMD*, *LRRMI*) and synaptic activity (e.g. *GADD45B*, *GNGB3*) (Figure S3). This also applies to losses/gains of Ryk-independent F3Ts that are corrected back to normal upon silencing of Ryk (Figure 5). Noticeably, network analysis unveils three major changes that may be relevant to the homeostasis of neural stem cells and adult neurons facing proteotoxic stress including (i) the gain of protein phosphatase *GADD34* (*PPP1R15A*) as a positively-regulated (strong effect) F3T in HD NSCs, an effect that could tip the balance towards disruption of TGF- $\beta$  signalling, the latter a phenomenon as previously highlighted in these cells (Ring et al., 2015), (ii) the gain of the glutamate receptor subunit *NR2B* (*GRIN2B*) as a negatively-regulated (strong effect) F3T in HD NSCs, and (iii) the gain of SERTAD1 (also known as p34(SEL1)), a neuronal cell apoptosis inducer (Biswas et al., 2010) that binds to, and renders the cyclin-dependent kinase CDK4 resistant to the effects of p16<sup>INK4a</sup> (Li et al., 2005) as a positively-regulated (strong effect) F3T and that of the transcription factor ETS2, which positively regulates p16<sup>INK4a</sup> expression REF, as a negatively-regulated F3T in HD NSCs. The convergence of these effects is predicted to tip the balance towards the repression of p16<sup>INK4a</sup> expression and activity in human HD NSCs. Since p16<sup>INK4a</sup> is an established inhibitor of cell growth in response to stress such as DNA damage and inducer of cellular senescence in response to damaging stress and aging (Baker et al., 2016), p16<sup>INK4a</sup> repression could in turn facilitate the proliferation of however stress-vulnerable NSCs such as those expressing a mutant *HTT* allele, an hypothesis that is of strong interest to better understanding the biology of HD neural stem cells and that we tested as developed below.

## Discussion

The FOXO transcription factors can integrate intracellular and environmental/extracellular clues to promote cell survival or death depending on whether the level of cellular stress is manageable or not (Eijkelenboom and Burgering, 2013). This is achieved through the regulation of transcriptional targets that are important for multiple cell maintenance mechanisms such as antioxidative response, protein quality control, protein clearance, DNA damage control, mitochondrial function, maintenance of stem cell pools and regulation of cell cycle (Eijkelenboom and Burgering, 2013). Although FOXO factors may regulate a core group of evolutionary conserved targets (Alic et al., 2011) such as those important for proteostasis and cell apoptosis (Webb et al., 2016), FOXO targets can also be specific on the cellular context in which FOXO factors operate (Monsalve and Olmos, 2011). Data have recently been accumulated about FOXO gene regulation in neurons. FOXO6 appears to regulate synaptic genes to have a role in memory consolidation (Salih et al., 2012a), FOXO3 cooperates with ASCI-1 into the preservation of the neural stem cell pool in the mouse (Webb et al., 2013b), and neuronal *daf-16*/FOXO targets in adult nematodes may include synaptic genes to have a role in extended memory (Kaletsky et al., 2016). Our data identify FOXO3 direct targets in human NSCs that express normal or mutant *HTT*, revealing how FOXO3 may precisely modulate neural cell homeostasis during the early developmental times of HD.

Our data unveil a regulatory model in which human NSCs that express a mutant (72Q) huntingtin allele show partial reprogramming of F3Ts, with some F3Ts that are conserved while others are lost or gained compared to the F3T repertoire detected in normal *HTT* NSCs. Lost and gained of F3Ts are associated to the core function of FOXO factors such as cell cycle regulation and other F3Ts that are more specifically associated to neurons such as neuronal differentiation, dendrite spine formation and synaptic transmission. As expected, although the F3Ts reported herein do overlaps with FOXO3 targets found in other cellular contexts in *C. elegans*, mouse and humans, these overlaps are limited, consistent with the notion that FOXO gene regulation has significant context-dependent features (Webb et al., 2016). Interestingly, reprogramming of F3Ts in human NSCs that express mutant *HTT* does not appear to be the sole consequence of changes of FOXO3 binding at gene promoters and enhancers. While the gain/loss of some F3Ts is accompanied by a gain/loss of FOXO3 binding, this effect is likely coincidental as there is a global increase of the number and maximal intensity of FOXO3 binding signals in HD NSCs compared to CAG-corrected NSCs. This suggests that the changes of chromatin states that can be induced by mutant *HTT* expression (2003; Ng et al., 2013; Achour et al., 2015a), could actually result in increased FOXO3 occupancy at gene promoters and enhancers. This also suggests that the shift of F3Ts might primarily relate to a modification of pathways to FOXO3, and FOXO3 co-factors, in mutant *HTT* expressing cells, a possibility that is supported by the effect of increased Ryk signaling on FOXO3 protection in *C. elegans* model of neuronal dysfunction in HD and mouse striatal cell models of cell vulnerability in the disease

(Tourette et al., 2014a). Here, our data indicate that silencing Ryk in normal HTT cells greatly increase the number of F3Ts, suggesting that Ryk signaling may act as a co-repressor of FOXO3 activity. However, Ryk may signal through multiple mechanisms including canonical Wnt (Lu et al., 2004), the PCP pathway (Macheda et al., 2012) and the Ryk-ICD pathway (Lyu et al., 2008a) and we cannot exclude the possibility that expansion of F3Ts in normal cells subjected to Ryk silencing may also be the result of  $\beta$ -catenin alteration. In human HD NSCs, several of the observed changes in FOXO3 gene regulation are abolished upon silencing Ryk, suggesting that increased Ryk signaling in HD (Tourette et al., 2014a) might contribute to reprogramming F3Ts in these cells. Such a model is supported by our data on Ryk-ICD membership to the FOXO3/ $\beta$ -catenin complex. These data raise the possibility that Ryk-ICD may modify the homeostasis of the FOXO3/ $\beta$ -catenin complex, altering gene regulation. Since Forkhead Box factors may directly (Yao et al., 2001) or indirectly (Tang et al., 2002) recruit co-repressors of gene expression, this may impact on positively- as well as negatively-regulated targets, as observed herein with the detection of 1304 positively-regulated and 1403 negatively-regulated F3T in CAG-corrected NSCs upon Ryk silencing. It should be noted that a significant number of F3Ts (82) remain conserved between CAG-corrected and HD NSCs, and, within genotypes, between cells subjected or not to Ryk silencing, suggesting mutant *HTT* signaling and Ryk signaling may selectively alter FOXO3 gene regulation. A selective impact of mutant *HTT* signaling and Ryk signaling is supported by the biological content analysis of the targets that are lost and gained in human HD cells and, amongst these targets, of those for which the F3T status is corrected back to normal upon Ryk silencing. The latter class of F3Ts notably predicts that FOXO3 may gain new functional properties linked to the modification of cell cycle genes that are important for stress response such as p16<sup>INK4A</sup>, a major regulator of cell proliferation and cellular senescence in response to DNA damage (Baker et al., 2016). This possibility is consistent with the previously described role of this cyclin dependent kinase inhibitor in stem cell self-renewal (Becker et al., 2006). Finally, our data provide a resource to understand how FOXO3 may regulate the maintenance of the neural stem cell pool and the capacity to form neurons in the context of proteotoxic stress produced in neurodegenerative diseases such as HD. Specifically, our data provide a resource for the community to explore whether the gain/loss of individual F3Ts in HD neural stem cells may engage compensatory or pathogenic mechanisms, and whether such responses might persist, or not, in adult neurons.

In conclusion, we performed biochemical analysis of the Ryk-ICD/ $\beta$ -catenin/FOXO3 complex complemented by the genome wide analysis of FOXO3 gene regulation in a human iPSC/NSC model of HD pathogenesis at neuronal differentiation time points. Combined, our data elucidate how FOXO3 regulates gene transcription in HD NSCs, and they provide novel insights into the pathways by which FOXO3 could regulate neural stem cell homeostasis in HD.

## Materials and Methods

### Cell culture

To analyze the physical interactions between the Ryk-ICD fragment,  $\beta$ -catenin and FOXO3, we used Human Embryonic Kidney 293 cells (HEK293T). These cells were cultured in DMEM medium (Gibco) containing 10% FBS (Gibco) and 100U/ml penicillin and 100  $\mu$ g/ml streptomycin (Gibco) in humidified incubator under 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

To explore FOXO3 gene regulation, we used human induced pluripotent stem cells (iPSC) derived from an HD patient (female – 20 years old: 72Q/19Q) and their CAG-corrected counterpart (normal *HTT* NSCs: 21Q/19Q) as obtained by using homologous recombination (An et al., 2012b). These cells were differentiated into neural stem cells as previously described using the Embryonic Body (EB) method (Ring et al., 2015). Briefly, iPSCs were passaged with ReLesR (STEMCELL technologies) and cell clumps were cultured in a low attachment petri-dish (coated with 0,1% agarose) in ES medium without bFGF (Embryonic Stem culture medium: knockout DMEM/F12 (Gibco) supplemented with 20% knockout serum replacement (Gibco), 2.48mM L-glutamine, 1X NEAA, 15.4mM HEPES, 50  $\mu$ M  $\beta$ -mercaptoethanol, 100U/ml penicillin, 100  $\mu$ g/ml streptomycin and 4ng/ml basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) (Life Technologies). Every two days, 25% of ES medium was replaced by the EB differentiation medium (DMEM supplemented with 20% FBS, 1X non-essential amino acids, 50  $\mu$ M  $\beta$ -mercaptoethanol, 100U/ml penicillin and 100  $\mu$ g/ml streptomycin). At day 8, 100% of the culture medium was the EB medium. At day 10, the EBs in suspension were attached onto poly-L-Ornithin/Laminin (pO/L, Sigma) coated dishes in Neural Induction medium (DMEM/F12 supplemented with 1X N2 (Gibco), 100 U/ml penicillin and 100  $\mu$ g/ml streptomycin) supplemented with bFGF (25ng/ml). The culture medium was replaced every two days. After 10-12 days, rosettes were picked using the STEMdiff™ Neural Rosette Selection Reagent (STEMCELL Technologies) and plated onto pO/L-coated plates in complete neural proliferation medium (Neurobasal medium, 1X B27-supplement (Gibco), 2 mM L-glutamine, 25 ng/ml bFGF, 10 ng/ml leukemia inhibitory factor (LIF) (Peprotech), 100U/ml penicillin, 100  $\mu$ g/ml streptomycin). The level of differentiation into NSCs was then tested by using immunofluorescence analysis and antibodies against the NSC markers Nestin (Sigma-Aldrich, 1:200) and SOX1 (Sigma-Aldrich, 1:50) and control iPSC marker OCT3/4 (Pierce antibodies, 1:500). The level of differentiation into NSCs achieved across all experiments was greater than 97%. The iPSC lines were verified for genome integrity prior to performing experiments by using multi-color FISH analysis as carried out by Applied Stemcell Inc. (Menlo Park, CA).

### Protein co-immunoprecipitation assays

To test for interaction between Ryk-ICD,  $\beta$ -catenin and FOXO3, HEK 293T cells were transfected with pcDNA3.1-Myc-Ryk-ICD or Empty Vector using JetPrime (PolyPlus Transfection). 48 hours after transfection, cells were treated with 50  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 1 hour and 30 minutes then washed once with cold DPBS and lysed using a lysis buffer containing 25 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100, 10 mM sodium pyrophosphate, 10 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 1 mM sodium orthovanadate, 10% glycerol, and protease inhibitors (ThermoFisher Scientific). Lysate was cleared for 10 minutes at 16,000 rpm at 4°C. BCA assay (ThermoFisher Scientific) was performed to quantify protein concentration.

The cell lysates were precleared with dynabeads protein G (Life Technologies) at least 1 hour at 4°C. Immunoprecipitations of complex were carried out by incubating equal amounts (2 mg) of total cell lysates with either 5  $\mu$ g of  $\beta$ -catenin antibody (BD 610154) or 8  $\mu$ g of FOXO3 antibody (Santa Cruz) at 4°C overnight with gentle rotation. As a negative control we used an antibody of same isotype and specie as anti- $\beta$ -catenin or anti-FOXO3a (normal mouse IgG, ThermoFisher Scientific, normal rabbit IgG, Cell Signaling, respectively). Immune complexes were captured by incubation with 25  $\mu$ l of pre-washed dynabeads protein G (Life Technologies) for 4 hours at 4°C. Beads were washed three times for 10 minutes each at 4°C (with end-over-end rotation) in cold lysis buffer supplemented with protease inhibitors. The immunoprecipitate complexes were eluted at 100°C for 10 minutes in 1x Laemmli Buffer (Biorad). Samples were then resolved on 4–12% gels in 1X MES buffer (Life Technologies) and transferred to a PVDF membrane (Biorad). Western blot analysis was performed under standard conditions using the antibodies: anti-FOXO3 (H-144, Santa Cruz, 1:1000), anti-MYC (Pierce, 1:1000) and anti-  $\beta$ -catenin (Cell Signaling, 1:1000).

### Messenger RNA isolation and sequencing

The RNA-seq samples were prepared in duplicate using HD (72Q/19Q) NSCs and normal *HTT* (21Q/19Q) NSCs. These cells were generated from the corresponding iPSCs as described above, and they were then amplified in culture for a limited number of passages (n = 11). Briefly, 15 millions of HD-72Q and Corrected-NSCs were transfected with siRNA Ryk or scramble Ryk ( Eurofins MWG Operon) that were previously validated for activity in HD and control NSC using qRT-PCR analysis. *Ryk* siRNA: 5'-GCAAGUUAGUAGAGGCCAA-3'; scramble RNA-5'-AUCGAAGCUAGCGAUGAGA-3'. Cells were transfected by using electroporation (Neon Transfection System, Invitrogen Inc.) according to the manufacturer's instructions. Two days after transfection, complete neurobasal proliferation medium was switched to medium without bFGF and LIF for 4 hours and treated with 20  $\mu$ M LY294002 (Peprotech) for 1 hour and 30 minutes to activate endogenous FOXO3 as previously described (Brunet et al., 1999b). Total RNA was then isolated and

purified using the RNeasy kit (Qiagen) and DNase treated using the DNA-free-Kit from Ambion. Messenger RNA libraries were prepared using standard protocols from Illumina and sequenced with the Illumina HiSeq Genome Analyzer. The preparation and sequencing of mRNA libraries were performed by FASTERIS SA (Switzerland).

### **Chromatin immunoprecipitation and sequencing**

To prepare the ChIP-seq samples, HD-72Q and Corrected-NSCs were amplified in culture for a limited number of passages (7–11), and ChIP experiments were performed as described in the Agilent Mammalian ChIP-on-chip protocol. Briefly,  $80\text{--}100 \times 10^6$  cells of HD-72Q and Corrected-NSC were transfected with a siRNA Ryk or a scramble Ryk for generate Illumina single-end libraries for FOXO3 ChIP as described before. Two days after transfection, complete neurobasal proliferation medium was switched to medium without bFGF and LIF for 4 hours and treated with 20  $\mu\text{M}$  LY294002 for 1 hour and 30 minutes to activate endogenous FOXO3 as previously described (Brunet et al., 1999b). Cells were cross-linked for 10 minutes with 1% PFA. Cross-linking was stopped by the addition of glycine at a final concentration of 0.125 M, followed by incubation for 5 minutes at room temperature. Cells were washed with cold DPBS, lysed with Lysis Buffer 1 (LB1) and rocked for 10 minutes at 4°C. Pellets were resuspended in Lysis Buffer 2 (LB2) and rocked 10 minutes at 4°C. Pellet nuclei were resuspended in Lysis Buffer 3 (LB3) and rocked 10 minutes at 4°C. Chromatin was sheared by sonication with a Bioruptor Plus device (Diagenode) 20 times 30 sec ON – 30 sec OFF and centrifuged at 14,000 rpm for 15 minutes at 4°C to be clarified. For immunoprecipitation, 5  $\mu\text{g}$  of anti-FOXO3 antibody “NFL”, a ChIP grade FOXO3 antibody (Brunet et al., 1999b), or 5  $\mu\text{g}$  of anti-IgG (Cell Signaling) were used for each ChIP experiment and coupled overnight with Dynabeads Protein G (Life Technologies). Chromatin was then incubated overnight with antibody-coupled beads. Beads were washed with RIPA buffer 3 times and one time with Tris-EDTA supplement with 50 nM NaCl. Chromatin was eluted in Elution Buffer in a water bath at 65°C during 15 minutes, then reversed cross-linked by incubating in a water bath at 65°C overnight. DNA was extracted using a phenol/chloroform protocol and purified using the PCR purification kit (Qiagen). ChIP-seq libraries were prepared for sequencing using standard Illumina protocols as performed by FASTERIS SA, Switzerland. DNA sequencing was carried out at FASTERIS using Illumina HiSeq Genome Analyzer sequencer.

### **Next-generation sequencing data analysis**

The main steps for the following next generation sequencing data analysis were performed using the Galaxy framework developed by the ARTbio bioinformatics platform at the Institute of Biology Paris-Seine (<https://mississippi.snv.jussieu.fr/>).

### **RNA-seq data analysis**

The raw sequencing reads were pre-processed in order to discard both adapter sequences and low quality reads using the Trimmomatic and FASTQ Groomer tools. The filtered reads were then mapped to the human reference genome hg38 (UCSC 2013 release) by using Bowtie2 (Langmead and Salzberg, 2012). Duplicate and unmapped reads were removed using SAM Tools (Li et al., 2009a). Read distribution were calculated by using the featureCounts tool (Liao et al., 2014). To test for differentially expressed genes, reads were analyzed by using the R/Bioconductor package edgeR (Robinson et al., 2010). For genes with very low read counts, a prior filtering step was performed to only keep those with at least ten counts in all samples. Following differential expression analysis was assessed using the exact negative binomial test and a false discovery rate (FDR) correction of 5%.

### **FOXO3 ChIP-seq data analysis**

Reads with length 50 bp were generated using Illumina HiSeq Genome analyzer. The raw sequencing reads were then mapped to the human reference genome (hg38 2013 release) using Bowtie2 (Langmead and Salzberg, 2012). Duplicate and unmapped reads were removed using samtools. Peaks were called using MACS2 (Zhang et al., 2008) set to default parameters except for read length that was set as 100 and p-value cut off was set to 0.05. Deduction and comparison of noise and input was carried out using the bdgcmp in MACS2 while the peaks were called using the bdgpeakcall available from MACS2. The number of ChIP-seq peaks varied across samples due to the difference in binding across samples while keeping a constant p-value cutoff. Generated peaks were annotated using the R/Bioconductor package ChIPseeker (Yu et al., 2015) and a peak calling set to  $\pm 5$  kb from a transcription start site (TSS). DeepTools (Ramirez et al., 2016) were used to perform binding enrichment across TSSs with sorting based on mean and k-means clustering.

### **Integrative analysis of RNA-seq and FOXO3 ChIP-seq data**

The comparison of RNA-seq and ChIP-seq data was performed using Monte Carlo simulations with 10,000 repetitions for testing all overlaps between the four experimental conditions. In addition, the

global and pairwise comparisons of ChIP-seq signals (or peak score distributions) for the four conditions were examined using the Chi-squared test in R.

### **Motif discovery and enrichment analysis**

Analysis of sequence motifs was performed using the motif-based sequence analysis tools of the MEME Suite (Stuge and Ellingsen, 1991) for the MACS2 peaks corresponding to the promoter regions within a band width of  $\pm 250$  bp. Default parameters were used except for MEME Motif Count (value: 8), DREME Motif E-value (value: 0.5) and CentriMo Match Score (value: 8). The significance of detected motifs was assessed using an E-value less than 0.5. Motif annotation was then performed using the HOMO sapiens COMPREHENSIVE MODEL COLLECTION database (HOCOMOCO v10) (Kulakovskiy et al., 2013). To determine the family-wide significance of the motifs (*e.g.* the FOXO family), the top p-value was considered for each family.

### **Ortholog analysis**

The human-mouse orthologous gene pairs were extracted from Ensembl database with the R/Bioconductor biomaRt package (Durinck et al., 2009).

### **Biological content analysis**

Biological content analysis was performed for each subgroup of FOXO3 direct targets including those that are conserved, lost or gained in human HD NSCs compared to CAG-corrected NSCs, in a Ryk-dependent or -independent manner. To this end, we used EnrichR (<http://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/>). Additionally, networks containing subgroups of FOXO3 direct targets as seed genes and their level-1 neighbors (for a total number of nodes set at 100) were derived from the high coverage and probabilistic functional network STRING (v10) (Szklarczyk et al., 2015). This was performed using high-confidence (STRING score  $\geq 0.7$ ) edges that are based on information with high biological relevance (Databases, Experiments). Networks were represented using Cytoscape (<http://www.cytoscape.org/>) and annotated with biological information as provided in STRING. Additionally, seed genes (FOXO3 direct targets) in these networks were annotated further with information on the magnitude of the regulation by FOXO3, as inferred from log<sub>2</sub> fold change values in RNA-seq data, and with information on gene deregulation in human HD compared to CAG-corrected NSCs (Ring et al., 2015).

## Supplementary information

**Table S1.** Complete list of human genes that are differentially expressed upon FOXO3 induction into the nucleus compared to no FOXO3 induction. This table is annotated with information on FOXO3 binding at promoters (-5 kb/+2 kb) and enhancers ( $\pm$  20 kb outside the promoter regions), deregulation in HD-NSCs, the same as the ones used herein, as previously reported (Ring et al., 2015), druggability, overlap with FOXO3 or FOXO1 targets in other cell types as previously reported (Paik et al., 2009b; Renault et al., 2009; Ouyang et al., 2012; Eijkelenboom et al., 2013a; Kim et al., 2013; Webb et al., 2016), and overlaps with modifiers of mutant HTT cytotoxicity in RNAi screens performed in *C. elegans* (Lejeune et al., 2012) and human cell (Miller et al., 2012b) models of HD pathogenesis.

**Table S2.** Table S1 extract showing the list of F3Ts that are gained in human HD neural stem cells and their behavior upon silencing of Ryk.

**Table S3.** Table S1 extract showing the list of F3Ts that are lost in human HD neural stem cells and their behavior upon silencing of Ryk.

**Table S4.** Table S1 extract showing the list of F3Ts that are conserved in human HD neural stem cells and their behavior upon silencing of Ryk.

**Table S5.** All F3Ts in normal HTT cells that are true in other F3T datasets

**Table S6.** FOXO3 targets conserved between human HD and CAG-corrected neural stem cells (Table S1 extract).

**Table S7.** FOXO3 targets reprogrammed (lost or gained) in a Ryk-independent manner (Table S1 extract).

**Table S8.** FOXO3 targets reprogrammed (lost or gained) in a Ryk-dependent manner (Table S1 extract).

**Figure S1.** FOXO3 induction into the nucleus and Ryk silencing in HD and normal *HTT* neural stem cells. FOXO3 was induced in the nucleus using low growth factor (LGF) conditions complemented by LY294002 treatment (see Methods). **(A)** Representative confocal images of FOXO3 intracellular distribution upon induction in the nucleus of HD and normal *HTT* NSCs. HGF: high growth factor conditions. **(B)** The nuclear localization of FOXO3 is increased in HD and normal *HTT* cells. Data are mean $\pm$ SEM for the ratio Intensity/Area of FOXO3 signal in the nucleus (N = 3). \*\*\* $P < 0.001$  compared to no induction. **(C)** Ryk mRNA levels are decreased by siRNA treatment in HD and normal *HTT* NSCs. Data are mean $\pm$ SD (N = 3). \*\*\* $P < 0.001$  compared to scramble RNA treatment.

**Figure S2.** Network of F3Ts that are conserved between normal and mutant *HTT* cells, regardless of their dependence on Ryk. To maximize biological relevance, FOXO3 direct targets were used as seed genes to generate networks that include a maximum of 100 high confidence neighbors as defined by a probability score  $\geq 0.7$  and edge information solely based on databases and experiments as available in the STRING database (<http://string-db.org/>). These network is annotated with information on connectivity between F3Ts with different regulatory profiles (positively or negatively regulated), top-2 fold-changes of target expression upon FOXO3 nuclear induction and gene expression levels in HD NSCs versus CAG-corrected NSCs as previously reported (An et al., 2012b).

**Figure S3.** Network of F3Ts that are reprogrammed (lost or gained) in a Ryk-independent manner in HD neural stem cells, regardless of their dependence on Ryk in normal *HTT* neural stem cells. To maximize biological relevance, F3Ts were used as seed genes to generate networks that include a maximum of 100 high-confidence neighbors as defined by a probability score  $\geq 0.7$  and edge information solely based on databases and experiments as available in the STRING database (<http://string-db.org/>). The network is annotated with information on connectivity between F3Ts with different regulatory profiles (positively or negatively regulated), top-2 fold-changes of target expression upon FOXO3 nuclear induction and gene expression levels in HD NSCs versus CAG-corrected NSCs as previously reported (Ring et al., 2015).

## Abbreviations

FOXO: Forkhead box O; HD: Huntington's disease; NSC: neural stem cells.

## **Competing interests**

The authors declare that they have no competing interests.

**Authors' contributions.** JV performed the experiments based on human induced pluripotent stem cells and neural stem cells, analysed and interpreted the data and wrote the manuscript. FF performed immunoprecipitation experiments, analysed the data and helped to draft the manuscript. FXL and SSN performed bioinformatic analyzes and network analysis and helped to draft the manuscript. JB analysed and interpreted the data and helped to draft the manuscript. LE contributed essential reagents and helped to draft the manuscript. CN conceived and designed the experiments, analysed and interpreted the data and wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

## **Acknowledgements**

We thank Christophe Antoniewski and the bioinformatic platform ARTbio (University Pierre and Marie Curie) for help with analysing RNA-seq data and Anne Brunet (Stanford University) for providing the ChIP-grade anti-FOXO3 antibody “NFL”. We thank the Association Huntington France for support of the PhD fellowship of JV.

## **Funding**

Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) (CN), Agence Nationale pour la Recherche (ANR) (CN), Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) (CN), Assistance Publique des Hôpitaux de Paris (AP-HP) (CN, JB), Hereditary Disease Foundation and CHDI Foundation, USA (CN). JV is a recipient of a fellowship from Association Huntington France.

### Legends of figures

**Figure 1.** The FOXO3,  $\beta$ -catenin and Ryk-ICD fragment proteins co-precipitate in pull-down experiments. Construct Myc-Ryk-ICD was transfected into HEK293T cells. For negative control, an IgG isotype was used. **A)** Immunoprecipitation of the endogenous FOXO3. The association of the  $\beta$ -catenin and the Ryk-ICD with FOXO3 were analyzed by immunoblotting for  $\beta$ -catenin and Myc. **B)** Immunoprecipitation of the endogenous  $\beta$ -catenin. The association of FOXO3 and Ryk-ICD with  $\beta$ -catenin were analyzed by immunoblotting for FOXO3 and Myc.

**Figure 2.** FOXO3 binding in human HD and control neural stem cells with or without Ryk silencing. **A)** Enrichment of FOXO3 binding around the transcriptional start sites (TSSs) ( $\pm 2$  kb) in human NSCs expressing a normal (*HTT*) or mutant *HTT* (m*HTT*) allele and treated with Ryk siRNA (siRyk) or scramble RNA (scramble). The genotypes for *HTT* and m*HTT* cells are 19Q/21Q and 72Q/21Q, respectively. **B)** FOXO3 binding at specific loci in human NSCs expressing a normal or mutant *HTT* allele. The upper panel illustrates a common FOXO3 binding site that is present in the normal *HTT* cells at the *HYLS1* locus. The lower panel illustrates a common FOXO3 binding site that is gained in m*HTT* cells at the *TBC4* locus.

**Figure 3.** Integration of RNA-seq and FOXO3 ChIP-seq data in human HD and CAG-corrected neural stem cells. **A)** Venn diagram depicting FOXO3 direct target overlaps across the four conditions listed in Figure 2. FOXO3 direct targets are genes that show FOXO3 binding across the promoter or enhancer regions ( $\pm 20$  kb) as indicated by FOXO3 ChIP-seq data and as previously recommended (Eijkelenboom et al., 2013a; Webb et al., 2016) and that are positively or negatively regulated by FOXO3 as indicated by RNA-seq data. The left panel shows the FOXO3 dependent genes as instructed by RNA-seq data, showing an increase of 3486 genes in CAG-corrected NSCs upon Ryk silencing ( $P < 2.2 \cdot 10^{-16}$  compared to CAG-corrected NSCs subjected to scramble RNA treatment using chi square test). The middle panel shows FOXO3 binding across the four conditions tested, showing that there is more FOXO3 binding in the promoter and enhancers, considered together, of human HD NSCs compared to CAG-corrected NSCs. The right panel shows the distribution of F3Ts across the four conditions tested, highlighting an increase of 2587 F3Ts upon Ryk silencing in CAG-corrected NSCs ( $P < 2.2 \cdot 10^{-16}$  compared to CAG-corrected NSCs subjected to scramble RNA treatment using chi square test) and a similar effect of Ryk silencing, however to a lower extent, in human HD NSCs ( $P < 2.2 \cdot 10^{-16}$  compared to human HD NSCs subjected to scramble RNA treatment using chi square test). **B)** Binding effect of the FOXO3-dependent genes (genes significantly found deregulated in at

least one of the four conditions tested with RNA-seq data). The left bar plot shows the proportions of the FOXO3-dependent genes with binding or no binding in each of the four conditions. Pairwise proportion tests with correction for multiple testing were performed using the R function `pairwise.prop.test`. The right bar plot represents the signal (peak score) distributions of the FOXO3-dependent genes across the four conditions. Chi-squared test was performed for global and pairwise comparisons of the distributions with the R function `chisq.test`. C) Classification of F3Ts according to their change of status in human HD cells and the consequence of silencing Ryk on the status of these F3Ts in human HD or CAG-corrected NSCs.

**Figure 4:** FOXO3 binding sites enrichment for candidate co-regulator motifs that are shared across HTT genotypes or unmasked in cells expressing mutant HTT. (N.A - Non applicable)

**Figure 5.** Network of FOXO3 direct targets that are lost or gained in human HD NSCs in a Ryk-dependent manner. To maximize biological relevance, FOXO3 direct targets were used as seed genes to generate networks that include a maximum of 100 high confidence interactors as defined by a probability score  $\geq 0.7$  and edge information solely based on databases and experiments as available in the STRING database (<http://string-db.org/>). These network is annotated with information on connectivity between F3Ts with different regulatory profiles (positively or negatively regulated), top 2 fold change of expression upon FOXO3 nuclear induction and gene expression levels in HD-NSCs versus CAG-corrected cells as previously reported (Ring et al., 2015).

## References

1. Salih DA, Brunet A: **FoxO transcription factors in the maintenance of cellular homeostasis during aging.** *Curr Opin Cell Biol* 2008, **20**(2):126-136.
2. Lee SS, Kennedy S, Tolonen AC, Ruvkun G: **DAF-16 target genes that control C. elegans life-span and metabolism.** *Science (New York, NY)* 2003, **300**(5619):644-647.
3. Li Y, Wang WJ, Cao H, Lu J, Wu C, Hu FY, Guo J, Zhao L, Yang F, Zhang YX *et al*: **Genetic association of FOXO1A and FOXO3A with longevity trait in Han Chinese populations.** *Hum Mol Genet* 2009, **18**(24):4897-4904.
4. Flachsbart F, Caliebe A, Kleindorfer R, Blanche H, von Eller-Eberstein H, Nikolaus S, Schreiber S, Nebel A: **Association of FOXO3A variation with human longevity confirmed in German centenarians.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009, **106**(8):2700-2705.
5. Parker JA, Vazquez-Manrique RP, Tourette C, Farina F, Offner N, Mukhopadhyay A, Orfila AM, Darbois A, Menet S, Tissenbaum HA *et al*: **Integration of beta-Catenin, Sirtuin, and FOXO Signaling Protects from Mutant Huntingtin Toxicity.** *J Neurosci* 2012, **32**(36):12630-12640.
6. Tourette C, Farina F, Vazquez-Manrique RP, Orfila AM, Voisin J, Hernandez S, Offner N, Parker JA, Menet S, Kim J *et al*: **The Wnt receptor Ryk reduces neuronal and cell survival capacity by repressing FOXO activity during the early phases of mutant huntingtin pathogenicity.** *PLoS Biol* 2014, **12**(6):e1001895.
7. Mojsilovic-Petrovic J, Nedelsky N, Boccitto M, Mano I, Georgiades SN, Zhou W, Liu Y, Neve RL, Taylor JP, Driscoll M *et al*: **FOXO3a is broadly neuroprotective in vitro and in vivo against insults implicated in motor neuron diseases.** *J Neurosci* 2009, **29**(25):8236-8247.
8. Pino E, Amamoto R, Zheng L, Cacquevel M, Sarria JC, Knott GW, Schneider BL: **FOXO3 determines the accumulation of alpha-synuclein and controls the fate of dopaminergic neurons in the substantia nigra.** *Hum Mol Genet* 2014, **23**(6):1435-1452.
9. Cohen E, Du D, Joyce D, Kapernick EA, Volovik Y, Kelly JW, Dillin A: **Temporal requirements of insulin/IGF-1 signaling for proteotoxicity protection.** *Aging Cell* 2009.
10. Webb AE, Kundaje A, Brunet A: **Characterization of the direct targets of FOXO transcription factors throughout evolution.** *Aging Cell* 2016, **15**(4):673-685.

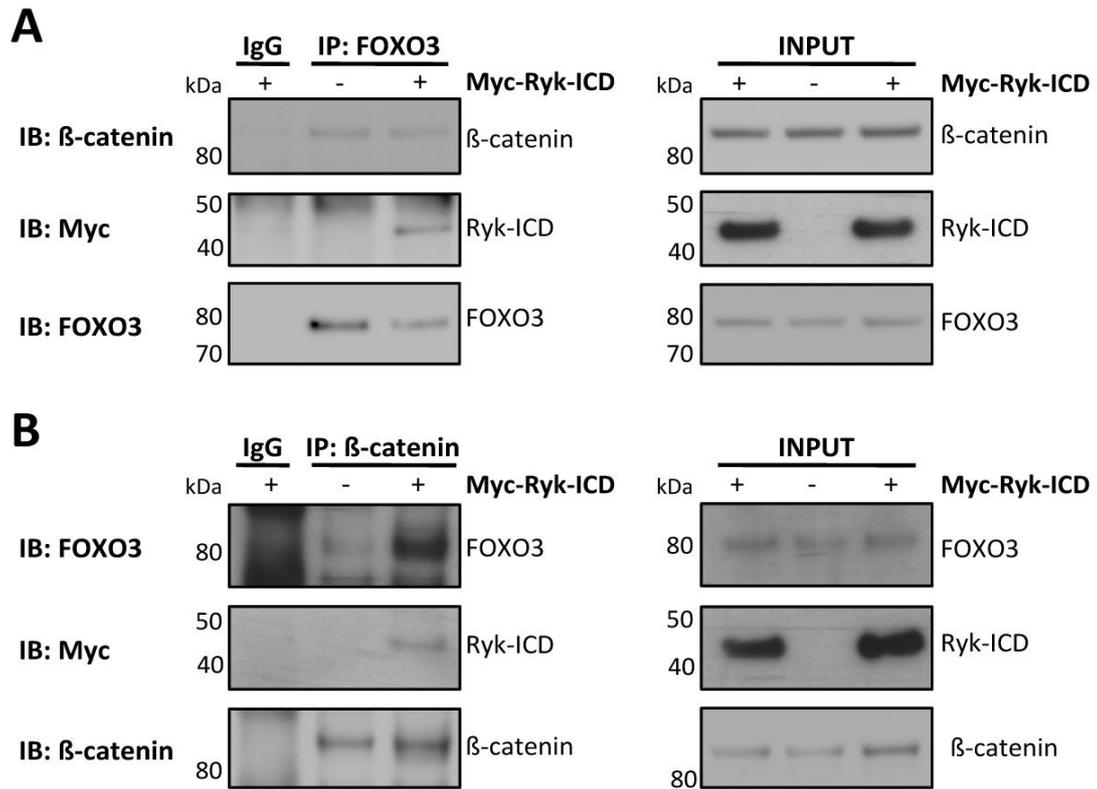
11. Blakely BD, Bye CR, Fernando CV, Prasad AA, Pasterkamp RJ, Macheda ML, Stacker SA, Parish CL: **Ryk, a receptor regulating Wnt5a-mediated neurogenesis and axon morphogenesis of ventral midbrain dopaminergic neurons.** *Stem Cells Dev* 2013, **22**(15):2132-2144.
12. Andre P, Wang Q, Wang N, Gao B, Schilit A, Halford MM, Stacker SA, Zhang X, Yang Y: **The Wnt coreceptor Ryk regulates Wnt/planar cell polarity by modulating the degradation of the core planar cell polarity component Vangl2.** *J Biol Chem* 2012, **287**(53):44518-44525.
13. Lyu J, Yamamoto V, Lu W: **Cleavage of the Wnt receptor Ryk regulates neuronal differentiation during cortical neurogenesis.** *Developmental cell* 2008, **15**(5):773-780.
14. Langfelder P, Cantele JP, Chatzopoulou D, Wang N, Gao F, Al-Ramahi I, Lu XH, Ramos EM, El-Zein K, Zhao Y *et al*: **Integrated genomics and proteomics define huntingtin CAG length-dependent networks in mice.** *Nat Neurosci* 2016, **19**(4):623-633.
15. Kuhn A, Goldstein DR, Hodges A, Strand AD, Sengstag T, Kooperberg C, Becanovic K, Pouladi MA, Sathasivam K, Cha JH *et al*: **Mutant huntingtin's effects on striatal gene expression in mice recapitulate changes observed in human Huntington's disease brain and do not differ with mutant huntingtin length or wild-type huntingtin dosage.** *Hum Mol Genet* 2007, **16**(15):1845-1861.
16. Essers MA, de Vries-Smits LM, Barker N, Polderman PE, Burgering BM, Korswagen HC: **Functional interaction between beta-catenin and FOXO in oxidative stress signaling.** *Science (New York, NY)* 2005, **308**(5725):1181-1184.
17. Ring KL, An MC, Zhang N, O'Brien RN, Ramos EM, Gao F, Atwood R, Bailus BJ, Melov S, Mooney SD *et al*: **Genomic Analysis Reveals Disruption of Striatal Neuronal Development and Therapeutic Targets in Human Huntington's Disease Neural Stem Cells.** *Stem Cell Reports* 2015, **5**(6):1023-1038.
18. An MC, Zhang N, Scott G, Montoro D, Wittkop T, Mooney S, Melov S, Ellerby LM: **Genetic correction of Huntington's disease phenotypes in induced pluripotent stem cells.** *Cell Stem Cell* 2012, **11**(2):253-263.
19. Baker DJ, Childs BG, Durik M, Wijers ME, Sieben CJ, Zhong J, Saltness RA, Jeganathan KB, Verzosa GC, Pezeshki A *et al*: **Naturally occurring p16(Ink4a)-positive cells shorten healthy lifespan.** *Nature* 2016, **530**(7589):184-189.

20. Eijkelenboom A, Mokry M, de Wit E, Smits LM, Polderman PE, van Triest MH, van Boxtel R, Schulze A, de Laat W, Cuppen E *et al*: **Genome-wide analysis of FOXO3 mediated transcription regulation through RNA polymerase II profiling.** *Mol Syst Biol* 2013, **9**:638.
21. Eijkelenboom A, Mokry M, Smits LM, Nieuwenhuis EE, Burgering BM: **FOXO3 selectively amplifies enhancer activity to establish target gene regulation.** *Cell Rep* 2013, **5**(6):1664-1678.
22. Webb AE, Pollina EA, Vierbuchen T, Urban N, Ucar D, Leeman DS, Martynoga B, Sewak M, Rando TA, Guillemot F *et al*: **FOXO3 Shares Common Targets with ASCL1 Genome-wide and Inhibits ASCL1-Dependent Neurogenesis.** *Cell Rep* 2013, **4**(3):477-491.
23. Achour M, Le Gras S, Keime C, Parmentier F, Lejeune FX, Boutillier AL, Neri C, Davidson I, Merienne K: **Neuronal Identity Genes Regulated by Super-Enhancers Are Preferentially Down-Regulated in the Striatum of Huntington's Disease Mice.** *Hum Mol Genet* 2015.
24. Paik JH, Ding Z, Narurkar R, Ramkissoon S, Muller F, Kamoun WS, Chae SS, Zheng H, Ying H, Mahoney J *et al*: **FoxOs cooperatively regulate diverse pathways governing neural stem cell homeostasis.** *Cell Stem Cell* 2009, **5**(5):540-553.
25. Renault VM, Rafalski VA, Morgan AA, Salih DA, Brett JO, Webb AE, Villeda SA, Thekkat PU, Guillerrey C, Denko NC *et al*: **FoxO3 regulates neural stem cell homeostasis.** *Cell Stem Cell* 2009, **5**(5):527-539.
26. Ouyang W, Liao W, Luo CT, Yin N, Huse M, Kim MV, Peng M, Chan P, Ma Q, Mo Y *et al*: **Novel Foxo1-dependent transcriptional programs control T(reg) cell function.** *Nature* 2012, **491**(7425):554-559.
27. Kim MV, Ouyang W, Liao W, Zhang MQ, Li MO: **The transcription factor Foxo1 controls central-memory CD8+ T cell responses to infection.** *Immunity* 2013, **39**(2):286-297.
28. Ochiai K, Maienschein-Cline M, Mandal M, Triggs JR, Bertolino E, Sciammas R, Dinner AR, Clark MR, Singh H: **A self-reinforcing regulatory network triggered by limiting IL-7 activates pre-BCR signaling and differentiation.** *Nat Immunol* 2012, **13**(3):300-307.
29. Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, Forslund K, Heller D, Huerta-Cepas J, Simonovic M, Roth A, Santos A, Tsafou KP *et al*: **STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life.** *Nucleic Acids Res* 2015, **43**(Database issue):D447-452.
30. Zhao B, Tumaneng K, Guan KL: **The Hippo pathway in organ size control, tissue regeneration and stem cell self-renewal.** *Nature cell biology* 2011, **13**(8):877-883.

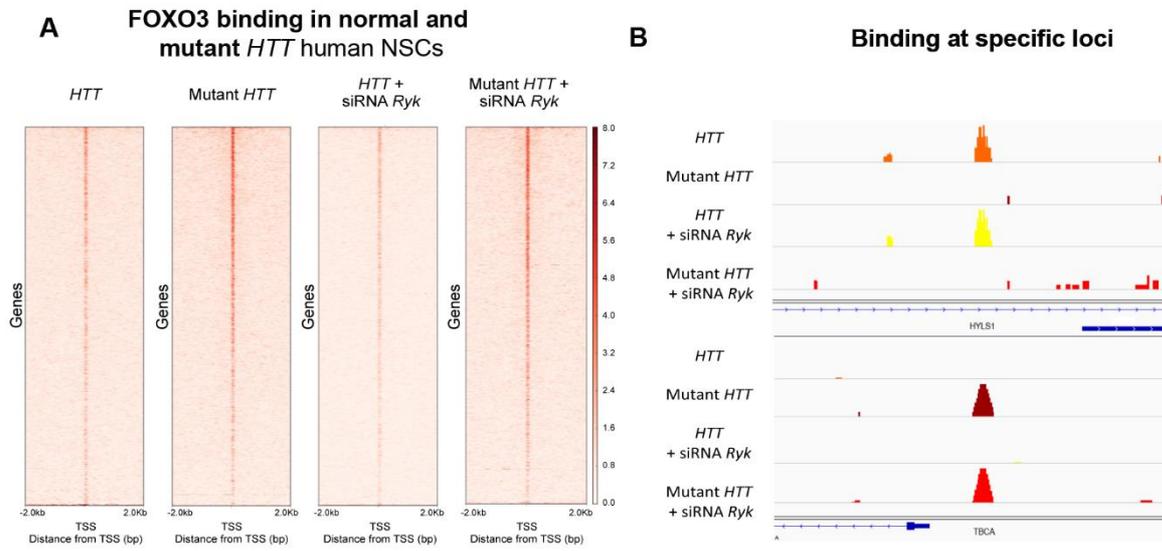
31. Biswas SC, Zhang Y, Iyirhiaro G, Willett RT, Rodriguez Gonzalez Y, Cregan SP, Slack RS, Park DS, Greene LA: **Sertad1 plays an essential role in developmental and pathological neuron death.** *J Neurosci* 2010, **30**(11):3973-3982.
32. Li J, Muscarella P, Joo SH, Knobloch TJ, Melvin WS, Weghorst CM, Tsai MD: **Dissection of CDK4-binding and transactivation activities of p34(SEI-1) and comparison between functions of p34(SEI-1) and p16(INK4A).** *Biochemistry* 2005, **44**(40):13246-13256.
33. Eijkelenboom A, Burgering BM: **FOXOs: signalling integrators for homeostasis maintenance.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013, **14**(2):83-97.
34. Alic N, Andrews TD, Giannakou ME, Papatheodorou I, Slack C, Hoddinott MP, Cocheme HM, Schuster EF, Thornton JM, Partridge L: **Genome-wide dFOXO targets and topology of the transcriptomic response to stress and insulin signalling.** *Mol Syst Biol* 2011, **7**:502.
35. Monsalve M, Olmos Y: **The complex biology of FOXO.** *Current drug targets* 2011, **12**(9):1322-1350.
36. Salih DA, Rashid AJ, Colas D, de la Torre-Ubieta L, Zhu RP, Morgan AA, Santo EE, Ucar D, Devarajan K, Cole CJ *et al*: **FoxO6 regulates memory consolidation and synaptic function.** *Genes Dev* 2012, **26**(24):2780-2801.
37. Kaletsky R, Lakhina V, Arey R, Williams A, Landis J, Ashraf J, Murphy CT: **The C. elegans adult neuronal HIS/FOXO transcriptome reveals adult phenotype regulators.** *Nature* 2016, **529**(7584):92-96.
38. **The FlyBase database of the Drosophila genome projects and community literature.** *Nucleic Acids Res* 2003, **31**(1):172-175.
39. Ng CW, Yildirim F, Yap YS, Dalin S, Matthews BJ, Velez PJ, Labadorf A, Housman DE, Fraenkel E: **Extensive changes in DNA methylation are associated with expression of mutant huntingtin.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2013, **110**(6):2354-2359.
40. Lu W, Yamamoto V, Ortega B, Baltimore D: **Mammalian Ryk is a Wnt coreceptor required for stimulation of neurite outgrowth.** *Cell* 2004, **119**(1):97-108.
41. Macheda ML, Sun WW, Kugathasan K, Hogan BM, Bower NI, Halford MM, Zhang YF, Jacques BE, Lieschke GJ, Dabdoub A *et al*: **The Wnt receptor Ryk plays a role in mammalian planar cell polarity signaling.** *J Biol Chem* 2012, **287**(35):29312-29323.

42. Yao J, Lai E, Stifani S: **The winged-helix protein brain factor 1 interacts with groucho and hes proteins to repress transcription.** *Molecular and cellular biology* 2001, **21**(6):1962-1972.
43. Tang TT, Dowbenko D, Jackson A, Toney L, Lewin DA, Dent AL, Lasky LA: **The forkhead transcription factor AFX activates apoptosis by induction of the BCL-6 transcriptional repressor.** *J Biol Chem* 2002, **277**(16):14255-14265.
44. Becker KA, Ghule PN, Therrien JA, Lian JB, Stein JL, van Wijnen AJ, Stein GS: **Self-renewal of human embryonic stem cells is supported by a shortened G1 cell cycle phase.** *J Cell Physiol* 2006, **209**(3):883-893.
45. Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME: **Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor.** *Cell* 1999, **96**(6):857-868.
46. Langmead B, Salzberg SL: **Fast gapped-read alignment with Bowtie 2.** *Nat Methods* 2012, **9**(4):357-359.
47. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R, Genome Project Data Processing S: **The Sequence Alignment/Map format and SAMtools.** *Bioinformatics* 2009, **25**(16):2078-2079.
48. Liao Y, Smyth GK, Shi W: **featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features.** *Bioinformatics* 2014, **30**(7):923-930.
49. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK: **edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data.** *Bioinformatics* 2010, **26**(1):139-140.
50. Zhang Y, Liu T, Meyer CA, Eeckhoute J, Johnson DS, Bernstein BE, Nusbaum C, Myers RM, Brown M, Li W *et al*: **Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS).** *Genome Biol* 2008, **9**(9):R137.
51. Yu G, Wang LG, He QY: **ChIPseeker: an R/Bioconductor package for ChIP peak annotation, comparison and visualization.** *Bioinformatics* 2015, **31**(14):2382-2383.
52. Ramirez F, Ryan DP, Gruning B, Bhardwaj V, Kilpert F, Richter AS, Heyne S, Dundar F, Manke T: **deepTools2: a next generation web server for deep-sequencing data analysis.** *Nucleic Acids Res* 2016, **44**(W1):W160-165.
53. Stuge U, Ellingsen JE: **[Frialit ceramic implants--a four-year follow-up study].** *Nor Tannlaegeforen Tid* 1991, **101**(9):296-303.

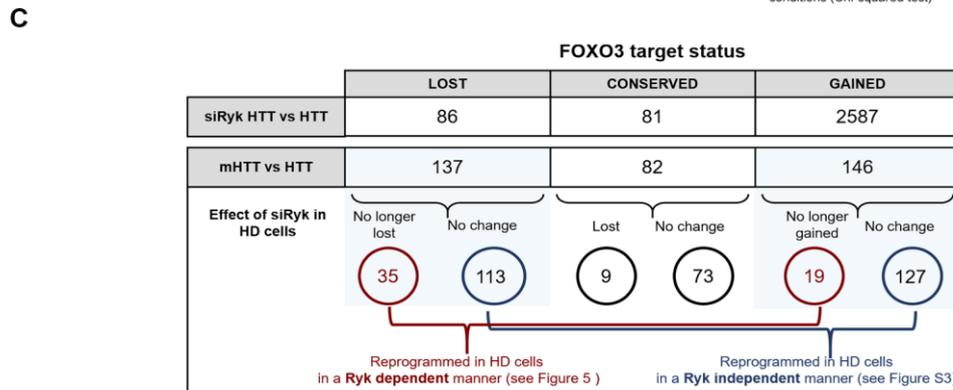
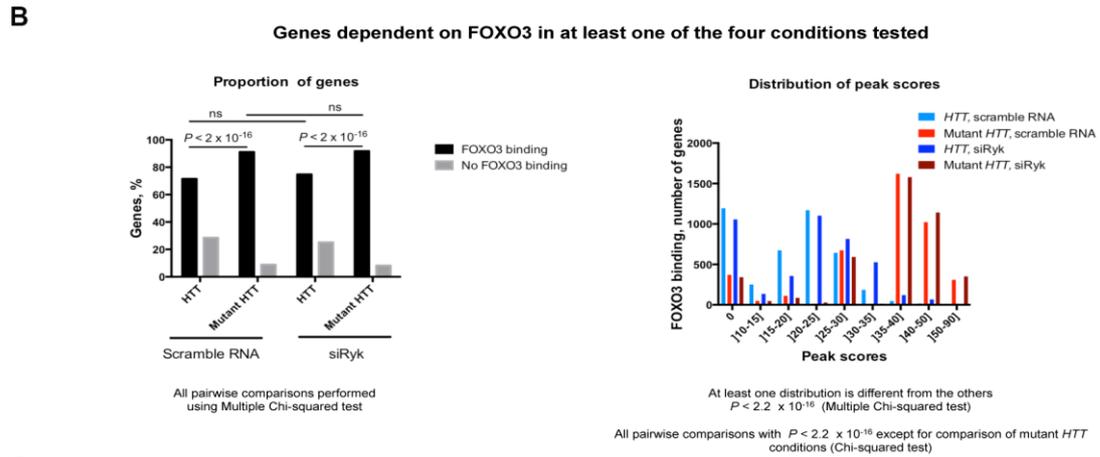
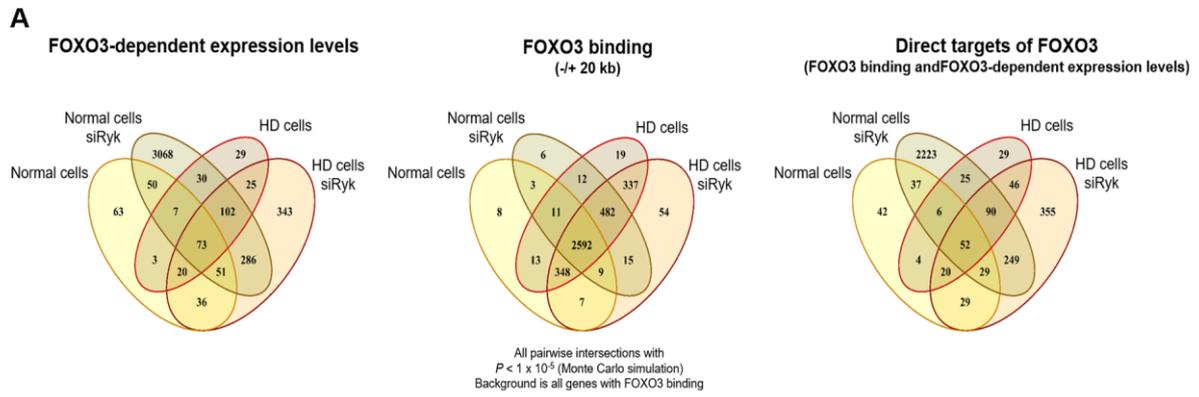
54. Kulakovskiy IV, Medvedeva YA, Schaefer U, Kasianov AS, Vorontsov IE, Bajic VB, Makeev VJ: **HOCOMOCO: a comprehensive collection of human transcription factor binding sites models.** *Nucleic Acids Res* 2013, **41**(Database issue):D195-202.
55. Durinck S, Spellman PT, Birney E, Huber W: **Mapping identifiers for the integration of genomic datasets with the R/Bioconductor package biomaRt.** *Nat Protoc* 2009, **4**(8):1184-1191.
56. Lejeune FX, Mesrob L, Parmentier F, Bicep C, Vazquez-Manrique RP, Parker JA, Vert JP, Tourette C, Neri C: **Large-scale functional RNAi screen in *C. elegans* identifies genes that regulate the dysfunction of mutant polyglutamine neurons.** *BMC Genomics* 2012, **13**:91.
57. Miller JP, Yates BE, Al-Ramahi I, Berman AE, Sanhueza M, Kim E, de Haro M, DeGiacomo F, Torcassi C, Holcomb J *et al*: **A genome-scale RNA-interference screen identifies RRAS signaling as a pathologic feature of Huntington's disease.** *PLoS Genet* 2012, **8**(11):e1003042.



**Figure 1**



**Figure 2**



**Figure 3**

Family name	Sites		<i>HTT</i> + scramble RNA	mutant <i>HTT</i> + scramble RNA	<i>HTT</i> + siRNA Ryk	mutant <i>HTT</i> + siRNA Ryk
Forkhead		<i>P value</i>	4.30E-10	2.10E-30	2.60E-15	1.80E-36
		Frequency	4	13	6	15
Homeobox		<i>P value</i>	8.70E-11	6.40E-49	1.30E-24	1.10E-59
		Frequency	14	60	41	84
Sp/KLF		<i>P value</i>	3.60E-13	2.30E-67	3.90E-26	2.10E-54
		Frequency	6	12	7	11
ETS		<i>P value</i>	1.20E-09	6.50E-29	6.70E-10	2.90E-18
		Frequency	1	10	5	10
E2F		<i>P value</i>	4.70E-10	1e -50	3.00E-17	2.30E-42
		Frequency	2	6	2	5
Pou domain		<i>P value</i>	6.10E-11	4.10E-46	1.60E-21	8.60E-56
		Frequency	2	9	9	12
Pas domain		<i>P value</i>	3.00E-10	4.30E-19	2.70E-09	9.40E-18
		Frequency	2	5	2	3
JUN		<i>P value</i>	3.50E-18	7.20E-13	2.60E-08	1.30E-10
		Frequency	2	3	1	2
Zinc finger		<i>P value</i>	7.90E-13	7.60E-36	1.40E-14	9.10E-29
		Frequency	5	19	4	15
TCF		<i>P value</i>	2.70E-10	1.10E-18	1.70E-09	3.00E-13
		Frequency	1	3	2	2
C/EBP		<i>P value</i>	4.70E-11	4.80E-37	1.30E-18	1.30E-11
		Frequency	2	1	1	3
ASCL		<i>P value</i>	N.A	1.10E-18	1.80E-09	7.30E-15
		Frequency		1	1	1
bHLH		<i>P value</i>	N.A	1.10E-17	N.A	9.60E-17
		Frequency		3		4
P53		<i>P value</i>	N.A	2.50E-09	N.A	1.90E-09
		Frequency		1		1
MEF		<i>P value</i>	1.10E-13	4.10E-36	4.50E-20	3.30E-44
		Frequency	1	4	4	4
Smad		<i>P value</i>	1.00E-10	N.A	N.A	3.80E-09
		Frequency	1			1
FOS		<i>P value</i>	2.60E-09	N.A	N.A	N.A
		Frequency	2			
SRF		<i>P value</i>	N.A	7.60E-15	N.A	N.A
		Frequency		1		
Tbrain factor		<i>P value</i>	N.A	N.A	N.A	3.60E-08
		Frequency				1

Figure 4

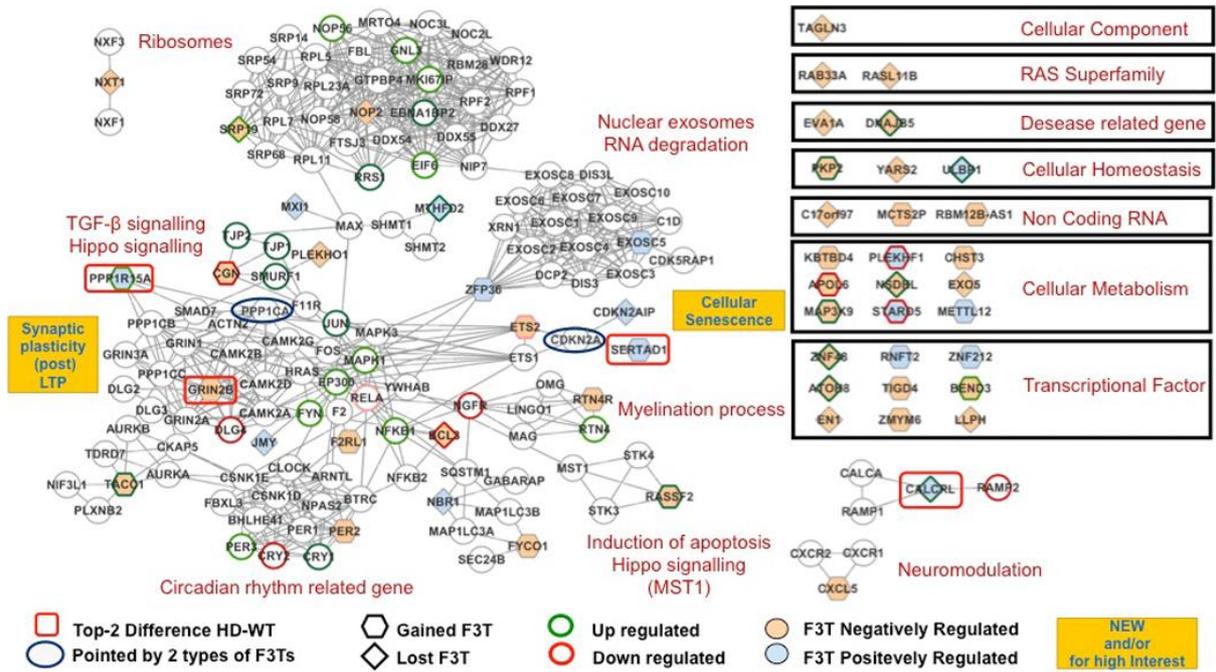
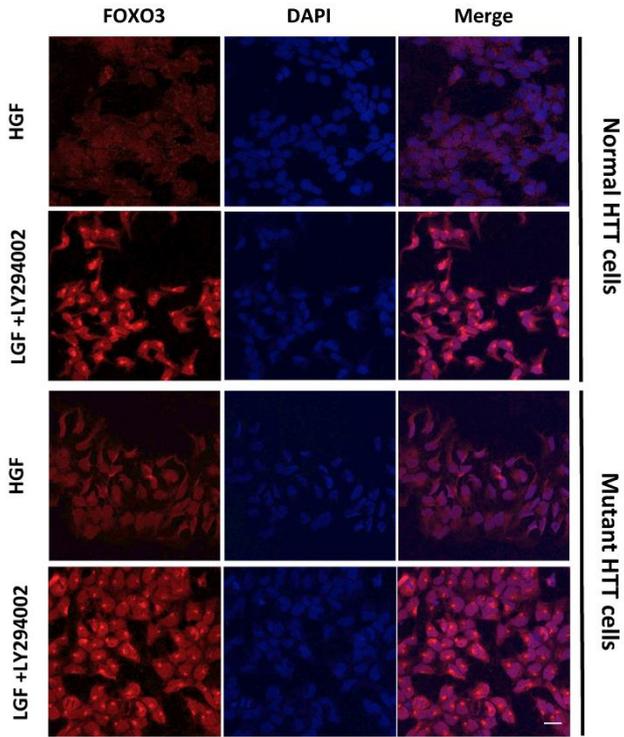
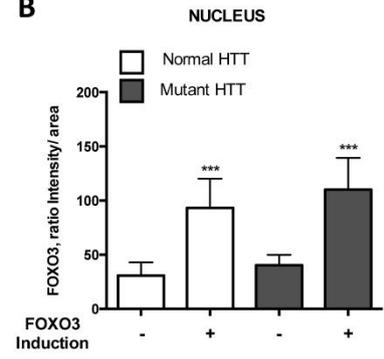
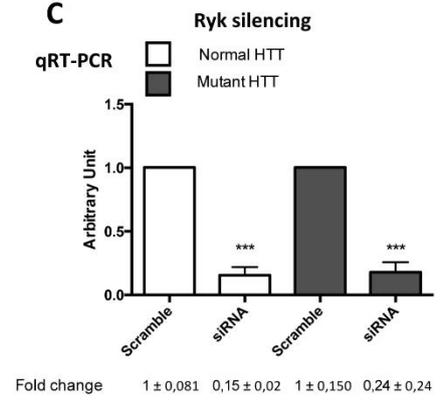


Figure 5

**A****B****C****Figure S1**

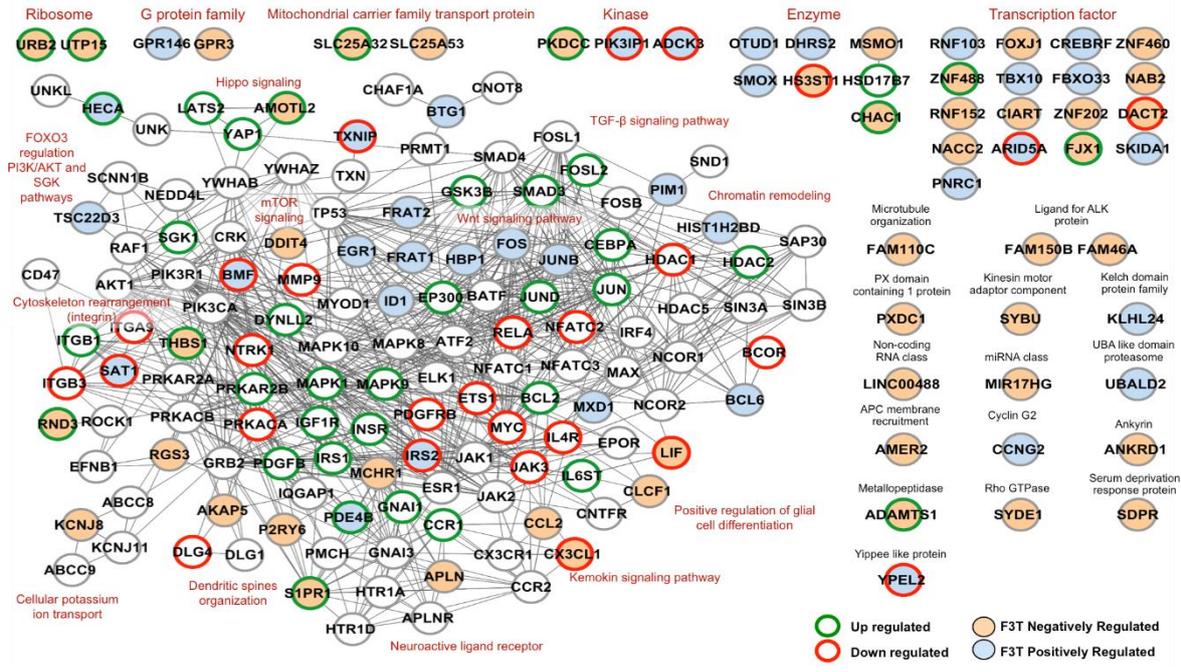


Figure S2

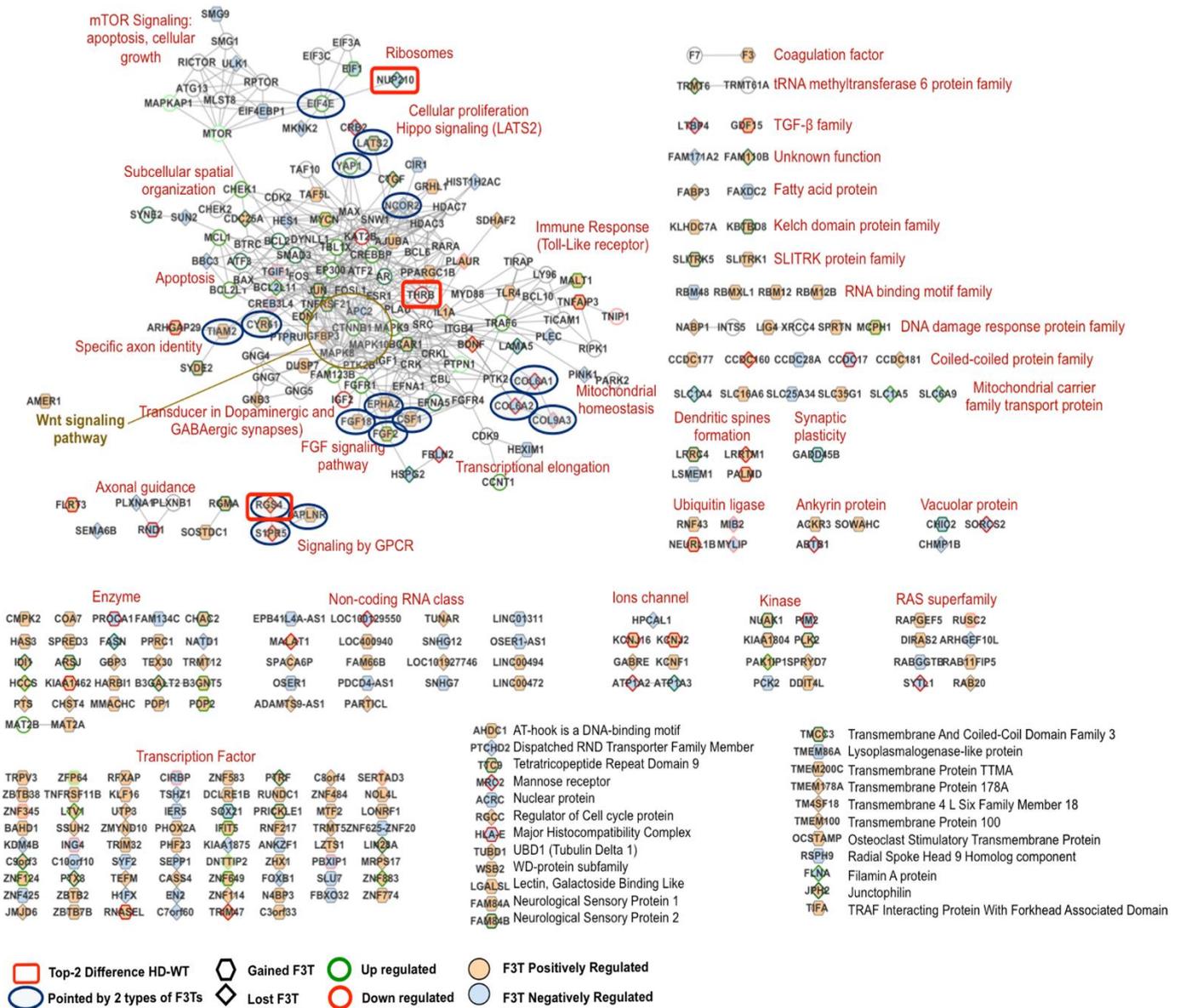


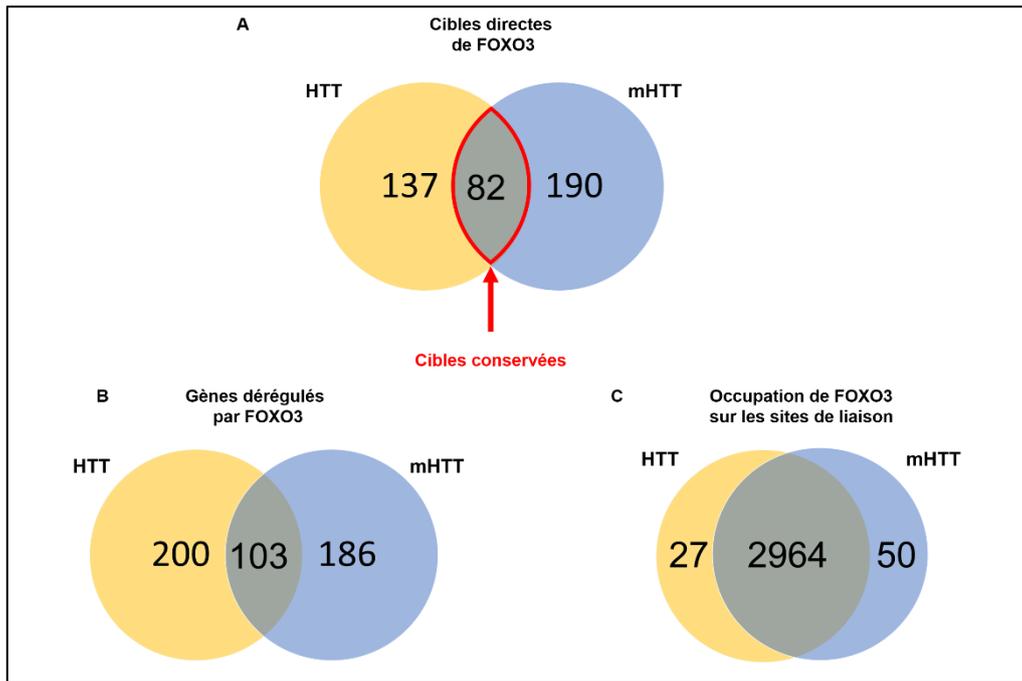
Figure S3

# Discussion

Ce travail a permis d'identifier les cibles de FOXO3 dans des cellules souches neurales humaines jusqu'alors encore non listé chez l'Homme, et confère de la nouveauté tout du moins pour un répertoire de cibles de FOXO3. Il suggère que les protéines mutées à l'origine de la maladie, telle que la huntingtine, peuvent moduler profondément le répertoire de ces cibles avec des pertes et des gains partiels de gènes cibles. Ce travail suggère aussi que le fragment Ryk-ICD est un co-facteur naturel de FOXO3. Dans des conditions normales, le fragment Ryk-ICD peut réguler l'activité du complexe  $\beta$ -caténine/FOXO. Dans des conditions pathologiques qui conduisent à l'augmentation de Ryk à la membrane plasmique et à l'augmentation du fragment Ryk-ICD dans le noyau, l'homéostasie du complexe  $\beta$ -caténine/FOXO3 est perturbée et conduirait à une reprogrammation des cibles de FOXO3.

## I) Analyses des cibles de FOXO3

Nous avons analysé les données d'expression d'ARN messagers et des sites de liaisons de FOXO3 sur l'ADN et nous avons pu mettre en évidence un modèle dans lequel les cellules souches neurales qui expriment la huntingtine mutée (72Q) peuvent reprogrammer partiellement les cibles directes de FOXO3. Les cibles considérées comme des cibles transcriptionnelles directes de FOXO3 sont les gènes dont le niveau d'expression est dépendant de l'induction de FOXO3 et qui de plus, présentent un site de liaison pour FOXO3 dans une région de  $\pm 20$  kb autour du site d'initiation de la transcription, en vertu des travaux de B. Burgering sur ce sujet (Eijkelenboom et al., 2013a).



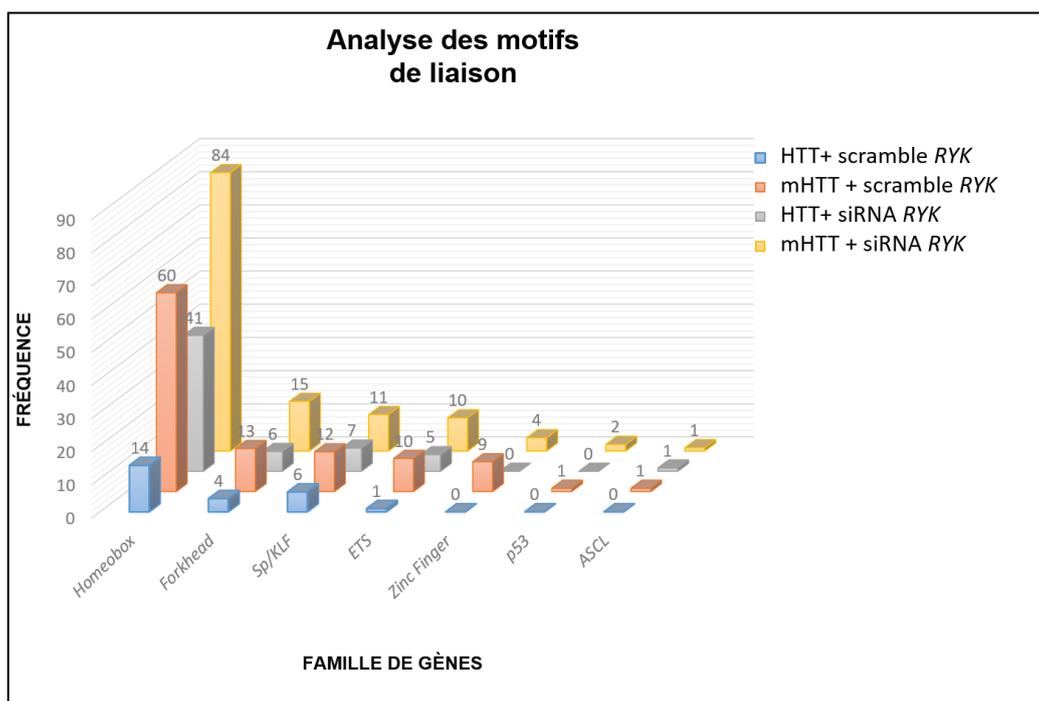
**Figure 30 : Diagrammes de Venn des données d'expression et des données des sites de liaison dans les cellules souches neurales humaines. A)** Comparaison du nombre de cibles directes de FOXO3 dans les cellules souches neurales en présence ou non de huntingtine mutée. **B)** Dérégulation des gènes cibles dans les cellules souches humaines en présence ou non de huntingtine mutée. **C)** Comparaison de l'occupation de FOXO3 sur les sites de liaison à l'ADN dans les cellules MH-NSC et contrôle.

Il nous apparaît que certaines des cibles directes de FOXO3 apparaissent comme conservées (82) tandis que d'autres sont perdues (137) ou gagnées (190) dans les cellules souches exprimant la huntingtine mutée (**Figure 30A**). En comparant les données de l'occupation des sites de liaison à l'ADN et les données de transcription, nous avons pu conclure qu'il n'y avait pas de corrélation entre la dérégulation génétique et l'occupation de FOXO3 sur les sites de liaison à l'ADN (**Figure 30B-C**). La reprogrammation des cibles ne peut donc pas être expliquée uniquement par des effets directs de l'activation transcriptionnelle par FOXO3, mais également par des effets indirects. La perte d'un gène ou la dérégulation négative d'un gène n'est pas spécifiquement corrélée avec une perte d'occupation ou une diminution d'occupation du site de liaison de FOXO3.

Nous avons aussi pu mettre en évidence qu'en présence de la huntingtine mutée, la liaison de FOXO3 à l'ADN est augmentée. Ces résultats suggèrent, qu'en plus des perturbations de la signalisation intracellulaire sur FOXO3, il y a des mécanismes qui tendent à favoriser la liaison à l'ADN de FOXO3, les deux contribuant à une modification du répertoire des cibles de ce facteur de transcription dans la maladie de Huntington.

Un des acteurs de cette reprogrammation des cibles peut être le complexe Ryk-ICD/ $\beta$ -caténine/FOXO3 suite à la perturbation fonctionnelle de la liaison entre Ryk-ICD et le complexe  $\beta$ -caténine/FOXO3 dans des cellules qui expriment la Huntingtine mutée. Comme l'indique la forte perturbation des cibles directes de FOXO3 par l'extinction de *RYK*, la voie Ryk pourrait inhiber ou restreindre l'activité transcriptionnelle de FOXO3 dans des cellules normales tandis qu'un excès de Ryk conduirait FOXO3 à réguler de nouvelles cibles dans les cellules NSC-MH, cependant en perturbant l'activité de FOXO3 de façon sélective. Cette hypothèse est appuyée par l'augmentation du nombre de cibles de FOXO3 dans les cellules NSC-contrôle après l'extinction du gène *RYK*. On dénombre 3667 cibles après extinction de *RYK* dans les cellules NSC-contrôle contre 303 cibles sans extinction de Ryk.

Au travers des analyses de l'ensemble de nos données d'expression et de liaison, nous avons pu montrer que ces changements de régulation transcriptionnelle étaient vrais pour des cibles canoniques de FOXO3 largement connues et des cibles de FOXO3 non-canoniques possédant une fonction particulière dans les neurones. Ces résultats sont appuyés par les annotations biologiques des cibles et une analyse des motifs de liaison.



**Figure 31 : Représentation des familles de motifs dans les cellules souches neurales humaines en présence de huntingtine mutée ou non et/ou extinction de *RYK*.** Analyse des motifs de séquences des sites de liaison à l'ADN de FOXO3. Les familles de motifs de liaison de type *Homeobox*, *Forkhead*, *Sp/KLF*, *ETS*, *Zinc Finger* *p53* et *ASCL* sont représentées en fonction de la huntingtine normale ou mutée et/ou de l'extinction de *RYK* dans les cellules souches neurales humaines.

Les motifs couramment et hautement enrichis dans les quatre conditions analysées comprennent le motif *Forkhead*, comme attendu, mais également les motifs *Homeobox*, *Sp/KLF*, *ETS*, *E2F*, *Pou domain*, *PAS domain*, *JUN*, *Zinc finger*, *TCF*, *C/EBP* et *MEF*. Nous avons pu constater que la mHTT augmentait considérablement la fréquence des familles *Homeobox* et *Forkhead*, et dans une moindre mesure, celle des familles *Sp/KLF* et *ETS* dans les cellules souches neurales. La famille de motif *Forkhead* semble montrer un enrichissement plus fort et une fréquence plus élevée dans les cellules NSC-MH par rapport aux cellules NSC-contrôle, quel que soit le statut de Ryk, ce qui est compatible avec l'augmentation de l'occupation de FOXO3 que nous avons observée dans les cellules NSC-MH (**Figure 31**).

D'autres motifs communs tels que *Homeobox*, *Sp / KLF*, *E2F* et *Pou domain* présentent des caractéristiques similaires à *Forkhead*, et certains motifs semblent être spécifiquement enrichis dans les cellules NSC-MH tels qu'*ASCL* et *p53* (**Figure 31**). L'extinction de Ryk ne semble pas avoir un impact significatif sur l'enrichissement et la fréquence des profils de motifs dans les cellules NSC-MH ou –contrôle, à l'exception toutefois de la famille de *Tbrain* qui est spécifiquement détectée dans les cellules NSC-MH avec Ryk (**Figure 31**). Cela vient à l'appui du modèle dans lequel la signalisation Ryk pourrait principalement moduler la régulation des gènes cibles de FOXO3 en modifiant l'homéostasie du complexe  $\beta$ -caténine/FOXO3/Ryk-ICD. L'analyse de ces motifs met en évidence de potentiels co-facteurs de FOXO3 dans les cellules neurales humaines, certains d'entre eux pouvant être spécifiques aux cellules NSC-MH, ce qui nous fournit un ensemble de cibles à étudier pour comprendre comment FOXO3 pourrait coopérer avec d'autres facteurs de transcription pour réguler l'homéostasie des cellules souches neurales humaines dans des conditions normales ou pathologiques.

## II) Etude des cibles canoniques et non-canoniques de FOXO3

Nous avons pu mettre en évidence que bon nombre de cibles canoniques sont perturbées par la mHTT. Les gènes *ULK1* et *PINK1* sont deux cibles connues de FOXO3 et sont impliqués dans la régulation de la protéostase cellulaire en activant la macroautophagie et la mitophagie (Mei et al., 2009; Lim et al., 2015). Il apparaît que ce sont des cibles positivement régulées par FOXO3 en condition normales et perdues dans les cellules souches neurales humaines en présence de mHTT. La perte de ces cibles pourrait contribuer aux perturbations du contrôle qualité, à l'altération de l'élimination des protéines mal conformées ainsi qu'au dysfonctionnement mitochondriaux. Plus largement, cela nous a

amené à penser que la reprogrammation des cibles de FOXO3 contribuerait à des effets de perte de fonction ou des gains de fonction de protéines normales.

Enfin, nous avons aussi identifié au travers de nos analyses des cibles de FOXO3 dont le changement de statut dans les cellules NSC-MH est dépendant de Ryk : *EST2*, *SERTAD1* et *CDKN2AIP*. Ce groupe de cibles est notamment impliqué dans le contrôle du cycle cellulaire. En effet la littérature nous indique que d'une part, le facteur de transcription ETS2 est un activateur transcriptionnel de *p16<sup>INK4a</sup>* (Ohtani et al., 2001; Stankiewicz and Crispino, 2009), une des protéines codées par le gène *CDKN2A*. Ce gène génère deux transcrits qui diffèrent dans le premier exon. Cependant, en dépit des différences structurales et fonctionnelles, les isoformes protéiques *p16<sup>INK4a</sup>* et *p14<sup>ARF</sup>* codés par *CDKN2A*, agissent sur la voie CDK4 et la voie p53, connues notamment pour inhiber le cycle cellulaire en réponse au stress, au niveau des transitions G1/S et G2/M, respectivement (Agarwal et al., 2013). D'autre part, le gène *SERTAD1*, peut se lier au complexe *p16<sup>INK4a</sup>/CDK4/cycline D1* et contrôler l'activation de CDK4 de manière dose-dépendante : à faible concentration, *SERTAD1* active la kinase CDK4, alors qu'à forte concentration, il inhibe l'activité de CDK4 (Li et al., 2004; Li et al., 2011a). Le gène *CDKN2AIP* (*CDKN2A Binding Protein*) aussi connu sous le nom de *CARF*, quant à lui, participerait au contrôle du cycle cellulaire en modulant la voie *p14<sup>ARF</sup>* notamment en stabilisant et en régulant l'activité de p53 (Hasan et al., 2002; Cheung et al., 2010; Kamrul et al., 2007). Si les effets de dépendance à FOXO3 se confirment dans les cellules NSC-MH, on pourrait éventuellement penser que dans la MH, la reprogrammation de cibles directes de FOXO3 participerait à la régulation du stock de cellules souches.

Le gène *NR2B* (*GRIN2B*) est également une cible directe de FOXO3. C'est une des sous-unités du récepteur NMDA. La sous-unité NR2B disparaît au cours du développement et est remplacée par la sous-unité NR2A. De plus, la sous-unité NR2B contribue à la prolifération des cellules souches neurales de l'hippocampe du rat (Li et al., 2011b). Son implication dans les phases précoces du développement en fait une cible intéressante pour étudier les effets de l'activité transcriptionnelle FOXO3 durant la différenciation neuronale et le potentiel rôle de FOXO3 dans la mise en place du réseau synaptique au cours des phases de développement.

Il serait fortement intéressant de comprendre comment ces cibles sont reprogrammées par FOXO3. En effets, les résultats suggèrent que bien que la reprogrammation pourrait être favorisée par des effets épigénétiques au niveau des sites de liaison de FOXO3 du fait d'une ouverture globale de la chromatine au niveau de ces sites,

c'est surtout des changements au niveau du complexe FOXO3/ $\beta$ -caténine/Ryk-ICD qui joueraient un rôle important.

# Discussion générale

L'hypothèse de mon travail est que FOXO3, un grand facteur de réponse au stress et de survie cellulaire qui a des effets neuroprotecteurs, joue un rôle important dans la maladie de Huntington dès la différenciation neuronale et au-delà, dans les neurones adultes. La question abordée dans ce travail est de savoir comment FOXO3 régule ses cibles pendant la différenciation neuronale et quel en est l'impact physiologique : est-ce que la régulation de ces cibles contribue globalement à la poursuite des phénomènes de différenciation, et quelles sont ces cibles? Les résultats du laboratoire (Tourette et al., 2014a) suggèrent que FOXO3 garderait un rôle protecteur sur l'homéostasie des cellules NSC-MH. Le maintien des cellules souches est d'ailleurs une des fonctions normales et importantes de FOXO3, et la question est de savoir si elle est maintenue, et comment, au cours de la différenciation neuronale dans la maladie de Huntington. Dans tous les cas, la réponse au stress cellulaire est un facteur important au cours de l'évolution de la maladie, ce qui est par exemple montré dans les analyses de modélisation informatique des données Huntington effectuées dans le laboratoire, et le postulat du laboratoire est que la réponse au stress sous contrôle de FOXO3 permet de retarder les effets cytotoxiques de la huntingtine mutée.

## I. Reprogrammation des cibles de FOXO3 dans la maladie de HTT

Le répertoire des cibles de FOXO3 est profondément remodelé en présence de huntingtine mutée dans des cellules souches neurales humaines. Bien qu'un petit groupe de cibles soit conservé, de nombreuses cibles sont gagnées ou perdues par rapport au groupe de cibles directes de FOXO3 dans les cellules souches neurales normales. Ces cibles gagnées ou perdues présentent des fonctions biologiques établies et connues de FOXO3 impliquées dans la régulation du cycle cellulaire, la régulation des mécanismes autophagiques ; et d'autres fonctions qui sont spécifiques et associées aux neurones telles que la différenciation neuronale, la formation d'épines dendritiques ou encore la transmission synaptique. L'altération des effets transcriptionnels que l'on observe ne change pas totalement les fonctions fondamentales de FOXO3 qui semblent conservées par l'intermédiaire d'un autre jeu de cibles.

Comme nous pouvions nous y attendre, certaines de nos cibles se recoupent avec d'autres données provenant de contextes cellulaires différents visant à lister les gènes cibles de FOXO3. En raison du contexte cellulaire et tissulaire dépendant de l'activité de FOXO3, il n'est pas étonnant que ces chevauchements soient restreints (Webb et al., 2016). On dénote notamment des chevauchements avec des données issues de cellules souches de souris (Paik et al., 2009a; Renault et al., 2009; Webb et al., 2016) et des données chez la

drosophile (Lu et al., 2013b). Ces listes de cibles issues de cellules souches pour la plupart, indiquent que les cibles qui sont sous le contrôle de FOXO3 tendent vers un rôle neuroprotecteur mais également, un rôle important dans la différenciation et le maintien des cellules souches normale (Paik et al., 2009a; Renault et al., 2009).

Au travers de ces données il semble que les gènes impliqués dans les fonctions conservées, soient modifiés dans les cellules souches MH. FOXO3 étant un « *master regulator* » dans la cellule, il serait plus judicieux d'analyser ces cibles, non pas au cas par cas, mais en tant que groupes de gènes influençant une fonction physiologique particulière et qui participeraient aux effets compensatoires pour pallier les pertes ou les gains de cibles.

Quels peuvent être les mécanismes qui participent aux changements de cibles dans les cellules en présence de huntingtine mutée ? Notre hypothèse de départ prenait en considération un système très simple pour expliquer la modulation des effets de FOXO3 par Ryk. Nous pensions que la présence du fragment Ryk-ICD réprimait l'activité transcriptionnelle de FOXO3 par sa liaison au complexe  $\beta$ -caténine/FOXO3. Mais il apparaît que la régulation de cette reprogrammation est beaucoup plus subtile, avec des pertes mais aussi des gains de cibles transcriptionnelles.

Tout d'abord, nous avons montré que Ryk pouvait interagir avec le complexe  $\beta$ -caténine/FOXO3 et que le fragment Ryk-ICD est à l'origine d'une diminution de l'activité transcriptionnelle de FOXO3 dans les cellules striatales de souris Huntington. De plus l'extinction de *RYK* dans les cellules souches humaines normales augmente considérablement le nombre de gènes cibles. Au vu de nos récentes conclusions, Ryk agirait comme un co-répresseur de FOXO3 et l'altération de ce complexe  $\beta$ -caténine/FOXO3 dans la maladie de Huntington, contribuerait au phénomène de reprogrammation des cibles que nous avons pu observer. Cependant nous ne savons pas si cet effet est également médié par la présence du fragment Ryk-ICD dans les cellules souches neurales humaines et si d'autres altérations des voies effectrices de la signalisation Ryk ne seraient pas en cause dans la répression des cibles de FOXO3. Ryk étant impliqué dans la signalisation des voies de signalisation PCP (Andre et al., 2012) et Wnt/ $\beta$ -caténine dépendante (Berndt et al., 2011), et on ne peut pas exclure que les effets observés soient en partie dus à une modification de ces voies.

D'autres effets possibles sont à prendre en considération dans la perturbation de ces cibles. Nous pouvons très bien envisager que des régulations d'ordre épigénétiques dans ces cellules souches neurales puissent participer à ce phénomène de reprogrammation. Bien que la dérégulation des gènes et la fixation ou non au site de liaison de FOXO3 ne

soient clairement pas corrélées dans notre étude, on observe néanmoins une forte augmentation de l'occupation des sites de liaisons sur les séquences promotrices et également amplificatrices. Nous ne savons pas si, dans ces cellules souches neurales, la présence de la huntingtine mutée conduit à une ouverture de la chromatine et rendrait plus accessible les sites de liaison de FOXO3. En revanche, de tels effets sont plausibles car il existe de nombreuses modifications de la chromatine dans la maladie de Huntington. D'une part, les histones, protéines qui modifient la structure de la chromatine, peuvent être séquestrés dans les agrégats de huntingtine mutée (Li et al., 2007a; Bannister and Kouzarides, 2011). D'autre part, la chromatine peut être altérée, par exemple au niveau des régions super-amplificatrices, ou encore être non acétylés (Li et al., 2007a ; Achour et al., 2015) avec des effets d'inhibition de l'expression de gènes important pour l'identité neuronale. En effet des profils épigénétiques précis de gènes sous-exprimés chez des modèles souris de la MH sont associés à un profil épigénétiques particulier du site d'initiation de la transcription de H3K4me3 et H3K27ac. Les gènes qui affichent ce profil particulier sont impliqués principalement dans les fonctions et les voies liées à l'activité neuronale, ce qui indique que les profils spécifiques de H3K4me3 et H3K27ac marquent des gènes qui définissent l'identité et la fonction des tissus et mets en relief un intérêt potentiel pour l'étude des signatures épigénétiques dans la MH (Vashishtha et al., 2013; Achour et al., 2015b).

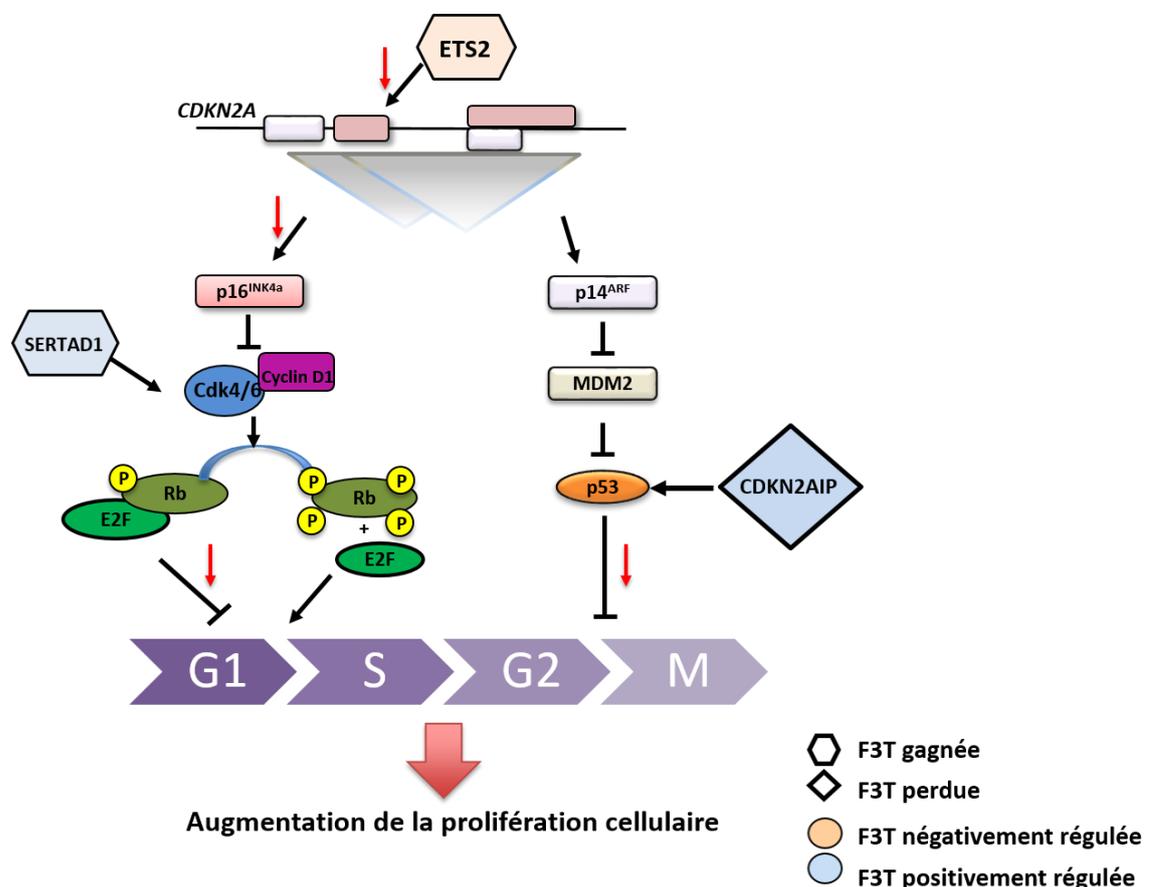
La reprogrammation des cibles de FOXO3 est un phénomène dont la régulation et l'impact physiologique dans les cellules neurales se doit d'être précisé. Notamment en ce qui concerne la régulation de ces cibles dans les neurones adultes et leur rôle pro-survie dans les cellules souches neurales.

## II. Signification biologique des phénomènes de reprogrammation des cibles de FOXO3

Quel est le rôle de FOXO3 dans les cellules souches neurales humaines ? Pour cela il nous faut comprendre si l'état physiologique de la cellule est altéré au vu des nombreux changements de cibles bien que les annotations fonctionnelles nous indiquent, qu'au global, les processus sont les mêmes. Est-ce que dans la maladie de Huntington, FOXO3 continue à favoriser le maintien du pool de cellules souches neurales et la différenciation neuronale?

On peut supposer que FOXO3 conserve ses propriétés protectrices dans les cellules NSC-MH, mais cette supposition reste à démontrer.

Afin d'étudier cet aspect, nous avons sélectionné analysé le contenu biologique de différentes catégories de cibles de FOXO3, gagnées ou perdues d'une façon dépendante ou pas de Ryk, ainsi que les cibles conservées. Remarquons à ce niveau que le risque de données incomplètes et/ou de données qui ne seraient que pour un seul patient ou génotype (en l'occurrence le phénotype 21Q/72Q) est inhérent à ce type d'étude. Cela étant, en intégrant la force des effets (dérégulation et gain ou perte de cibles) avec les cartes d'annotations fonctionnelles, et en recherchant dans les données ce qui pouvaient le plus directement pertinent à la différenciation neuronale et/ou ce qui pouvait être le plus novateur, nous avons identifié un groupe de 3 gènes qui présenterait un intérêt particulier dans la maintenance du pool de cellules souches neurales à partir desquels nous avons pu établir un modèle prédictif de régulation du cycle cellulaire et de la réponse au stress dans notre modèle.



**Figure 32 : Modèle prédictif de la répression du cycle cellulaire par trois cibles directes de FOXO3 dans les cellules souches neurales MH.** Dans notre étude, l'analyse des données RNA-seq et ChIP-seq mettrait en évidence un groupe de cibles de FOXO3 dépendantes de Ryk (*ETS2*, *SERTAD1*, *CDKN2AIP*) ayant des effets convergents sur la régulation du cycle cellulaire par les voies p16<sup>INK4a</sup> et p14<sup>ARF</sup>. Les flèches rouges indiquent les effets résultants sur la signalisation et le cycle cellulaire des NSC-MH. La prédiction est que la reprogrammation de ces 3 cibles favoriserait la prolifération de ces cellules.

Ce modèle prédictif demande à être validé, la question étant de savoir si les modifications entraînées par la mHTT sur les cibles de FOXO3 dans ces cellules ont un effet protecteur, ou pas, sur la prolifération, la sénescence ou encore la résistance au stress de ces cellules. Ce travail nous a permis de mettre en lumière un jeu de cibles de FOXO3 qui est reprogrammé lors des phases neurodéveloppementales de la maladie de Huntington. Ce travail montre directement que FOXO3 est impliqué dans la réponse au stress lors des phases très précoces de la maladie de Huntington, dans des cellules souches neurales, et ouvre la voie à des études fonctionnelles et physiologiques afin de comprendre le rôle de ce phénomène sur l'homéostasie et la différenciation de ces cellules dans la maladie de Huntington.

# Conclusion et perspectives

Nous avons mis en évidence au cours de ces travaux une reprogrammation des cibles directes de FOXO3 dans les cellules souches neurales humaines issus d'un patient atteint de la maladie de Huntington. Cette reprogrammation pourrait être médiée par une altération du complexe  $\beta$ -caténine/FOXO3 par la voie Wnt/Ryk et il pourrait être facilité par un remodelage de la chromatine dans ces cellules. Ce travail suggère que dans les cellules souches neurales MH, plusieurs mécanismes cellulaires, sous contrôle de FOXO3, sont régulés à l'identique par ce facteur de transcription et de réponse au stress. Ce travail suggère aussi que la régulation de certains mécanismes sous contrôle de FOXO3 peut être modifiée au travers d'un changement des cibles de ce facteur de transcription. Plus particulièrement, ces changements de régulation concernent les mécanismes de régulation du cycle cellulaire en réponse au stress comme par exemple le stress oxydatif et les altérations de l'ADN, mécanismes qui par ailleurs sont importants pour le maintien du pool de cellules souches.

Dans la perspective de la poursuite de ce travail, plusieurs orientations peuvent être envisagées. Dans un premier temps, il nous faudrait poursuivre la caractérisation des cibles de FOXO3 que nous avons souligné par nos analyses intégratives. En effet, il serait fortement intéressant de tester le modèle de régulation que nous avons identifié dans les cellules NSC-MH et de comprendre le rôles biologique des cibles les plus fortement altérées dans ces cellules au travers d'études portant sur la prolifération cellulaire, la vulnérabilité au stress et la sénescence cellulaire.

Dans un second temps, il est intéressant d'étudier le rôle de ces cibles, celles qui sont reprogrammées au stade cellule souche, dans des neurones DARP32<sup>+</sup> ou dans des neurones striataux. En effet, il serait grandement intéressant de savoir si certains des mécanismes sous le contrôle de FOXO3 dans les cellules NSC-MH, le sont toujours dans le cerveau adulte afin d'obtenir un modèle de régulation qui couvre tous les stades physiopathologiques de la maladie.

En conclusion, ce travail ouvre la voie à une meilleure compréhension du rôle de FOXO3 dans la maladie de Huntington, mettant en lumière l'importance des phases développementales et l'importance de ce facteur de transcription dans la dynamique de la maladie de Huntington, dès les stades neurodéveloppementaux. Dans la mesure où plusieurs des cibles humaines de FOXO3 qui sont perdues ou gagnées au cours de la neurogenèse semblent dérégulées dans le striatum de souris Huntington adulte, et dans la mesure où nous montrons aussi que FOXO3 a des effets neuroprotecteurs sur les neurones

adultes, notre étude présente un potentiel thérapeutique important pour développer des approches basées sur la stimulation des capacités et des mécanismes de compensation cellulaire ou neuronale dans la maladie de Huntington.

# Références Bibliographiques

- Aasen T, Raya A, Barrero MJ, Garreta E, Consiglio A, Gonzalez F, Vassena R, Bilic J, Pekarik V, Tiscornia G, Edel M, Boue S, Izpisua Belmonte JC (2008) Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nature biotechnology* 26:1276-1284.
- Achour M, Le Gras S, Keime C, Parmentier F, Lejeune FX, Boutillier AL, Neri C, Davidson I, Merienne K (2015a) Neuronal Identity Genes Regulated by Super-Enhancers Are Preferentially Down-Regulated in the Striatum of Huntington's Disease Mice. *Hum Mol Genet*.
- Achour M, Le Gras S, Keime C, Parmentier F, Lejeune FX, Boutillier AL, Neri C, Davidson I, Merienne K (2015b) Neuronal identity genes regulated by super-enhancers are preferentially down-regulated in the striatum of Huntington's disease mice. *Human molecular genetics* 24:3481-3496.
- Agarwal P, Sandey M, DeInnocentes P, Bird RC (2013) Tumor suppressor gene p16/INK4A/CDKN2A-dependent regulation into and out of the cell cycle in a spontaneous canine model of breast cancer. *Journal of cellular biochemistry* 114:1355-1363.
- Al-Mubarak B, Soriano FX, Hardingham GE (2009) Synaptic NMDAR activity suppresses FOXO1 expression via a cis-acting FOXO binding site: FOXO1 is a FOXO target gene. *Channels (Austin, Tex)* 3:233-238.
- Alic N, Andrews TD, Giannakou ME, Papatheodorou I, Slack C, Hoddinott MP, Cocheme HM, Schuster EF, Thornton JM, Partridge L (2011) Genome-wide dFOXO targets and topology of the transcriptomic response to stress and insulin signalling. *Mol Syst Biol* 7:502.
- Alvarez B, Martinez AC, Burgering BM, Carrera AC (2001) Forkhead transcription factors contribute to execution of the mitotic programme in mammals. *Nature* 413:744-747.
- An MC, Zhang N, Scott G, Montoro D, Wittkop T, Mooney S, Melov S, Ellerby LM (2012a) Genetic correction of Huntington's disease phenotypes in induced pluripotent stem cells. *Cell stem cell* 11:253-263.
- An MC, Zhang N, Scott G, Montoro D, Wittkop T, Mooney S, Melov S, Ellerby LM (2012b) Genetic correction of Huntington's disease phenotypes in induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 11:253-263.
- Anderson MJ, Viars CS, Czekay S, Cavenee WK, Arden KC (1998) Cloning and characterization of three human forkhead genes that comprise an FKHR-like gene subfamily. *Genomics* 47:187-199.
- Andrade MA, Bork P (1995) HEAT repeats in the Huntington's disease protein. *Nat Genet* 11:115-116.
- Andre P, Wang Q, Wang N, Gao B, Schilit A, Halford MM, Stacker SA, Zhang X, Yang Y (2012) The Wnt coreceptor Ryk regulates Wnt/planar cell polarity by modulating the degradation of the core planar cell polarity component Vangl2. *J Biol Chem* 287:44518-44525.
- Andrew SE, Goldberg YP, Kremer B, Telenius H, Theilmann J, Adam S, Starr E, Squitieri F, Lin B, Kalchman MA, et al. (1993) The relationship between trinucleotide (CAG) repeat length and clinical features of Huntington's disease. *Nat Genet* 4:398-403.

- Andrich J, Arning L, Wieczorek S, Kraus PH, Gold R, Saft C (2008) Huntington's disease as caused by 34 CAG repeats. *Mov Disord* 23:879-881.
- Anselmi CV, Malovini A, Roncarati R, Novelli V, Villa F, Condorelli G, Bellazzi R, Puca AA (2009) Association of the FOXO3A locus with extreme longevity in a southern Italian centenarian study. *Rejuvenation research* 12:95-104.
- Aoki M, Jiang H, Vogt PK (2004) Proteasomal degradation of the FoxO1 transcriptional regulator in cells transformed by the P3k and Akt oncoproteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:13613-13617.
- Aosaki T, A.M G, Kimura M (1994) Effect of the nigrostriatal dopamine system on acquired neural responses in the striatum of behaving monkeys. *Science (New York, NY)* 265:412-415.
- Apfeld J, O'Connor G, McDonagh T, DiStefano PS, Curtis R (2004) The AMP-activated protein kinase AAK-2 links energy levels and insulin-like signals to lifespan in *C. elegans*. *Genes & development* 18:3004-3009.
- Arden KC (2004) FoxO: linking new signaling pathways. *Molecular cell* 14:416-418.
- Aroui S, Dardevet L, Najlaoui F, Kammoun M, Laajimi A, Fetoui H, De Waard M, Kenani A (2016) PTEN-regulated AKT/FoxO3a/Bim signaling contributes to Human cell glioblastoma apoptosis by platinum-maurocalcin conjugate. *The international journal of biochemistry & cell biology* 77:15-22.
- Arrasate M, Mitra S, Schweitzer ES, Segal MR, Finkbeiner S (2004) Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death. *Nature* 431:805-810.
- Aubry L, Bugi A, Lefort N, Rousseau F, Peschanski M, Perrier AL (2008) Striatal progenitors derived from human ES cells mature into DARPP32 neurons in vitro and in quinolinic acid-lesioned rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105:16707-16712.
- Baker DJ, Childs BG, Durik M, Wijers ME, Sieben CJ, Zhong J, Saltness RA, Jeganathan KB, Verzosa GC, Pezeshki A, Khazaie K, Miller JD, van Deursen JM (2016) Naturally occurring p16(Ink4a)-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature* 530:184-189.
- Bakker WJ, van Dijk TB, Parren-van Amelsvoort M, Kolbus A, Yamamoto K, Steinlein P, Verhaak RGW, Mak TW, Beug H, Lowenberg B, von Lindern M (2007) Differential Regulation of Foxo3a Target Genes in Erythropoiesis. *Molecular and cellular biology* 27:3839-3854.
- Balch WE, Morimoto RI, Dillin A, Kelly JW (2008) Adapting proteostasis for disease intervention. *Science (New York, NY)* 319:916-919.
- Bamford KA, Caine ED, Kido DK, Cox C, Shoulson I (1995) A prospective evaluation of cognitive decline in early Huntington's disease: functional and radiographic correlates. *Neurology* 45:1867-1873.
- Banez-Coronel M, Ayhan F, Tarabochia AD, Zu T, Perez BA, Tusi SK, Pletnikova O, Borchelt DR, Ross CA, Margolis RL, Yachnis AT, Troncoso JC, Ranum LP (2015) RAN Translation in Huntington Disease. *Neuron* 88:667-677.
- Bannister AJ, Kouzarides T (2011) Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell research* 21:381-395.
- Barker N, Morin PJ, Clevers H (2000) The Yin-Yang of TCF/beta-catenin signaling. *Advances in cancer research* 77:1-24.

- Baydyuk M, Xu B (2014) BDNF signaling and survival of striatal neurons. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 8:254.
- Beal MF (2005) Mitochondria take center stage in aging and neurodegeneration. *Ann Neurol* 58:495-505.
- Beal MF, Kowall NW, Ellison DW, Mazurek MF, Swartz KJ, Martin JB (1986) Replication of the neurochemical characteristics of Huntington's disease by quinolinic acid. *Nature* 321:168-171.
- Beal MF, Brouillet E, Jenkins BG, Ferrante RJ, Kowall NW, Miller JM, Storey E, Srivastava R, Rosen BR, Hyman BT (1993) Neurochemical and histologic characterization of striatal excitotoxic lesions produced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 13:4181-4192.
- Beaulieu JF (2015) Tuning WNT-beta-catenin signaling via BCL9 proteins for targeting colorectal cancer cells. *EBioMedicine* 2:1846-1847.
- Becker KA, Ghule PN, Therrien JA, Lian JB, Stein JL, van Wijnen AJ, Stein GS (2006) Self-renewal of human embryonic stem cells is supported by a shortened G1 cell cycle phase. *J Cell Physiol* 209:883-893.
- Becker W, Sippl W (2011) Activation, regulation, and inhibition of DYRK1A. *The FEBS journal* 278:246-256.
- Bedard C, Wallman MJ, Pourcher E, Gould PV, Parent A, Parent M (2011) Serotonin and dopamine striatal innervation in Parkinson's disease and Huntington's chorea. *Parkinsonism & related disorders* 17:593-598.
- Belletti B, Nicoloso MS, Schiappacassi M, Chimienti E, Berton S, Lovat F, Colombatti A, Baldassarre G (2005) p27(kip1) functional regulation in human cancer: a potential target for therapeutic designs. *Current medicinal chemistry* 12:1589-1605.
- Benchoua A, Trioulier Y, Diguët E, Malgorn C, Gaillard MC, Dufour N, Elalouf JM, Krajewski S, Hantraye P, Deglon N, Brouillet E (2008) Dopamine determines the vulnerability of striatal neurons to the N-terminal fragment of mutant huntingtin through the regulation of mitochondrial complex II. *Human molecular genetics* 17:1446-1456.
- Benchoua A, Trioulier Y, Zala D, Zaïllard M-C, Lefort N, Dufour N, Saudou F, Elalouf JM, Hirsch E, Hantraye P, Deglon N, Brouillet E (2006) Involvement of mitochondrial complex II defects in neuronal death produced by N-terminus fragment of mutated huntingtin. *Molecular biology of the cell* 17:1652-1663.
- Benn CL, Sun T, Sadri-Vakili G, McFarland KN, DiRocco DP, Yohrling GJ, Clark TW, Bouzou B, Cha JH (2008) Huntingtin modulates transcription, occupies gene promoters in vivo, and binds directly to DNA in a polyglutamine-dependent manner. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28:10720-10733.
- Berezovska O, Lleo A, Herl LD, Frosch MP, Stern EA, Bacskai BJ, Hyman BT (2005) Familial Alzheimer's disease presenilin 1 mutations cause alterations in the conformation of presenilin and interactions with amyloid precursor protein. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25:3009-3017.
- Berndt JD, Aoyagi A, Yang P, Anastas JN, Tang L, Moon RT (2011) Mindbomb 1, an E3 ubiquitin ligase, forms a complex with RYK to activate Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *The Journal of cell biology* 194:737-750.

- Bi W, Xiao L, Jia Y, Wu J, Xie Q, Ren J, Ji G, Yuan Z (2010) c-Jun N-terminal kinase enhances MST1-mediated pro-apoptotic signaling through phosphorylation at serine 82. *The Journal of biological chemistry* 285:6259-6264.
- Biswas SC, Zhang Y, Iyirhiaro G, Willett RT, Rodriguez Gonzalez Y, Cregan SP, Slack RS, Park DS, Greene LA (2010) Sertad1 plays an essential role in developmental and pathological neuron death. *J Neurosci* 30:3973-3982.
- Bjorkqvist M et al. (2008) A novel pathogenic pathway of immune activation detectable before clinical onset in Huntington's disease. *The Journal of experimental medicine* 205:1869-1877.
- Blakely BD, Bye CR, Fernando CV, Prasad AA, Pasterkamp RJ, Macheda ML, Stacker SA, Parish CL (2013) Ryk, a receptor regulating Wnt5a-mediated neurogenesis and axon morphogenesis of ventral midbrain dopaminergic neurons. *Stem Cells Dev* 22:2132-2144.
- Blazeski A, Zhu R, Hunter DW, Weinberg SH, Zambidis ET, Tung L (2012) Cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells as models for normal and diseased cardiac electrophysiology and contractility. *Progress in biophysics and molecular biology* 110:166-177.
- Blelloch R, Venere M, Yen J, Ramalho-Santos M (2007) Generation of induced pluripotent stem cells in the absence of drug selection. *Cell stem cell* 1:245-247.
- Bock C, Kiskinis E, Verstappen G, Gu H, Boulting G, Smith ZD, Ziller M, Croft GF, Amoroso MW, Oakley DH, Gnirke A, Eggan K, Meissner A (2011) Reference Maps of Human ES and iPS Cell Variation Enable High-Throughput Characterization of Pluripotent Cell Lines. *Cell* 144:439-452.
- Bodner RA, Outeiro TF, Altmann S, Maxwell MM, Cho SH, Hyman BT, McLean PJ, Young AB, Housman DE, Kazantsev AG (2006) Pharmacological promotion of inclusion formation: a therapeutic approach for Huntington's and Parkinson's diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:4246-4251.
- Borovecki F, Lovrecic L, Zhou J, Jeong H, Then F, Rosas HD, Hersch SM, Hogarth P, Bouzou B, Jensen RV, Krainc D (2005) Genome-wide expression profiling of human blood reveals biomarkers for Huntington's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:11023-11028.
- Bossy-Wetzel E, Petrilli A, Knott AB (2008) Mutant huntingtin and mitochondrial dysfunction. *Trends in neurosciences* 31:609-616.
- Boura E, Rezabkova L, Brynda J, Obsilova V, Obsil T (2010) Structure of the human FOXO4-DBD-DNA complex at 1.9 Å resolution reveals new details of FOXO binding to the DNA. *Acta crystallographica Section D, Biological crystallography* 66:1351-1357.
- Bovolenta P, Rodriguez J, Esteve P (2006) Frizzled/RYK mediated signalling in axon guidance. *Development* 133:4399-4408.
- Bradford J, Shin JY, Roberts M, Wang CE, Sheng G, Li S, Li XJ (2010) Mutant huntingtin in glial cells exacerbates neurological symptoms of Huntington disease mice. *The Journal of biological chemistry* 285:10653-10661.
- Brennan KJ, Simone A, Jou J, Gelboin-Burkhart C, Tran N, Sangar S, Li Y, Mu Y, Chen G, Yu D, McCarthy S, Sebat J, Gage FH (2011) Modelling schizophrenia using human induced pluripotent stem cells. *Nature* 473:221-225.

- Brinkman RR, Mezei MM, Theilmann J, Almqvist E, Hayden MR (1997) The likelihood of being affected with Huntington disease by a particular age, for a specific CAG size. *Am J Hum Genet* 60:1202-1210.
- Brons IG, Smithers LE, Trotter MW, Rugg-Gunn P, Sun B, Chuva de Sousa Lopes SM, Howlett SK, Clarkson A, Ahrlund-Richter L, Pedersen RA, Vallier L (2007) Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature* 448:191-195.
- Brownawell AM, Kops GJ, Macara IG, Burgering BM (2001) Inhibition of nuclear import by protein kinase B (Akt) regulates the subcellular distribution and activity of the forkhead transcription factor AFX. *Molecular and cellular biology* 21:3534-3546.
- Browne SE, Bowling AC, MacGarvey U, Baik MJ, Berger SC, Muqit MM, Bird ED, Beal MF (1997) Oxidative damage and metabolic dysfunction in Huntington's disease: selective vulnerability of the basal ganglia. *Ann Neurol* 41:646-653.
- Brunet A, Park J, Tran H, Hu LS, Hemmings BA, Greenberg ME (2001) Protein kinase SGK mediates survival signals by phosphorylating the forkhead transcription factor FKHRL1 (FOXO3a). *Molecular and cellular biology* 21:952-965.
- Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME (1999a) Akt Promotes Cell Survival by Phosphorylating and Inhibiting a Forkhead Transcription Factor. *Cell* 96:857-868.
- Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME (1999b) Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96:857-868.
- Brunet A, Kanai F, Stehn J, Xu J, Sarbassova D, Frangioni JV, Dalal SN, DeCaprio JA, Greenberg ME, Yaffe MB (2002) 14-3-3 transits to the nucleus and participates in dynamic nucleocytoplasmic transport. *The Journal of cell biology* 156:817-828.
- Brunet A, Sweeney LB, Sturgill JF, Chua KF, Greer PL, Lin Y, Tran H, Ross SE, Mostoslavsky R, Cohen HY, Hu LS, Cheng HL, Jedrychowski MP, Gygi SP, Sinclair DA, Alt FW, Greenberg ME (2004) Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science (New York, NY)* 303:2011-2015.
- Brustovetsky N, Brustovetsky T, Purl KJ, Capano M, Crompton M, Dubinsky JM (2003) Increased susceptibility of striatal mitochondria to calcium-induced permeability transition. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23:4858-4867.
- Budworth H, McMurray CT (2013) A brief history of triplet repeat diseases. *Methods Mol Biol* 1010:3-17 LID - 10.1007/978-1001-62703-62411-62701\_62701 [doi].
- Burgering BM, Kops GJ (2002) Cell cycle and death control: long live Forkheads. *Trends in biochemical sciences* 27:352-360.
- Cadigan KM, Liu YI (2006) Wnt signaling: complexity at the surface. *Journal of cell science* 119:395-402.
- Camnasio S et al. (2012) The first reported generation of several induced pluripotent stem cell lines from homozygous and heterozygous Huntington's disease patients demonstrates mutation related enhanced lysosomal activity. *Neurobiology of Disease* 46:41-51.
- Cantley LC (2002) The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science (New York, NY)* 296:1655-1657.

- Cary LC, Goebel M, Corsaro BG, Wang HG, Rosen E, Fraser MJ (1989) Transposon mutagenesis of baculoviruses: analysis of *Trichoplusia ni* transposon IFP2 insertions within the FP-locus of nuclear polyhedrosis viruses. *Virology* 172:156-169.
- Castrillon DH, Miao L, Kollipara R, Horner JW, DePinho RA (2003) Suppression of ovarian follicle activation in mice by the transcription factor Foxo3a. *Science (New York, NY)* 301:215-218.
- Caviston JP, Zajac AL, Tokito M, Holzbaur EL (2011) Huntingtin coordinates the dynein-mediated dynamic positioning of endosomes and lysosomes. *Molecular biology of the cell* 22:478-492.
- Caviston JP, Ross JL, Antony SM, Tokito M, Holzbaur EL (2007) Huntingtin facilitates dynein/dynactin-mediated vesicle transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:10045-10050.
- Cha JH, Kosinski CM, Kerner JA, Alsdorf SA, Mangiarini L, Davies SW, Penney JB, Bates GP, Young AB (1998) Altered brain neurotransmitter receptors in transgenic mice expressing a portion of an abnormal human huntington disease gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:6480-6485.
- Chambers SM, Fasano CA, Papapetrou EP, Tomishima M, Sadelain M, Studer L (2009) Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nature biotechnology* 27:275-280.
- Chang DT, Rintoul GL, Pandipati S, Reynolds IJ (2006) Mutant huntingtin aggregates impair mitochondrial movement and trafficking in cortical neurons. *Neurobiol Dis* 22:388-400.
- Chapuis N, Park S, Leotoing L, Tamburini J, Verdier F, Bardet V, Green AS, Willems L, Agou F, Ifrah N, Dreyfus F, Bismuth G, Baud V, Lacombe C, Mayeux P, Bouscary D (2010) I $\kappa$ B kinase overcomes PI3K/Akt and ERK/MAPK to control FOXO3a activity in acute myeloid leukemia. *Blood* 116:4240-4250.
- Charvin D, Vanhoutte P, Pages C, Borrelli E, Caboche J (2005) Unraveling a role for dopamine in Huntington's disease: the dual role of reactive oxygen species and D2 receptor stimulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:12218-12223.
- Chen C, Liu Y, Liu Y, Zheng P (2009) mTOR regulation and therapeutic rejuvenation of aging hematopoietic stem cells. *Science signaling* 2:ra75.
- Chen H, Detmer SA, Ewald AJ, Griffin EE, Fraser SE, Chan DC (2003a) Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *The Journal of cell biology* 160:189-200.
- Chen ZY, He CY, Kay MA (2005) Improved production and purification of minicircle DNA vector free of plasmid bacterial sequences and capable of persistent transgene expression in vivo. *Human gene therapy* 16:126-131.
- Chen ZY, He CY, Ehrhardt A, Kay MA (2003b) Minicircle DNA vectors devoid of bacterial DNA result in persistent and high-level transgene expression in vivo. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 8:495-500.
- Cheung CT, Kaul SC, Wadhwa R (2010) Molecular bridging of aging and cancer: A CARF link. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1197:129-133.
- Chin MH et al. (2009) Induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells are distinguished by gene expression signatures. *Cell stem cell* 5:111-123.

- Chipuk JE, Green DR (2009) PUMA cooperates with direct activator proteins to promote mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis. *Cell cycle* (Georgetown, Tex) 8:2692-2696.
- Choe KP, Przybysz AJ, Strange K (2009) The WD40 Repeat Protein WDR-23 Functions with the CUL4/DDB1 Ubiquitin Ligase To Regulate Nuclear Abundance and Activity of SKN-1 in *Caenorhabditis elegans*. *Molecular and cellular biology* 29:2704-2715.
- Choo YS, Johnson GV, MacDonald M, Detloff PJ, Lesort M (2004) Mutant huntingtin directly increases susceptibility of mitochondria to the calcium-induced permeability transition and cytochrome c release. *Human molecular genetics* 13:1407-1420.
- Choudhary C, Kumar C, Gnad F, Nielsen ML, Rehman M, Walther TC, Olsen JV, Mann M (2009) Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science (New York, NY)* 325:834-840.
- Chung YM, Park S-H, Tsai W-B, Wang S-Y, Ikeda M-A, Berek JS, Chen DJ, Hu MCT (2012) FOXO3 signalling links ATM to the p53 apoptotic pathway following DNA damage. *Nature communications* 3:1000.
- Cirillo LA, Zaret KS (2007) Specific interactions of the wing domains of FOXA1 transcription factor with DNA. *Journal of molecular biology* 366:720-724.
- Clark CE, Nourse CC, Cooper HM (2012) The tangled web of non-canonical Wnt signalling in neural migration. *Neuro-Signals* 20:202-220.
- Clark KL, Halay ED, Lai E, Burley SK (1993) Co-crystal structure of the HNF-3/fork head DNA-recognition motif resembles histone H5. *Nature* 364:412-420.
- Codogno P, Mehrpour M, Proikas-Cezanne T (2012) Canonical and non-canonical autophagy: variations on a common theme of self-eating? *Nature reviews Molecular cell biology* 13:7-12.
- Cohen E, Bieschke J, Perciavalle RM, Kelly JW, Dillin A (2006) Opposing activities protect against age-onset proteotoxicity. *Science (New York, NY)* 313:1604-1610.
- Cohen E, Du D, Joyce D, Kapernick EA, Volovik Y, Kelly JW, Dillin A (2009) Temporal requirements of insulin/IGF-1 signaling for proteotoxicity protection. *Aging Cell*.
- Coles R, Caswell R, Rubinsztein DC (1998) Functional analysis of the Huntington's disease (HD) gene promoter. *Human molecular genetics* 7:791-800.
- Colin E, Zala D, Liot G, Rangone H, Borrell-Pages M, Li XJ, Saudou F, Humbert S (2008) Huntingtin phosphorylation acts as a molecular switch for anterograde/retrograde transport in neurons. *The EMBO journal* 27:2124-2134.
- Conforti P, Mas Monteys A, Zuccato C, Buckley NJ, Davidson B, Cattaneo E (2013) In vivo delivery of DN:REST improves transcriptional changes of REST-regulated genes in HD mice. *Gene Ther* 20:678-685.
- Cui L, Jeong H, Borovecki F, Parkhurst CN, Tanese N, Krainc D (2006) Transcriptional repression of PGC-1alpha by mutant huntingtin leads to mitochondrial dysfunction and neurodegeneration. *Cell* 127:59-69.
- Daggett A, Yang XW (2013) Huntington's disease: easing the NMDAR traffic jam. *Nature medicine* 19:971-973.
- Daitoku H, Hatta M, Matsuzaki H, Aratani S, Ohshima T, Miyagishi M, Nakajima T, Fukamizu A (2004) Silent information regulator 2 potentiates Foxo1-mediated transcription through its deacetylase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:10042-10047.
- Damiano M, Galvan L, Deglon N, Brouillet E (2010) Mitochondria in Huntington's disease. *Biochim Biophys Acta* 1802:52-61.

- Damiano M, Diguët E, Malgorn C, D'Aurelio M, Galvan L, Petit F, Benhaim L, Guillemier M, Houitte D, Dufour N, Hantraye P, Canals JM, Alberch J, Delzescaux T, Deglon N, Beal MF, Brouillet E (2013) A role of mitochondrial complex II defects in genetic models of Huntington's disease expressing N-terminal fragments of mutant huntingtin. *Human molecular genetics* 22:3869-3882.
- Davies SW, Turmaine M, Cozens BA, DiFiglia M, Sharp AH, Ross CA, Scherzinger E, Wanker EE, Mangiarini L, Bates GP (1997) Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. *Cell* 90:537-548.
- De A (2011) Wnt/Ca<sup>2+</sup> signaling pathway: a brief overview. *Acta biochimica et biophysica Sinica* 43:745-756.
- De Rooij KE, De Koning Gans PA, Roos RA, Van Ommen GJ, Den Dunnen JT (1995) Somatic expansion of the (CAG)<sub>n</sub> repeat in Huntington disease brains. *Hum Genet* 95:270-274.
- Decimo I, Bifari F, Krampera M, Fumagalli G (2012) Neural Stem Cell Niches in Health and Diseases. *Current Pharmaceutical Design* 18:1755-1783.
- del Toro D, Alberch J, Lazaro-Diequez F, Martin-Ibanez R, Xifro X, Egea G, Canals JM (2009) Mutant huntingtin impairs post-Golgi trafficking to lysosomes by delocalizing optineurin/Rab8 complex from the Golgi apparatus. *Molecular biology of the cell* 20:1478-1492.
- Deng J, Shoemaker R, Xie B, Gore A, LeProust EM, Antosiewicz-Bourget J, Egli D, Maherali N, Park IH, Yu J, Daley GQ, Eggan K, Hochedlinger K, Thomson J, Wang W, Gao Y, Zhang K (2009) Targeted bisulfite sequencing reveals changes in DNA methylation associated with nuclear reprogramming. *Nature biotechnology* 27:353-360.
- Deshpande R, Inoue T, Priess JR, Hill RJ (2005) lin-17/Frizzled and lin-18 regulate POP-1/TCF-1 localization and cell type specification during *C. elegans* vulval development. *Dev Biol* 278:118-129.
- Desplats PA, Kass KE, Gilmartin T, Stanwood GD, Woodward EL, Head SR, Sutcliffe JG, Thomas EA (2006) Selective deficits in the expression of striatal-enriched mRNAs in Huntington's disease. *Journal of neurochemistry* 96:743-757.
- DiFiglia M, Sapp E, Chase KO, Davies SW, Bates GP, Vonsattel JP, Aronin N (1997) Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science (New York, NY)* 277:1990-1993.
- DiFiglia M, Sapp E, Chase K, Schwarz C, Meloni A, Young C, Martin E, Vonsattel JP, Carraway R, Reeves SA, et al. (1995) Huntingtin is a cytoplasmic protein associated with vesicles in human and rat brain neurons. *Neuron* 14:1075-1081.
- Dijkers PF, Medema RH, Lammers JW, Koenderman L, Coffey PJ (2000a) Expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim is regulated by the forkhead transcription factor FKHR-L1. *Curr Biol* 10:1201-1204.
- Dijkers PF, Birkenkamp KU, Lam EW, Thomas NS, Lammers JW, Koenderman L, Coffey PJ (2002) FKHR-L1 can act as a critical effector of cell death induced by cytokine withdrawal: protein kinase B-enhanced cell survival through maintenance of mitochondrial integrity. *The Journal of cell biology* 156:531-542.
- Dijkers PF, Medema RH, Pals C, Banerji L, Thomas NSB, Lam EWF, Burgering BMT, Raaijmakers JAM, Lammers J-WJ, Koenderman L, Coffey PJ (2000b) Forkhead Transcription Factor FKHR-L1 Modulates Cytokine-Dependent Transcriptional Regulation of p27KIP1. *Molecular and cellular biology* 20:9138-9148.

- Doi A, Park IH, Wen B, Murakami P, Aryee MJ, Irizarry R, Herb B, Ladd-Acosta C, Rho J, Loewer S, Miller J, Schlaeger T, Daley GQ, Feinberg AP (2009) Differential methylation of tissue- and cancer-specific CpG island shores distinguishes human induced pluripotent stem cells, embryonic stem cells and fibroblasts. *Nature genetics* 41:1350-1353.
- Dompierre JP, Godin JD, Charrin BC, Cordelieres FP, King SJ, Humbert S, Saudou F (2007) Histone deacetylase 6 inhibition compensates for the transport deficit in Huntington's disease by increasing tubulin acetylation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27:3571-3583.
- Donlon TA, Curb JD, He Q, Grove JS, Masaki KH, Rodriguez B, Elliott A, Willcox DC, Willcox BJ (2012) FOXO3 Gene Variants and Human Aging: Coding Variants May Not Be Key Players. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences* 67:1132-1139.
- Draper JS, Moore HD, Ruban LN, Gokhale PJ, Andrews PW (2004) Culture and characterization of human embryonic stem cells. *Stem cells and development* 13:325-336.
- Duan W, Jiang M, Jin J (2014) Metabolism in HD: Still a relevant mechanism? *Movement Disorders* 29:1366-1374.
- Duff K, Paulsen J, Mills J, Beglinger LJ, Moser DJ, Smith MM, Langbehn D, Stout J, Queller S, Harrington DL, On behalf of the P-HDI, Coordinators of the Huntington Study G (2010) Mild cognitive impairment in prediagnosed Huntington disease(e-Pub ahead of print). *Neurology* 75:500-507.
- Dunah AW, Jeong H, Griffin A, Kim YM, Standaert DG, Hersch SM, Mouradian MM, Young AB, Tanese N, Krainc D (2002) Sp1 and TAFII130 transcriptional activity disrupted in early Huntington's disease. *Science (New York, NY)* 296:2238-2243.
- Durinck S, Spellman PT, Birney E, Huber W (2009) Mapping identifiers for the integration of genomic datasets with the R/Bioconductor package biomaRt. *Nat Protoc* 4:1184-1191.
- Duyao M, Ambrose C, Myers R, Novelletto A, Persichetti F, Frontali M, Folstein S, Ross C, Franz M, Abbott M, et al. (1993) Trinucleotide repeat length instability and age of onset in Huntington's disease. *Nat Genet* 4:387-392.
- Ebert AD, Yu J, Rose FF, Jr., Mattis VB, Lorson CL, Thomson JA, Svendsen CN (2009) Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature* 457:277-280.
- Egawa N et al. (2012) Drug screening for ALS using patient-specific induced pluripotent stem cells. *Science translational medicine* 4:145ra104.
- Eijkelenboom A, Burgering BM (2013) FOXOs: signalling integrators for homeostasis maintenance. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14:83-97.
- Eijkelenboom A, Mokry M, Smits LM, Nieuwenhuis EE, Burgering BM (2013a) FOXO3 selectively amplifies enhancer activity to establish target gene regulation. *Cell Rep* 5:1664-1678.
- Eijkelenboom A, Mokry M, de Wit E, Smits LM, Polderman PE, van Triest MH, van Boxtel R, Schulze A, de Laat W, Cuppen E, Burgering BM (2013b) Genome-wide analysis of FOXO3 mediated transcription regulation through RNA polymerase II profiling. *Mol Syst Biol* 9:638.
- Eisenmann DM (2005) Wnt signaling. *WormBook*:1-17.

- Engelender S, Sharp AH, Colomer V, Tokito MK, Lanahan A, Worley P, Holzbaur EL, Ross CA (1997) Huntingtin-associated protein 1 (HAP1) interacts with the p150Glued subunit of dynactin. *Human molecular genetics* 6:2205-2212.
- Essaghir A, Dif N, Marbehant CY, Coffey PJ, Demoulin JB (2009) The transcription of FOXO genes is stimulated by FOXO3 and repressed by growth factors. *The Journal of biological chemistry* 284:10334-10342.
- Essers MA, de Vries-Smits LM, Barker N, Polderman PE, Burgering BM, Korswagen HC (2005a) Functional interaction between beta-catenin and FOXO in oxidative stress signaling. *Science (New York, NY)* 308:1181-1184.
- Essers MA, Weijzen S, de Vries-Smits AM, Saarloos I, de Ruiter ND, Bos JL, Burgering BM (2004) FOXO transcription factor activation by oxidative stress mediated by the small GTPase Ral and JNK. *The EMBO journal* 23:4802-4812.
- Essers MAG, de Vries-Smits LMM, Barker N, Polderman PE, Burgering BMT, Korswagen HC (2005b) Functional interaction between beta-catenin and FOXO in oxidative stress signaling. *Science (New York, NY)* 308:1181-1184.
- Estrada-Sanchez AM, Rebec GV (2012) Corticostriatal dysfunction and glutamate transporter 1 (GLT1) in Huntington's disease: interactions between neurons and astrocytes. *Basal ganglia* 2:57-66.
- Evans MJ, Kaufman MH (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292:154-156.
- Faideau M, Kim J, Cormier K, Gilmore R, Welch M, Auregan G, Dufour N, Guillemier M, Brouillet E, Hantraye P, Deglon N, Ferrante RJ, Bonvento G (2010) In vivo expression of polyglutamine-expanded huntingtin by mouse striatal astrocytes impairs glutamate transport: a correlation with Huntington's disease subjects. *Human molecular genetics* 19:3053-3067.
- Ferber EC, Peck B, Delpuech O, Bell GP, East P, Schulze A (2012) FOXO3a regulates reactive oxygen metabolism by inhibiting mitochondrial gene expression. *Cell death and differentiation* 19:968-979.
- Ferrante RJ, Gutekunst CA, Persichetti F, McNeil SM, Kowall NW, Gusella JF, MacDonald ME, Beal MF, Hersch SM (1997) Heterogeneous topographic and cellular distribution of huntingtin expression in the normal human neostriatum. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 17:3052-3063.
- Flachsbart F, Caliebe A, Kleindorp R, Blanche H, von Eller-Eberstein H, Nikolaus S, Schreiber S, Nebel A (2009) Association of FOXO3A variation with human longevity confirmed in German centenarians. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:2700-2705.
- Folstein SE, Leigh RJ, Parhad IM, Folstein MF (1986) The diagnosis of Huntington's disease. *Neurology* 36:1279-1283.
- Fradkin LG, Dura JM, Noordermeer JN (2010) Ryks: new partners for Wnts in the developing and regenerating nervous system. *Trends in neurosciences* 33:84-92.
- Francis R, McGrath G, Zhang J, Ruddy DA, Sym M, Apfeld J, Nicoll M, Maxwell M, Hai B, Ellis MC, Parks AL, Xu W, Li J, Gurney M, Myers RL, Himes CS, Hiesch R, Ruble C, Nye JS, Curtis D (2002) *aph-1* and *pen-2* are required for Notch pathway signaling, gamma-secretase cleavage of betaAPP, and presenilin protein accumulation. *Developmental cell* 3:85-97.

- Fraser MJ, Cary L, Boonvisudhi K, Wang HG (1995) Assay for movement of Lepidopteran transposon IFP2 in insect cells using a baculovirus genome as a target DNA. *Virology* 211:397-407.
- Fraser MJ, Ciszczon T, Elick T, Bauser C (1996) Precise excision of TTAA-specific lepidopteran transposons piggyBac (IFP2) and tagalong (TFP3) from the baculovirus genome in cell lines from two species of Lepidoptera. *Insect molecular biology* 5:141-151.
- Fu W, Ma Q, Chen L, Li P, Zhang M, Ramamoorthy S, Nawaz Z, Shimojima T, Wang H, Yang Y, Shen Z, Zhang Y, Zhang X, Nicosia SV, Zhang Y, Pledger JW, Chen J, Bai W (2009) MDM2 acts downstream of p53 as an E3 ligase to promote FOXO ubiquitination and degradation. *The Journal of biological chemistry* 284:13987-14000.
- Fu Z, Tindall DJ (2008) FOXOs, cancer and regulation of apoptosis. *Oncogene* 27:2312-2319.
- Furuyama T, Kitayama K, Yamashita H, Mori N (2003) Forkhead transcription factor FOXO1 (FKHR)-dependent induction of PDK4 gene expression in skeletal muscle during energy deprivation. *The Biochemical journal* 375:365-371.
- Furuyama T, Kitayama K, Shimoda Y, Ogawa M, Sone K, Yoshida-Araki K, Hisatsune H, Nishikawa S, Nakayama K, Nakayama K, Ikeda K, Motoyama N, Mori N (2004) Abnormal angiogenesis in Foxo1 (Fkhr)-deficient mice. *The Journal of biological chemistry* 279:34741-34749.
- Gafni J, Ellerby LM (2002) Calpain activation in Huntington's disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22:4842-4849.
- Gai H, Nguyen DM, Moon YJ, Aguila JR, Fink LM, Ward DC, Ma Y (2010) Generation of murine hepatic lineage cells from induced pluripotent stem cells. *Differentiation; research in biological diversity* 79:171-181.
- Gauthier LR, Charrin BC, Borrell-Pages M, Dompierre JP, Rangone H, Cordelieres FP, De Mey J, MacDonald ME, Lessmann V, Humbert S, Saudou F (2004) Huntingtin controls neurotrophic support and survival of neurons by enhancing BDNF vesicular transport along microtubules. *Cell* 118:127-138.
- Ghosh Z, Wilson KD, Wu Y, Hu S, Quertermous T, Wu JC (2010) Persistent donor cell gene expression among human induced pluripotent stem cells contributes to differences with human embryonic stem cells. *PloS one* 5:e8975.
- Giannakou ME, Goss M, Junger MA, Hafen E, Leivers SJ, Partridge L (2004) Long-lived *Drosophila* with overexpressed dFOXO in adult fat body. *Science* 305:361.
- Gidalevitz T, Krupinski T, Garcia S, Morimoto RI (2009) Destabilizing protein polymorphisms in the genetic background direct phenotypic expression of mutant SOD1 toxicity. *PLoS genetics* 5:e1000399.
- Gidalevitz T, Ben-Zvi A, Ho KH, Brignull HR, Morimoto RI (2006) Progressive disruption of cellular protein folding in models of polyglutamine diseases. *Science (New York, NY)* 311:1471-1474.
- Gilley J, Coffey PJ, Ham J (2003) FOXO transcription factors directly activate bim gene expression and promote apoptosis in sympathetic neurons. *The Journal of cell biology* 162:613-622.
- Gines S, Ivanova E, Seong IS, Saura CA, MacDonald ME (2003a) Enhanced Akt signaling is an early pro-survival response that reflects N-methyl-D-aspartate receptor activation in Huntington's disease knock-in striatal cells. *The Journal of biological chemistry* 278:50514-50522.

- Gines S, Bosch M, Marco S, Gavaldà N, Diaz-Hernandez M, Lucas JJ, Canals JM, Alberch J (2006) Reduced expression of the TrkB receptor in Huntington's disease mouse models and in human brain. *The European journal of neuroscience* 23:649-658.
- Gines S, Seong IS, Fossale E, Ivanova E, Trettel F, Gusella JF, Wheeler VC, Persichetti F, MacDonald ME (2003b) Specific progressive cAMP reduction implicates energy deficit in presymptomatic Huntington's disease knock-in mice. *Human molecular genetics* 12:497-508.
- Glass M, Dragunow M, Faull RL (2000) The pattern of neurodegeneration in Huntington's disease: a comparative study of cannabinoid, dopamine, adenosine and GABA(A) receptor alterations in the human basal ganglia in Huntington's disease. *Neuroscience* 97:505-519.
- Godin JD, Poizat G, Hickey MA, Maschat F, Humbert S (2010) Mutant huntingtin-impaired degradation of beta-catenin causes neurotoxicity in Huntington's disease. *The EMBO journal* 29:2433-2445.
- Gonzalez F, Barragan Monasterio M, Tiscornia G, Montserrat Pulido N, Vassena R, Batlle Morera L, Rodriguez Piza I, Izpisua Belmonte JC (2009) Generation of mouse-induced pluripotent stem cells by transient expression of a single nonviral polycistronic vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:8918-8922.
- Gopinath Suchitra D, Webb Ashley E, Brunet A, Rando Thomas A (2014) FOXO3 Promotes Quiescence in Adult Muscle Stem Cells during the Process of Self-Renewal. *Stem Cell Reports* 2:414-426.
- Gordon MD, Nusse R (2006) Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors. *J Biol Chem* 281:22429-22433.
- Graybiel AM (1995) The basal ganglia. *Trends in neurosciences* 18:60-62.
- Graybiel AM, Aosaki T, Flaherty AW, Kimura M (1994) The basal ganglia and adaptive motor control. *Science (New York, NY)* 265:1826-1831.
- Green KM, Linsalata AE, Todd PK (2016) RAN translation-What makes it run? *Brain research* 1647:30-42.
- Greer EL, Brunet A (2005) FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogene* 24:7410-7425.
- Greer EL, Oskoui PR, Banko MR, Maniar JM, Gygi MP, Gygi SP, Brunet A (2007) The energy sensor AMP-activated protein kinase directly regulates the mammalian FOXO3 transcription factor. *The Journal of biological chemistry* 282:30107-30119.
- Gu M, Gash MT, Mann VM, Javoy-Agid F, Cooper JM, Schapira AH (1996) Mitochondrial defect in Huntington's disease caudate nucleus. *Ann Neurol* 39:385-389.
- Guarente L (2000) Sir2 links chromatin silencing, metabolism, and aging. *Genes & development* 14:1021-1026.
- Guenther MG, Frampton GM, Soldner F, Hockemeyer D, Mitalipova M, Jaenisch R, Young RA (2010) Chromatin structure and gene expression programs of human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Cell stem cell* 7:249-257.
- Gupta R, Kasturi P, Bracher A, Loew C, Zheng M, Villella A, Garza D, Hartl FU, Raychaudhuri S (2011) Firefly luciferase mutants as sensors of proteome stress. *Nature methods* 8:879-884.
- Gurdon JB (1962) The transplantation of nuclei between two species of *Xenopus*. *Developmental biology* 5:68-83.

- Gusella JF, MacDonald ME (2009) Huntington's disease: the case for genetic modifiers. *Genome Med* 1:80.
- Gusella JF, Wexler NS, Conneally PM, Naylor SL, Anderson MA, Tanzi RE, Watkins PC, Ottina K, Wallace MR, Sakaguchi AY, Young AB, Shoulson I, Bonilla E, Martin JB (1983) A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. *Nature* 306:234-238.
- Hackam AS, Singaraja R, Wellington CL, Metzler M, McCutcheon K, Zhang T, Kalchman M, Hayden MR (1998) The influence of huntingtin protein size on nuclear localization and cellular toxicity. *The Journal of cell biology* 141:1097-1105.
- Hageman J, Rujano MA, van Waarde MA, Kakkar V, Dirks RP, Govorukhina N, Oosterveld-Hut HM, Lubsen NH, Kampinga HH (2010) A DNAJB chaperone subfamily with HDAC-dependent activities suppresses toxic protein aggregation. *Molecular cell* 37:355-369.
- Halford MM, Stacker SA (2001) Revelations of the RYK receptor. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 23:34-45.
- Handschin C, Spiegelman BM (2006) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 coactivators, energy homeostasis, and metabolism. *Endocr Rev* 27:728-735.
- Hannenhalli S, Kaestner KH (2009) The evolution of Fox genes and their role in development and disease. *Nature reviews Genetics* 10:233-240.
- Hara T, Nakamura K, Matsui M, Yamamoto A, Nakahara Y, Suzuki-Migishima R, Yokoyama M, Mishima K, Saito I, Okano H, Mizushima N (2006) Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* 441:885-889.
- Hardingham GE, Bading H (2010) Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. *Nature reviews Neuroscience* 11:682-696.
- Harjes P, Wanker EE (2003) The hunt for huntingtin function: interaction partners tell many different stories. *Trends Biochem Sci* 28:425-433.
- Harwood AJ (2002) Signal transduction in development: holding the key. *Developmental cell* 2:384-385.
- Hasan MK, Yaguchi T, Sugihara T, Kumar PK, Taira K, Reddel RR, Kaul SC, Wadhwa R (2002) CARF is a novel protein that cooperates with mouse p19ARF (human p14ARF) in activating p53. *The Journal of biological chemistry* 277:37765-37770.
- Hasegawa K, Cowan AB, Nakatsuji N, Suemori H (2007) Efficient multicistronic expression of a transgene in human embryonic stem cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 25:1707-1712.
- Hay DG, Sathasivam K, Tobaben S, Stahl B, Marber M, Mestril R, Mahal A, Smith DL, Woodman B, Bates GP (2004) Progressive decrease in chaperone protein levels in a mouse model of Huntington's disease and induction of stress proteins as a therapeutic approach. *Human molecular genetics* 13:1389-1405.
- HDCRG (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* 72:971-983.
- Hedreen JC, Peyser CE, Folstein SE, Ross CA (1991) Neuronal loss in layers V and VI of cerebral cortex in Huntington's disease. *Neurosci Lett* 133:257-261.

- Heng MY, Detloff PJ, Wang PL, Tsien JZ, Albin RL (2009) In vivo evidence for NMDA receptor-mediated excitotoxicity in a murine genetic model of Huntington disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29:3200-3205.
- Her LS, Goldstein LS (2008) Enhanced sensitivity of striatal neurons to axonal transport defects induced by mutant huntingtin. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28:13662-13672.
- Hermel E, Gafni J, Propp SS, Leavitt BR, Wellington CL, Young JE, Hackam AS, Logvinova AV, Peel AL, Chen SF, Hook V, Singaraja R, Krajewski S, Goldsmith PC, Ellerby HM, Hayden MR, Bredesen DE, Ellerby LM (2004) Specific caspase interactions and amplification are involved in selective neuronal vulnerability in Huntington's disease. *Cell Death Differ* 11:424-438.
- Hickey MA, Kosmalska A, Enayati J, Cohen R, Zeitlin S, Levine MS, Chesselet MF (2008) Extensive early motor and non-motor behavioral deficits are followed by striatal neuronal loss in knock-in Huntington's disease mice. *Neuroscience* 157:280-295.
- Hillion J, Le Coniat M, Jonveaux P, Berger R, Bernard OA (1997) AF6q21, a novel partner of the MLL gene in t(6;11)(q21;q23), defines a forkhead transcriptional factor subfamily. *Blood* 90:3714-3719.
- Ho AK, Sahakian BJ, Brown RG, Barker RA, Hodges JR, Ane MN, Snowden J, Thompson J, Esmonde T, Gentry R, Moore JW, Bodner T (2003) Profile of cognitive progression in early Huntington's disease. *Neurology* 61:1702-1706.
- Ho R, Chronis C, Plath K (2011) Mechanistic insights into reprogramming to induced pluripotency. *Journal of cellular physiology* 226:868-878.
- Hoekman MF, Jacobs FM, Smidt MP, Burbach JP (2006) Spatial and temporal expression of FoxO transcription factors in the developing and adult murine brain. *Gene expression patterns : GEP* 6:134-140.
- Hollis ER, 2nd, Zou Y (2012) Reinduced Wnt signaling limits regenerative potential of sensory axons in the spinal cord following conditioning lesion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109:14663-14668.
- Hoogeveen AT, Willemsen R, Meyer N, de Rooij KE, Roos RA, van Ommen GJ, Galjaard H (1993) Characterization and localization of the Huntington disease gene product. *Human molecular genetics* 2:2069-2073.
- Hosaka T, Biggs WH, 3rd, Tieu D, Boyer AD, Varki NM, Cavenee WK, Arden KC (2004) Disruption of forkhead transcription factor (FOXO) family members in mice reveals their functional diversification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:2975-2980.
- Hotta A, Ellis J (2008) Retroviral vector silencing during iPS cell induction: an epigenetic beacon that signals distinct pluripotent states. *Journal of cellular biochemistry* 105:940-948.
- Hovens CM, Stacker SA, Andres AC, Harpur AG, Ziemiecki A, Wilks AF (1992) RYK, a receptor tyrosine kinase-related molecule with unusual kinase domain motifs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89:11818-11822.
- Hsieh JC, Rattner A, Smallwood PM, Nathans J (1999) Biochemical characterization of Wnt-frizzled interactions using a soluble, biologically active vertebrate Wnt protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:3546-3551.

- Hu BY, Zhang SC (2009) Differentiation of spinal motor neurons from pluripotent human stem cells. *Nature protocols* 4:1295-1304.
- Hu MC, Lee DF, Xia W, Golfman LS, Ou-Yang F, Yang JY, Zou Y, Bao S, Hanada N, Saso H, Kobayashi R, Hung MC (2004a) I $\kappa$ B kinase promotes tumorigenesis through inhibition of forkhead FOXO3a. *Cell* 117:225-237.
- Hu MCT, Lee D-F, Xia W, Golfman LS, Ou-Yang F, Yang J-Y, Zou Y, Bao S, Hanada N, Saso H, Kobayashi R, Hung M-C (2004b) I $\kappa$ B Kinase Promotes Tumorigenesis through Inhibition of Forkhead FOXO3a. *Cell* 117:225-237.
- Huang H, Tindall DJ (2007) Dynamic FoxO transcription factors. *Journal of cell science* 120:2479-2487.
- Huang H, Regan KM, Wang F, Wang D, Smith DI, van Deursen JM, Tindall DJ (2005) Skp2 inhibits FOXO1 in tumor suppression through ubiquitin-mediated degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:1649-1654.
- Huang K, Kang MH, Askew C, Kang R, Sanders SS, Wan J, Davis NG, Hayden MR (2010) Palmitoylation and function of glial glutamate transporter-1 is reduced in the YAC128 mouse model of Huntington disease. *Neurobiol Dis* 40:207-215.
- Humbert S, Bryson EA, Cordelieres FP, Connors NC, Datta SR, Finkbeiner S, Greenberg ME, Saudou F (2002) The IGF-1/Akt pathway is neuroprotective in Huntington's disease and involves Huntingtin phosphorylation by Akt. *Dev Cell* 2:831-837.
- Huntington G (1967) ON chorea. *Archives of Neurology* 17:332-333.
- Imai S, Armstrong CM, Kaeberlein M, Guarente L (2000) Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature* 403:795-800.
- Inestrosa NC, Arenas E (2009) Emerging roles of Wnts in the adult nervous system. *Nature Reviews Neuroscience* 11:77-86.
- Inoue M, Tokusumi Y, Ban H, Kanaya T, Tokusumi T, Nagai Y, Iida A, Hasegawa M (2003) Nontransmissible virus-like particle formation by F-deficient sendai virus is temperature sensitive and reduced by mutations in M and HN proteins. *Journal of virology* 77:3238-3246.
- Inoue M, Tomizawa K, Matsushita M, Lu YF, Yokoyama T, Yanai H, Takashima A, Kumon H, Matsui H (2006) p53 protein transduction therapy: successful targeting and inhibition of the growth of the bladder cancer cells. *European urology* 49:161-168.
- Jacobs FM, van der Heide LP, Wijchers PJ, Burbach JP, Hoekman MF, Smidt MP (2003) FoxO6, a novel member of the FoxO class of transcription factors with distinct shuttling dynamics. *The Journal of biological chemistry* 278:35959-35967.
- Jacquard C, Trioulier Y, Cosker F, Escartin C, Bizat N, Hantraye P, Cancela JM, Bonvento G, Brouillet E (2006) Brain mitochondrial defects amplify intracellular [Ca<sup>2+</sup>] rise and neurodegeneration but not Ca<sup>2+</sup> entry during NMDA receptor activation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 20:1021-1023.
- Jakel RJ, Maragos WF (2000) Neuronal cell death in Huntington's disease: a potential role for dopamine. *Trends in neurosciences* 23:239-245.
- Jang YC, Perez VI, Song W, Lustgarten MS, Salmon AB, Mele J, Qi W, Liu Y, Liang H, Chaudhuri A, Ikeno Y, Epstein CJ, Van Remmen H, Richardson A (2009) Overexpression of Mn superoxide dismutase does not increase life span in mice. *The*

- journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences 64:1114-1125.
- Jansson L, Larsson J (2011) Joining the stem cell maintenance squad. *Blood* 117:5011-5012.
- Jeong H, Then F, Melia TJ, Jr., Mazzulli JR, Cui L, Savas JN, Voisine C, Paganetti P, Tanese N, Hart AC, Yamamoto A, Krainc D (2009) Acetylation targets mutant huntingtin to autophagosomes for degradation. *Cell* 137:60-72.
- Jia F, Wilson KD, Sun N, Gupta DM, Huang M, Li Z, Panetta NJ, Chen ZY, Robbins RC, Kay MA, Longaker MT, Wu JC (2010a) A nonviral minicircle vector for deriving human iPS cells. *Nature methods* 7:197-199.
- Jia Y, Gall CM, Lynch G (2010b) Presynaptic BDNF promotes postsynaptic long-term potentiation in the dorsal striatum. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30:14440-14445.
- Jiang H, Nucifora FC, Jr., Ross CA, DeFranco DB (2003) Cell death triggered by polyglutamine-expanded huntingtin in a neuronal cell line is associated with degradation of CREB-binding protein. *Human molecular genetics* 12:1-12.
- Jin C, Marsden I, Chen X, Liao X (1999) Dynamic DNA contacts observed in the NMR structure of winged helix protein-DNA complex. *Journal of molecular biology* 289:683-690.
- Judson RL, Babiarz JE, Venere M, Blleloch R (2009) Embryonic stem cell-specific microRNAs promote induced pluripotency. *Nature biotechnology* 27:459-461.
- Juopperi TA, Kim WR, Chiang C-H, Yu H, Margolis RL, Ross CA, Ming G-I, Song H (2012) Astrocytes generated from patient induced pluripotent stem cells recapitulate features of Huntington's disease patient cells. *Molecular Brain* 5:1-14.
- Kaeberlein M, McVey M, Guarente L (1999) The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes & development* 13:2570-2580.
- Kaestner KH, Knochel W, Martinez DE (2000) Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors. *Genes & development* 14:142-146.
- Kalchman MA, Graham RK, Xia G, Koide HB, Hodgson JG, Graham KC, Goldberg YP, Gietz RD, Pickart CM, Hayden MR (1996) Huntingtin is ubiquitinated and interacts with a specific ubiquitin-conjugating enzyme. *The Journal of biological chemistry* 271:19385-19394.
- Kaletsky R, Lakhina V, Arey R, Williams A, Landis J, Ashraf J, Murphy CT (2016) The *C. elegans* adult neuronal IIS/FOXO transcriptome reveals adult phenotype regulators. *Nature* 529:92-96.
- Kamrul HM, Wadhwa R, Kaul SC (2007) CARF binds to three members (ARF, p53, and HDM2) of the p53 tumor-suppressor pathway. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1100:312-315.
- Kannike K, Sepp M, Zuccato C, Cattaneo E, Timmusk T (2014) Forkhead Transcription Factor FOXO3a Levels Are Increased in Huntington Disease Because of Overactivated Positive Autofeedback Loop. *The Journal of biological chemistry* 289:32845-32857.
- Katayama K, Nakamura A, Sugimoto Y, Tsuruo T, Fujita N (2008) FOXO transcription factor-dependent p15(INK4b) and p19(INK4d) expression. *Oncogene* 27:1677-1686.
- Kaye JA, Finkbeiner S (2013) Modeling Huntington's disease with induced pluripotent stem cells. *Molecular and cellular neurosciences* 56:50-64.

- Kazantsev A, Preisinger E, Dranovsky A, Goldgaber D, Housman D (1999) Insoluble detergent-resistant aggregates form between pathological and nonpathological lengths of polyglutamine in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:11404-11409.
- Kearsey JM, Coates PJ, Prescott AR, Warbrick E, Hall PA (1995) Gadd45 is a nuclear cell cycle regulated protein which interacts with p21Cip1. *Oncogene* 11:1675-1683.
- Keeble TR, Halford MM, Seaman C, Kee N, Macheda M, Anderson RB, Stacker SA, Cooper HM (2006) The Wnt Receptor Ryk Is Required for Wnt5a-Mediated Axon Guidance on the Contralateral Side of the Corpus Callosum. *The Journal of Neuroscience* 26:5840-5848.
- Kegel KB, Kim M, Sapp E, McIntyre C, Castano JG, Aronin N, DiFiglia M (2000) Huntingtin expression stimulates endosomal-lysosomal activity, endosome tubulation, and autophagy. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20:7268-7278.
- Kegel KB, Sapp E, Alexander J, Reeves P, Bleckmann D, Sobin L, Masso N, Valencia A, Jeong H, Krainc D, Palacino J, Curtis D, Kuhn R, Betschart C, Sena-Esteves M, Aronin N, Paganetti P, DiFiglia M (2010) Huntingtin cleavage product A forms in neurons and is reduced by gamma-secretase inhibitors. *Molecular neurodegeneration* 5:58.
- Kelly DP, Scarpulla RC (2004) Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function. *Genes & development* 18:357-368.
- Keniry M, Parsons R (2008) The role of PTEN signaling perturbations in cancer and in targeted therapy. *Oncogene* 27:5477-5485.
- Kenney C, Powell S, Jankovic J (2007) Autopsy-proven Huntington's disease with 29 trinucleotide repeats. *Mov Disord* 22:127-130.
- Kenyon C, Chang J, Gensch E, Rudner A, Tabtiang R (1993) A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature* 366:461-464.
- Kiechle FL, Zhang X (2002) Apoptosis: biochemical aspects and clinical implications. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 326:27-45.
- Kieffer E, Kuntz S, Viville S (2010) [An overview of pluripotent stem cell lines]. *Medecine sciences : M/S* 26:848-854.
- Kikis EA, Gidalevitz T, Morimoto RI (2010) Protein homeostasis in models of aging and age-related conformational disease. *Advances in experimental medicine and biology* 694:138-159.
- Kikuchi A, Yamamoto H, Sato A, Matsumoto S (2011) New insights into the mechanism of Wnt signaling pathway activation. *International review of cell and molecular biology* 291:21-71.
- Kim DS, Lee JS, Leem JW, Huh YJ, Kim JY, Kim HS, Park IH, Daley GQ, Hwang DY, Kim DW (2010) Robust enhancement of neural differentiation from human ES and iPS cells regardless of their innate difference in differentiation propensity. *Stem cell reviews* 6:270-281.
- Kim I, Rodriguez-Enriquez S, Lemasters JJ (2007) Selective degradation of mitochondria by mitophagy. *Arch Biochem Biophys* 462:245-253.
- Kim JB, Sebastiano V, Wu G, Arauzo-Bravo MJ, Sasse P, Gentile L, Ko K, Ruau D, Ehrlich M, van den Boom D, Meyer J, Hubner K, Bernemann C, Ortmeier C, Zenke M, Fleischmann BK, Zaehres H, Scholer HR (2009) Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells. *Cell* 136:411-419.

- Kim K, Zhao R, Doi A, Ng K, Unternaehrer J, Cahan P, Huo H, Loh YH, Aryee MJ, Lensch MW, Li H, Collins JJ, Feinberg AP, Daley GQ (2011) Donor cell type can influence the epigenome and differentiation potential of human induced pluripotent stem cells. *Nature biotechnology* 29:1117-1119.
- Kim M (2013) Beta conformation of polyglutamine track revealed by a crystal structure of Huntingtin N-terminal region with insertion of three histidine residues. *Prion* 7:221-228.
- Kim MV, Ouyang W, Liao W, Zhang MQ, Li MO (2013) The transcription factor Foxo1 controls central-memory CD8+ T cell responses to infection. *Immunity* 39:286-297.
- Kim YJ, Yi Y, Sapp E, Wang Y, Cuiffo B, Kegel KB, Qin ZH, Aronin N, DiFiglia M (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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:12784-12789.
- Kimelman D, Xu W (2006) beta-catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective. *Oncogene* 25:7482-7491.
- Kish SJ, Shannak K, Hornykiewicz O (1987) Elevated serotonin and reduced dopamine in subregionally divided Huntington's disease striatum. *Annals of neurology* 22:386-389.
- Kitamura YI, Kitamura T, Kruse JP, Raum JC, Stein R, Gu W, Accili D (2005) FoxO1 protects against pancreatic beta cell failure through NeuroD and MafA induction. *Cell metabolism* 2:153-163.
- Kobayashi T, Cohen P (1999) Activation of serum- and glucocorticoid-regulated protein kinase by agonists that activate phosphatidylinositol 3-kinase is mediated by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) and PDK2. *The Biochemical journal* 339 ( Pt 2):319-328.
- Kops GJ, Burgering BM (1999) Forkhead transcription factors: new insights into protein kinase B (c-akt) signaling. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 77:656-665.
- Kops GJ, Medema RH, Glassford J, Essers MA, Dijkers PF, Coffey PJ, Lam EW, Burgering BM (2002a) Control of cell cycle exit and entry by protein kinase B-regulated forkhead transcription factors. *Molecular and cellular biology* 22:2025-2036.
- Kops GJ, Dansen TB, Polderman PE, Saarloos I, Wirtz KW, Coffey PJ, Huang TT, Bos JL, Medema RH, Burgering BM (2002b) Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress. *Nature* 419:316-321.
- Koropatnick TA, Kimbell J, Chen R, Grove JS, Donlon TA, Masaki KH, Rodriguez BL, Willcox BJ, Yano K, Curb JD (2008) A prospective study of high-density lipoprotein cholesterol, cholesteryl ester transfer protein gene variants, and healthy aging in very old Japanese-american men. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences* 63:1235-1240.
- Kraft C, Peter M, Hofmann K (2010) Selective autophagy: ubiquitin-mediated recognition and beyond. *Nature cell biology* 12:836-841.
- Krupnick JG, Damjanov I, Damjanov A, Zhu ZM, Fenderson BA (1994) Globo-series carbohydrate antigens are expressed in different forms on human and murine teratocarcinoma-derived cells. *International journal of cancer Journal international du cancer* 59:692-698.
- Kuhn A et al. (2007) Mutant huntingtin's effects on striatal gene expression in mice recapitulate changes observed in human Huntington's disease brain and do not differ

- with mutant huntingtin length or wild-type huntingtin dosage. *Human molecular genetics* 16:1845-1861.
- Kulakovskiy IV, Medvedeva YA, Schaefer U, Kasianov AS, Vorontsov IE, Bajic VB, Makeev VJ (2013) HOCOMOCO: a comprehensive collection of human transcription factor binding sites models. *Nucleic Acids Res* 41:D195-202.
- Kwan W, Träger U, Davalos D, Chou A, Bouchard J, Andre R, Miller A, Weiss A, Giorgini F, Cheah C, Möller T, Stella N, Akassoglou K, Tabrizi SJ, Muchowski PJ (2012) Mutant huntingtin impairs immune cell migration in Huntington disease. *The Journal of Clinical Investigation* 122:4737-4747.
- Labbadia J, Morimoto RI (2013) Huntington's disease: underlying molecular mechanisms and emerging concepts. *Trends Biochem Sci* 38:378-385 LID - 310.1016/j.tibs.2013.1005.1003 [doi] LID - S0968-0004(1013)00078-00079 [pii].
- Labbadia J, Novoselov SS, Bett JS, Weiss A, Paganetti P, Bates GP, Cheetham ME (2012) Suppression of protein aggregation by chaperone modification of high molecular weight complexes. *Brain : a journal of neurology* 135:1180-1196.
- Lacoste A, Berenshteyn F, Brivanlou AH (2009) An efficient and reversible transposable system for gene delivery and lineage-specific differentiation in human embryonic stem cells. *Cell stem cell* 5:332-342.
- Lai E, Prezioso VR, Smith E, Litvin O, Costa RH, Darnell JE, Jr. (1990) HNF-3A, a hepatocyte-enriched transcription factor of novel structure is regulated transcriptionally. *Genes & development* 4:1427-1436.
- Lamark T, Johansen T (2012) Aggrephagy: Selective Disposal of Protein Aggregates by Macroautophagy. *International Journal of Cell Biology* 2012:736905.
- Landis JN, Murphy CT (2010) Integration of diverse inputs in the regulation of *C. elegans* DAF-16/FOXO. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 239.
- Landles C, Bates GP (2004) Huntingtin and the molecular pathogenesis of Huntington's disease. Fourth in molecular medicine review series. *EMBO Rep* 5:958-963.
- Langfelder P et al. (2016) Integrated genomics and proteomics define huntingtin CAG length-dependent networks in mice. *Nat Neurosci* 19:623-633.
- Langmead B, Salzberg SL (2012) Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods* 9:357-359.
- Lapasset L, Milhavet O, Prieur A, Besnard E, Babled A, Ait-Hamou N, Leschik J, Pellestor F, Ramirez JM, De Vos J, Lehmann S, Lemaitre JM (2011) Rejuvenating senescent and centenarian human cells by reprogramming through the pluripotent state. *Genes & development* 25:2248-2253.
- Laplante M, Sabatini David M mTOR Signaling in Growth Control and Disease. *Cell* 149:274-293.
- Lee CS, Friedman JR, Fulmer JT, Kaestner KH (2005) The initiation of liver development is dependent on Foxa transcription factors. *Nature* 435:944-947.
- Lee J, Kim SS (2009) The function of p27 KIP1 during tumor development. *Experimental & molecular medicine* 41:765-771.
- Lee J, Hwang YJ, Kim KY, Kowall NW, Ryu H (2013) Epigenetic mechanisms of neurodegeneration in Huntington's disease. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 10:664-676.

- Lee JY, Nakada D, Yilmaz OH, Tothova Z, Joseph NM, Lim MS, Gilliland DG, Morrison SJ (2010) mTOR activation induces tumor suppressors that inhibit leukemogenesis and deplete hematopoietic stem cells after Pten deletion. *Cell stem cell* 7:593-605.
- Lee SS, Kennedy S, Tolonen AC, Ruvkun G (2003) DAF-16 target genes that control *C. elegans* life-span and metabolism. *Science (New York, NY)* 300:644-647.
- Lee ST, Chu K, Park JE, Kang L, Ko SY, Jung KH, Kim M (2006) Memantine reduces striatal cell death with decreasing calpain level in 3-nitropropionic model of Huntington's disease. *Brain research* 1118:199-207.
- Lehtinen MK, Yuan Z, Boag PR, Yang Y, Villen J, Becker EB, DiBacco S, de la Iglesia N, Gygi S, Blackwell TK, Bonni A (2006) A conserved MST-FOXO signaling pathway mediates oxidative-stress responses and extends life span. *Cell* 125:987-1001.
- Lejeune FX, Mesrob L, Parmentier F, Bicep C, Vazquez-Manrique RP, Parker JA, Vert JP, Tourette C, Neri C (2012) Large-scale functional RNAi screen in *C. elegans* identifies genes that regulate the dysfunction of mutant polyglutamine neurons. *BMC genomics* 13:91.
- Lemiere J, Decruyenaere M, Evers-Kiebooms G, Vandenbussche E, Dom R (2002) Longitudinal study evaluating neuropsychological changes in so-called asymptomatic carriers of the Huntington's disease mutation after 1 year. *Acta Neurol Scand* 106:131-141.
- Leong ML, Maiyar AC, Kim B, O'Keeffe BA, Firestone GL (2003) Expression of the serum- and glucocorticoid-inducible protein kinase, Sgk, is a cell survival response to multiple types of environmental stress stimuli in mammary epithelial cells. *The Journal of biological chemistry* 278:5871-5882.
- Li B, Carey M, Workman JL (2007a) The role of chromatin during transcription. *Cell* 128:707-719.
- Li D, Li X, Wu J, Li J, Zhang L, Xiong T, Tang J, Qu Y, Mu D (2015) Involvement of the JNK/FOXO3a/Bim Pathway in Neuronal Apoptosis after Hypoxic-Ischemic Brain Damage in Neonatal Rats. *PloS one* 10:e0132998.
- Li H, Zhan M (2006) Systematic intervention of transcription for identifying network response to disease and cellular phenotypes. *Bioinformatics (Oxford, England)* 22:96-102.
- Li H, Li SH, Yu ZX, Shelbourne P, Li XJ (2001) Huntingtin aggregate-associated axonal degeneration is an early pathological event in Huntington's disease mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21:8473-8481.
- Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R, Genome Project Data Processing S (2009a) The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25:2078-2079.
- Li H, Khirug S, Cai C, Ludwig A, Blaesse P, Kolikova J, Afzalov R, Coleman SK, Lauri S, Airaksinen MS, Keinanen K, Khiroug L, Saarma M, Kaila K, Rivera C (2007b) KCC2 interacts with the dendritic cytoskeleton to promote spine development. *Neuron* 56:1019-1033.
- Li HO, Zhu YF, Asakawa M, Kuma H, Hirata T, Ueda Y, Lee YS, Fukumura M, Iida A, Kato A, Nagai Y, Hasegawa M (2000) A cytoplasmic RNA vector derived from nontransmissible Sendai virus with efficient gene transfer and expression. *Journal of virology* 74:6564-6569.
- Li J, Poi MJ, Tsai M-D (2011a) The Regulatory Mechanisms of Tumor Suppressor P16(INK4A) and Relevance to Cancer. *Biochemistry* 50:5566-5582.

- Li J, Melvin WS, Tsai MD, Muscarella P (2004) The nuclear protein p34SEI-1 regulates the kinase activity of cyclin-dependent kinase 4 in a concentration-dependent manner. *Biochemistry* 43:4394-4399.
- Li J, Muscarella P, Joo SH, Knobloch TJ, Melvin WS, Weghorst CM, Tsai MD (2005) Dissection of CDK4-binding and transactivation activities of p34(SEI-1) and comparison between functions of p34(SEI-1) and p16(INK4A). *Biochemistry* 44:13246-13256.
- Li M, Zhang DQ, Wang XZ, Xu TJ (2011b) NR2B-containing NMDA receptors promote neural progenitor cell proliferation through CaMKIV/CREB pathway. *Biochemical and biophysical research communications* 411:667-672.
- Li S-H, Li X-J (2004) Huntingtin–protein interactions and the pathogenesis of Huntington's disease. *Trends in Genetics* 20:146-154.
- Li SH, Schilling G, Young WS, 3rd, Li XJ, Margolis RL, Stine OC, Wagster MV, Abbott MH, Franz ML, Ranen NG, et al. (1993) Huntington's disease gene (IT15) is widely expressed in human and rat tissues. *Neuron* 11:985-993.
- Li X, Li YH, Yu S, Liu Y (2008) Upregulation of Ryk expression in rat dorsal root ganglia after peripheral nerve injury. *Brain research bulletin* 77:178-184.
- Li XJ, Orr AL, Li S (2010) Impaired mitochondrial trafficking in Huntington's disease. *Biochim Biophys Acta* 1802:62-65.
- Li Y, Wang WJ, Cao H, Lu J, Wu C, Hu FY, Guo J, Zhao L, Yang F, Zhang YX, Li W, Zheng GY, Cui H, Chen X, Zhu Z, He H, Dong B, Mo X, Zeng Y, Tian XL (2009b) Genetic association of FOXO1A and FOXO3A with longevity trait in Han Chinese populations. *Human molecular genetics* 18:4897-4904.
- Liao Y, Smyth GK, Shi W (2014) featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* 30:923-930.
- Liesa M, Shirihaï OS (2013) Mitochondrial dynamics in the regulation of nutrient utilization and energy expenditure. *Cell metabolism* 17:491-506.
- Lim J, Lachenmayer ML, Wu S, Liu W, Kundu M, Wang R, Komatsu M, Oh YJ, Zhao Y, Yue Z (2015) Proteotoxic stress induces phosphorylation of p62/SQSTM1 by ULK1 to regulate. *PLoS genetics* 11:e1004987 LID - 1004910.1001371/journal.pgen.1004987 [doi].
- Lim WF, Inoue-Yokoo T, Tan KS, Lai MI, Sugiyama D (2013) Hematopoietic cell differentiation from embryonic and induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Research & Therapy* 4:71-71.
- Lin A, Yao J, Zhuang L, Wang D, Han J, Lam EW, Gan B (2014) The FoxO-BNIP3 axis exerts a unique regulation of mTORC1 and cell survival under energy stress. *Oncogene* 33:3183-3194.
- Lin J et al. (2004) Defects in adaptive energy metabolism with CNS-linked hyperactivity in PGC-1alpha null mice. *Cell* 119:121-135.
- Lin MT, Beal MF (2006) Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 443:787-795.
- Liot G, Zala D, Pla P, Mottet G, Piel M, Saudou F (2013) Mutant Huntingtin alters retrograde transport of TrkB receptors in striatal dendrites. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33:6298-6309.
- Lister R, Pelizzola M, Kida YS, Hawkins RD, Nery JR, Hon G, Antosiewicz-Bourget J, O'Malley R, Castanon R, Klugman S, Downes M, Yu R, Stewart R, Ren B, Thomson

- JA, Evans RM, Ecker JR (2011) Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells. *Nature* 471:68-73.
- Liu C, Lin JD (2011) PGC-1 coactivators in the control of energy metabolism. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 43:248-257.
- Liu H, Yin J, Wang H, Jiang G, Deng M, Zhang G, Bu X, Cai S, Du J, He Z (2015a) FOXO3a modulates WNT/beta-catenin signaling and suppresses epithelial-to-mesenchymal transition in prostate cancer cells. *Cellular signalling* 27:510-518.
- Liu H, Zhu F, Yong J, Zhang P, Hou P, Li H, Jiang W, Cai J, Liu M, Cui K, Qu X, Xiang T, Lu D, Chi X, Gao G, Ji W, Ding M, Deng H (2008a) Generation of induced pluripotent stem cells from adult rhesus monkey fibroblasts. *Cell stem cell* 3:587-590.
- Liu XB, Murray KD, Jones EG (2004) Switching of NMDA receptor 2A and 2B subunits at thalamic and cortical synapses during early postnatal development. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24:8885-8895.
- Liu Y, Shi J, Lu CC, Wang ZB, Lyuksyutova AI, Song XJ, Zou Y (2005) Ryk-mediated Wnt repulsion regulates posterior-directed growth of corticospinal tract. *Nature neuroscience* 8:1151-1159.
- Liu Y, Wang X, Lu CC, Kerman R, Steward O, Xu XM, Zou Y (2008b) Repulsive Wnt signaling inhibits axon regeneration after CNS injury. *J Neurosci* 28:8376-8382.
- Liu Z, He Q, Ding X, Zhao T, Zhao L, Wang A (2015b) SOD2 is a C-myc target gene that promotes the migration and invasion of tongue squamous cell carcinoma involving cancer stem-like cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 60:139-146.
- Logan CY, Nusse R (2004) The Wnt Signaling Pathway in Development and Disease. *Annual review of cell and developmental biology* 20:781-810.
- Lomonosova E, Chinnadurai G (2008) BH3-only proteins in apoptosis and beyond: an overview. *Oncogene* 27 Suppl 1:S2-19.
- Long JD, Matson WR, Juhl AR, Leavitt BR, Paulsen JS (2012) 8OHdG as a marker for Huntington disease progression. *Neurobiol Dis* 46:625-634.
- Lovrecic L, Kastrin A, Kobal J, Pirtosek Z, Krainc D, Peterlin B (2009) Gene expression changes in blood as a putative biomarker for Huntington's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 24:2277-2281.
- Lu B, Nagappan G, Guan X, Nathan PJ, Wren P (2013a) BDNF-based synaptic repair as a disease-modifying strategy for neurodegenerative diseases. *Nature reviews Neuroscience* 14:401-416.
- Lu B, Al-Ramahi I, Valencia A, Wang Q, Berenshteyn F, Yang H, Gallego-Flores T, Ichcho S, Lacoste A, Hild M, DiFiglia M, Botas J, Palacino J (2013b) Identification of NUB1 as a suppressor of mutant Huntington toxicity via enhanced protein clearance. *Nature neuroscience* 16:562-570.
- Lu W, Yamamoto V, Ortega B, Baltimore D (2004) Mammalian Ryk is a Wnt coreceptor required for stimulation of neurite outgrowth. *Cell* 119:97-108.
- Lunetta KL, D'Agostino RB, Sr., Karasik D, Benjamin EJ, Guo CY, Govindaraju R, Kiel DP, Kelly-Hayes M, Massaro JM, Pencina MJ, Seshadri S, Murabito JM (2007) Genetic correlates of longevity and selected age-related phenotypes: a genome-wide association study in the Framingham Study. *BMC medical genetics* 8 Suppl 1:S13.
- Luo S, Vacher C, Davies JE, Rubinsztein DC (2005) Cdk5 phosphorylation of huntingtin reduces its cleavage by caspases: implications for mutant huntingtin toxicity. *The Journal of cell biology* 169:647-656.

- Luo Y, Umegaki H, Wang X, Abe R, Roth GS (1998) Dopamine induces apoptosis through an oxidation-involved SAPK/JNK activation pathway. *The Journal of biological chemistry* 273:3756-3764.
- Luthi-Carter R, Hanson SA, Strand AD, Bergstrom DA, Chun W, Peters NL, Woods AM, Chan EY, Kooperberg C, Krainc D, Young AB, Tapscott SJ, Olson JM (2002) Dysregulation of gene expression in the R6/2 model of polyglutamine disease: parallel changes in muscle and brain. *Human molecular genetics* 11:1911-1926.
- Luthi-Carter R, Strand A, Peters NL, Solano SM, Hollingsworth ZR, Menon AS, Frey AS, Spektor BS, Penney EB, Schilling G, Ross CA, Borchelt DR, Tapscott SJ, Young AB, Cha J-HJ, Olson JM (2000) Decreased Expression of Striatal Signaling Genes in a Mouse Model of Huntington's Disease. *Human molecular genetics* 9:1259-1271.
- Lynch M, Conery JS (2000) The evolutionary fate and consequences of duplicate genes. *Science (New York, NY)* 290:1151-1155.
- Lyu J, Yamamoto V, Lu W (2008a) Cleavage of the Wnt receptor Ryk regulates neuronal differentiation during cortical neurogenesis. *Developmental cell* 15:773-780.
- Lyu J, Yamamoto V, Lu W (2008b) Cleavage of the Wnt Receptor Ryk Regulates Neuronal Differentiation during Cortical Neurogenesis. *Developmental Cell* 15:773-780.
- Lyu J, Wesselschmidt RL, Lu W (2009) Cdc37 Regulates Ryk Signaling by Stabilizing the Cleaved Ryk Intracellular Domain. *The Journal of biological chemistry* 284:12940-12948.
- Maat-Kievit A, Vegter-Van Der Vlis M, Zoetewij M, Losekoot M, van Haeringen A, Roos RA (1999) Predictive testing of 25 percent at-risk individuals for Huntington disease (1987-1997). *Am J Med Genet* 88:662-668.
- MacDonald BT, Tamai K, He X (2009) Wnt/ $\beta$ -catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Developmental cell* 17:9-26.
- MacFarlane M (2009) Cell death pathways--potential therapeutic targets. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems* 39:616-624.
- Macheda ML, Sun WW, Kugathasan K, Hogan BM, Bower NI, Halford MM, Zhang YF, Jacques BE, Lieschke GJ, Dabdoub A, Stacker SA (2012) The Wnt receptor Ryk plays a role in mammalian planar cell polarity signaling. *The Journal of biological chemistry* 287:29312-29323.
- Maguschak KA, Ressler KJ (2012) The dynamic role of beta-catenin in synaptic plasticity. *Neuropharmacology* 62:78-88.
- Maherali N, Sridharan R, Xie W, Utikal J, Eminli S, Arnold K, Stadtfeld M, Yachechko R, Tchieu J, Jaenisch R, Plath K, Hochedlinger K (2007) Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell stem cell* 1:55-70.
- Mammucari C, Milan G, Romanello V, Masiero E, Rudolf R, Del Piccolo P, Burden SJ, Di Lisi R, Sandri C, Zhao J, Goldberg AL, Schiaffino S, Sandri M (2007) FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. *Cell metabolism* 6:458-471.
- Marchetto MC, Yeo GW, Kainohana O, Marsala M, Gage FH, Muotri AR (2009) Transcriptional signature and memory retention of human-induced pluripotent stem cells. *PLoS one* 4:e7076.
- Marchetto MC, Carrromeu C, Acab A, Yu D, Yeo GW, Mu Y, Chen G, Gage FH, Muotri AR (2010) A model for neural development and treatment of Rett syndrome using human induced pluripotent stem cells. *Cell* 143.

- Marco S, Giralt A, Petrovic MM, Pouladi MA, Martinez-Turrillas R, Martinez-Hernandez J, Kaltenbach LS, Torres-Peraza J, Graham RK, Watanabe M, Lujan R, Nakanishi N, Lipton SA, Lo DC, Hayden MR, Alberch J, Wesseling JF, Perez-Otano I (2013) Suppressing aberrant GluN3A expression rescues synaptic and behavioral impairments in Huntington's disease models. *Nature medicine* 19:1030-1038.
- Marson A, Levine SS, Cole MF, Frampton GM, Brambrink T, Johnstone S, Guenther MG, Johnston WK, Wernig M, Newman J, Calabrese JM, Dennis LM, Volkert TL, Gupta S, Love J, Hannett N, Sharp PA, Bartel DP, Jaenisch R, Young RA (2008) Connecting microRNA genes to the core transcriptional regulatory circuitry of embryonic stem cells. *Cell* 134:521-533.
- Martin DD, Ladha S, Ehrnhoefer DE, Hayden MR (2015) Autophagy in Huntington disease and huntingtin in autophagy. *Trends in neurosciences* 38:26-35 LID - 10.1016/j.tins.2014.1009.1003 [doi] LID - S0166-2236(1014)00158-00151 [pii].
- Martin JB (1982) Huntington's disease: genetically programmed cell death in the human central nervous system. *Nature* 299:205-206.
- Martinez-Vicente M, Talloczy Z, Wong E, Tang G, Koga H, Kaushik S, de Vries R, Arias E, Harris S, Sulzer D, Cuervo AM (2010) Cargo recognition failure is responsible for inefficient autophagy in Huntington's disease. *Nature neuroscience* 13:567-576.
- Matsuzaki H, Daitoku H, Hatta M, Tanaka K, Fukamizu A (2003) Insulin-induced phosphorylation of FKHR (Foxo1) targets to proteasomal degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:11285-11290.
- Mazarei G, Neal SJ, Becanovic K, Luthi-Carter R, Simpson EM, Leavitt BR (2010) Expression analysis of novel striatal-enriched genes in Huntington disease. *Human molecular genetics* 19:609-622.
- McGeer EG, Scherer U, Singh K (1977) A glutamatergic corticostriatal path? *Brain research* 128:369-373 FAU - McGeer, P L.
- McKinstry SU, Karadeniz YB, Worthington AK, Hayrapetyan VY, Ozlu MI, Serafin-Molina K, Risher WC (2014) Huntingtin is required for normal excitatory synapse development in cortical and striatal circuits. *PLoS one* 9:9455-9472.
- McManus EJ, Sakamoto K, Armit LJ, Ronaldson L, Shpiro N, Marquez R, Alessi DR (2005) Role that phosphorylation of GSK3 plays in insulin and Wnt signalling defined by knockin analysis. *Embo j* 24:1571-1583.
- McNeil SM, Novelletto A, Srinidhi J, Barnes G, Kornbluth I, Altherr MR, Wasmuth JJ, Gusella JF, MacDonald ME, Myers RH (1997) Reduced penetrance of the Huntington's disease mutation. *Human molecular genetics* 6:775-779.
- Medema RH, Kops GJ, Bos JL, Burgering BM (2000) AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1. *Nature* 404:782-787.
- Mei Y, Zhang Y, Yamamoto K, Xie W, Mak TW, You H (2009) FOXO3a-dependent regulation of Pink1 (Park6) mediates survival signaling in response to cytokine deprivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:5153-5158.
- Meissner A, Wernig M, Jaenisch R (2007) Direct reprogramming of genetically unmodified fibroblasts into pluripotent stem cells. *Nature biotechnology* 25:1177-1181.
- Menzies FM, Moreau K, Rubinsztein DC (2011) Protein misfolding disorders and macroautophagy. *Curr Opin Cell Biol* 23:190-197.
- Michiue H, Tomizawa K, Wei FY, Matsushita M, Lu YF, Ichikawa T, Tamiya T, Date I, Matsui H (2005) The NH2 terminus of influenza virus hemagglutinin-2 subunit peptides

- enhances the antitumor potency of polyarginine-mediated p53 protein transduction. *The Journal of biological chemistry* 280:8285-8289.
- Milakovic T, Quintanilla Ra Fau - Johnson GVW, Johnson GV (2006) Mutant huntingtin expression induces mitochondrial calcium handling defects in. *The Journal of biological chemistry* 281:34785-34795.
- Millecamps S, Julien JP (2013) Axonal transport deficits and neurodegenerative diseases. *Nature reviews Neuroscience* 14:161-176.
- Miller BR, Dorner JL, Bunner KD, Gaither TW, Klein EL, Barton SJ, Rebec GV (2012a) Up-regulation of GLT1 reverses the deficit in cortically evoked striatal ascorbate efflux in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. *Journal of neurochemistry* 121:629-638.
- Miller JP, Holcomb J, Al-Ramahi I, de Haro M, Gafni J, Zhang N, Kim E, Sanhueza M, Torcassi C, Kwak S, Botas J, Hughes RE, Ellerby LM (2010) Matrix metalloproteinases are modifiers of huntingtin proteolysis and toxicity in Huntington's disease. *Neuron* 67:199-212.
- Miller JP, Yates BE, Al-Ramahi I, Berman AE, Sanhueza M, Kim E, de Haro M, DeGiacomo F, Torcassi C, Holcomb J, Gafni J, Mooney SD, Botas J, Ellerby LM, Hughes RE (2012b) A genome-scale RNA-interference screen identifies RRAS signaling as a pathologic feature of Huntington's disease. *PLoS Genet* 8:e1003042.
- Milnerwood AJ, Gladding CM, Pouladi MA, Kaufman AM, Hines RM, Boyd JD, Ko RW, Vasuta OC, Graham RK, Hayden MR, Murphy TH, Raymond LA (2010) Early increase in extrasynaptic NMDA receptor signaling and expression contributes to phenotype onset in Huntington's disease mice. *Neuron* 65:178-190.
- Miyamoto K, Araki KY, Naka K, Arai F, Takubo K, Yamazaki S, Matsuoka S, Miyamoto T, Ito K, Ohmura M, Chen C, Hosokawa K, Nakauchi H, Nakayama K, Nakayama KI, Harada M, Motoyama N, Suda T, Hirao A (2007) Foxo3a Is Essential for Maintenance of the Hematopoietic Stem Cell Pool. *Cell stem cell* 1:101-112.
- Mochel F, Haller RG (2011) Energy deficit in Huntington disease: why it matters. *J Clin Invest* 121:493-499.
- Mochel F, Durant B, Meng X, O'Callaghan J, Yu H, Brouillet E, Wheeler VC, Humbert S, Schiffmann R, Durr A (2012) Early alterations of brain cellular energy homeostasis in Huntington disease models. *The Journal of biological chemistry* 287:1361-1370.
- Modur V, Nagarajan R, Evers BM, Milbrandt J (2002) FOXO proteins regulate tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand expression. Implications for PTEN mutation in prostate cancer. *The Journal of biological chemistry* 277:47928-47937.
- Mohan A, Goodwin M, Swanson MS (2014) RNA-protein interactions in unstable microsatellite diseases. *Brain research* 0:3-14.
- Mojsilovic-Petrovic J, Nedelsky N, Boccitto M, Mano I, Georgiades SN, Zhou W, Liu Y, Neve RL, Taylor JP, Driscoll M, Clardy J, Merry D, Kalb RG (2009) FOXO3a is broadly neuroprotective in vitro and in vivo against insults implicated in motor neuron diseases. *J Neurosci* 29:8236-8247.
- Monsalve M, Olmos Y (2011) The complex biology of FOXO. *Curr Drug Targets* 12:1322-1350.
- Montoya A, Price BH, Menear M, Lepage M (2006) Brain imaging and cognitive dysfunctions in Huntington's disease. *J Psychiatry Neurosci* 31:21-29.
- Moon RT, Bowerman B, Boutros M, Perrimon N (2002) The promise and perils of Wnt signaling through beta-catenin. *Science (New York, NY)* 296:1644-1646.

- Morfini GA, You YM, Pollema SL, Kaminska A, Liu K, Yoshioka K, Bjorkblom B, Coffey ET, Bagnato C, Han D, Huang CF, Banker G, Pigino G, Brady ST (2009) Pathogenic huntingtin inhibits fast axonal transport by activating JNK3 and phosphorylating kinesin. *Nature neuroscience* 12:864-871.
- Motta MC, Divecha N, Lemieux M, Kamel C, Chen D, Gu W, Bultsma Y, McBurney M, Guarente L (2004) Mammalian SIRT1 represses forkhead transcription factors. *Cell* 116:551-563.
- Muchowski PJ, Wacker JL (2005) Modulation of neurodegeneration by molecular chaperones. *Nature reviews Neuroscience* 6:11-22.
- Myers RH (2004) Huntington's disease genetics. *NeuroRx* 1:255-262.
- Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, Okita K, Mochiduki Y, Takizawa N, Yamanaka S (2008) Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nature biotechnology* 26:101-106.
- Nance MA, Myers RH (2001) Juvenile onset Huntington's disease--clinical and research perspectives. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 7:153-157.
- Nath S, Munsie LN, Truant R (2015) A huntingtin-mediated fast stress response halting endosomal trafficking is. *Human molecular genetics* 24:450-462 LID - 410.1093/hmg/ddu1460 [doi].
- Neri C (2012) Role and Therapeutic Potential of the Pro-Longevity Factor FOXO and Its Regulators in Neurodegenerative Disease. *Frontiers in pharmacology* 3:15.
- Ness JM, Harvey CA, Strasser A, Bouillet P, Klocke BJ, Roth KA (2006) Selective involvement of BH3-only Bcl-2 family members Bim and Bad in neonatal hypoxia-ischemia. *Brain research* 1099:150-159.
- Newman AM, Cooper JB (2010) Lab-specific gene expression signatures in pluripotent stem cells. *Cell stem cell* 7:258-262.
- Ng CW, Yildirim F, Yap YS, Dalin S, Matthews BJ, Velez PJ, Labadorf A, Housman DE, Fraenkel E (2013) Extensive changes in DNA methylation are associated with expression of mutant huntingtin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110:2354-2359.
- Nicholls DG (2009) Mitochondrial calcium function and dysfunction in the central nervous system. *Biochim Biophys Acta* 1787:1416-1424.
- Niehrs C (2012) The complex world of WNT receptor signalling. *Nature reviews Molecular cell biology* 13:767-779.
- Nopoulos PC, Aylward EH, Ross CA, Johnson HJ, Magnotta VA, Juhl AR, Pierson RK, Mills J, Langbehn DR, Paulsen JS (2010) Cerebral cortex structure in prodromal Huntington disease. *Neurobiol Dis* 40:544-554.
- Nowak K, Killmer K, Gessner C, Lutz W (2007) E2F-1 regulates expression of FOXO1 and FOXO3a. *Biochimica et biophysica acta* 1769:244-252.
- Obsil T, Obsilova V (2008) Structure/function relationships underlying regulation of FOXO transcription factors. *Oncogene* 27:2263-2275.
- Ochiai K, Maienschein-Cline M, Mandal M, Triggs JR, Bertolino E, Sciammas R, Dinner AR, Clark MR, Singh H (2012) A self-reinforcing regulatory network triggered by limiting IL-7 activates pre-BCR signaling and differentiation. *Nat Immunol* 13:300-307.
- Oh HM, Yu CR, Golestaneh N, Amadi-Obi A, Lee YS, Eseonu A, Mahdi RM, Ekwuagu CE (2011) STAT3 protein promotes T-cell survival and inhibits interleukin-2 production through up-regulation of Class O Forkhead transcription factors. *The Journal of biological chemistry* 286:30888-30897.

- Oh SW, Mukhopadhyay A, Svrikapa N, Jiang F, Davis RJ, Tissenbaum HA (2005) JNK regulates lifespan in *Caenorhabditis elegans* by modulating nuclear translocation of forkhead transcription factor/DAF-16. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:4494-4499.
- Ohgushi H, Caplan AI (1999) Stem cell technology and bioceramics: from cell to gene engineering. *Journal of biomedical materials research* 48:913-927.
- Ohi Y, Qin H, Hong C, Blouin L, Polo JM, Guo T, Qi Z, Downey SL, Manos PD, Rossi DJ, Yu J, Hebrok M, Hochedlinger K, Costello JF, Song JS, Ramalho-Santos M (2011) Incomplete DNA methylation underlies a transcriptional memory of somatic cells in human iPS cells. *Nature cell biology* 13:541-549.
- Ohtani N, Zebedee Z, Huot TJ, Stinson JA, Sugimoto M, Ohashi Y, Sharrocks AD, Peters G, Hara E (2001) Opposing effects of Ets and Id proteins on p16INK4a expression during cellular senescence. *Nature* 409:1067-1070.
- Okamoto S, Pouladi MA, Talantova M, Yao D, Xia P, Ehrnhoefer DE, Zaidi R, Clemente A, Kaul M, Graham RK, Zhang D, Vincent Chen HS, Tong G, Hayden MR, Lipton SA (2009) Balance between synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor activity influences inclusions and neurotoxicity of mutant huntingtin. *Nature medicine* 15:1407-1413.
- Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S (2007) Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 448:313-317.
- Okita K, Hong H, Takahashi K, Yamanaka S (2010) Generation of mouse-induced pluripotent stem cells with plasmid vectors. *Nat Protocols* 5:418-428.
- Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, Ichisaka T, Yamanaka S (2008) Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science (New York, NY)* 322:949-953.
- Okuda A, Fukushima A, Nishimoto M, Orimo A, Yamagishi T, Nabeshima Y, Kuro-o M, Nabeshima Y, Boon K, Keaveney M, Stunnenberg HG, Muramatsu M (1998) UTF1, a novel transcriptional coactivator expressed in pluripotent embryonic stem cells and extra-embryonic cells. *Embo j* 17:2019-2032.
- Olzscha H, Schermann SM, Woerner AC, Pinkert S, Hecht MH, Tartaglia GG, Vendruscolo M, Hayer-Hartl M, Hartl FU, Vabulas RM (2011) Amyloid-like aggregates sequester numerous metastable proteins with essential cellular functions. *Cell* 144:67-78.
- Ordway JM, Tallaksen-Greene S, Gutekunst CA, Bernstein EM, Cearley JA, Wiener HW, Dure LSt, Lindsey R, Hersch SM, Jope RS, Albin RL, Detloff PJ (1997) Ectopically expressed CAG repeats cause intranuclear inclusions and a progressive late onset neurological phenotype in the mouse. *Cell* 91:753-763.
- Orr AL, Li S, Wang CE, Li H, Wang J, Rong J, Xu X, Mastroberardino PG, Greenamyre JT, Li XJ (2008) N-terminal mutant huntingtin associates with mitochondria and impairs mitochondrial trafficking. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28:2783-2792.
- Ouyang W, Liao W, Luo CT, Yin N, Huse M, Kim MV, Peng M, Chan P, Ma Q, Mo Y, Meijer D, Zhao K, Rudensky AY, Atwal G, Zhang MQ, Li MO (2012) Novel Foxo1-dependent transcriptional programs control T(reg) cell function. *Nature* 491:554-559.
- Paik J-h, Ding Z, Narurkar R, Ramkissoon S, Muller F, Kamoun WS, Chae S-S, Zheng H, Ying H, Mahoney J, Hiller D, Jiang S, Protppopov A, Wong WH, Chin L, Ligon KL, DePinho RA (2009a) FoxOs cooperatively regulate diverse pathways governing neural stem cell homeostasis. *Cell stem cell* 5:540-553.

- Paik JH, Ding Z, Narurkar R, Ramkissoon S, Muller F, Kamoun WS, Chae SS, Zheng H, Ying H, Mahoney J, Hiller D, Jiang S, Protopopov A, Wong WH, Chin L, Ligon KL, DePinho RA (2009b) FoxOs cooperatively regulate diverse pathways governing neural stem cell homeostasis. *Cell Stem Cell* 5:540-553.
- Palidwor GA, Shcherbinin S, Huska MR, Rasko T, Stelzl U, Arumughan A, Foulle R, Porras P, Sanchez-Pulido L, Wanker EE, Andrade-Navarro MA (2009) Detection of alpha-rod protein repeats using a neural network and application to huntingtin. *PLoS Comput Biol* 5:e1000304.
- Paradis S, Ruvkun G (1998) *Caenorhabditis elegans* Akt/PKB transduces insulin receptor-like signals from AGE-1 PI3 kinase to the DAF-16 transcription factor. *Genes & development* 12:2488-2498.
- Pardo R, Colin E, Regulier E, Aebischer P, Deglon N, Humbert S, Saudou F (2006) Inhibition of calcineurin by FK506 protects against polyglutamine-huntingtin toxicity through an increase of huntingtin phosphorylation at S421. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26:1635-1645.
- Park I-H, Lerou PH, Zhao R, Huo H, Daley GQ (2008a) Generation of human-induced pluripotent stem cells. *Nature Protocols* 3:1180-1186.
- Park I-H, Zhao R, West JA, Yabuuchi A, Huo H, Ince TA, Lerou PH, Lensch MW, Daley GQ (2008b) Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature* 451:141-146.
- Park I-k, Qian D, Kiel M, Becker MW, Pihalja M, Weissman IL, Morrison SJ, Clarke MF (2003) Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells. *Nature* 423:302-305.
- Parker JA, Connolly JB, Wellington C, Hayden M, Dausset J, Neri C (2001a) Expanded polyglutamines in *Caenorhabditis elegans* cause axonal abnormalities and severe dysfunction of PLM mechanosensory neurons without cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98:13318-13323.
- Parker JA, Connolly JB, Wellington C, Hayden M, Dausset J, Neri C (2001b) Expanded polyglutamines in *Caenorhabditis elegans* cause axonal abnormalities and severe dysfunction of PLM mechanosensory neurons without cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:13318-13323.
- Parker JA, Arango M, Abderrahmane S, Lambert E, Tourette C, Catoire H, Neri C (2005) Resveratrol rescues mutant polyglutamine cytotoxicity in nematode and mammalian neurons. *Nature genetics* 37:349-350.
- Parker JA, Vazquez-Manrique RP, Tourette C, Farina F, Offner N, Mukhopadhyay A, Orfila A-M, Darbois A, Menet S, Tissenbaum HA, Neri C (2012a) Integration of  $\beta$ -catenin, sirtuin, and FOXO signaling protects from mutant huntingtin toxicity. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 32:12630-12640.
- Parker JA, Vazquez-Manrique RP, Tourette C, Farina F, Offner N, Mukhopadhyay A, Orfila AM, Darbois A, Menet S, Tissenbaum HA, Neri C (2012b) Integration of beta-Catenin, Sirtuin, and FOXO Signaling Protects from Mutant Huntingtin Toxicity. *J Neurosci* 32:12630-12640.
- Parmentier F, Lejeune FX, Neri C (2013) Pathways to decoding the clinical potential of stress response FOXO-interaction networks for Huntington's disease: of gene prioritization and context dependence. *Frontiers in aging neuroscience* 5:22.

- Parry P, Wei Y, Evans G (1994) Cloning and characterization of the t(X;11) breakpoint from a leukemic cell line identify a new member of the forkhead gene family. *Genes, chromosomes & cancer* 11:79-84.
- Pasco MY, Catoire H, Parker JA, Brais B, Rouleau GA, Néri C (2010) Cross-talk between canonical Wnt signaling and the sirtuin-FoxO longevity pathway to protect against muscular pathology induced by mutant PABPN1 expression in *C. elegans*. *Neurobiology of Disease* 38:425-433.
- Paulsen JS (2010) Early Detection of Huntington Disease. *Future neurology* 5:10.2217/fnl.2209.2278.
- Paulsen JS (2011) Cognitive Impairment in Huntington Disease: Diagnosis and Treatment. *Current neurology and neuroscience reports* 11:474-483.
- Paulsen JS, Nehl C, Hoth KF, Kanz JE, Benjamin M, Conybeare R, McDowell B, Turner B (2005) Depression and stages of Huntington's disease. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 17:496-502.
- Pawlikowska L, Hu D, Huntsman S, Sung A, Chu C, Chen J, Joyner AH, Schork NJ, Hsueh WC, Reiner AP, Psaty BM, Atzmon G, Barzilai N, Cummings SR, Browner WS, Kwok PY, Ziv E (2009) Association of common genetic variation in the insulin/IGF1 signaling pathway with human longevity. *Aging cell* 8:460-472.
- Perrier AL, Tabar V, Barberi T, Rubio ME, Bruses J, Topf N, Harrison NL, Studer L (2004) Derivation of midbrain dopamine neurons from human embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:12543-12548.
- Peschanski M, Cesaro P, Hantraye P (1995) Rationale for intrastriatal grafting of striatal neuroblasts in patients with Huntington's disease. *Neuroscience* 68:273-285.
- Pino E, Amamoto R, Zheng L, Cacquevel M, Sarria JC, Knott GW, Schneider BL (2014) FOXO3 determines the accumulation of alpha-synuclein and controls the fate of dopaminergic neurons in the substantia nigra. *Human molecular genetics* 23:1435-1452.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science (New York, NY)* 284:143-147.
- Plas DR, Thompson CB (2003) Akt activation promotes degradation of tuberin and FOXO3a via the proteasome. *The Journal of biological chemistry* 278:12361-12366.
- Povinelli BJ, Nemeth MJ (2014) Wnt5a regulates hematopoietic stem cell proliferation and repopulation through the Ryk receptor. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 32:105-115.
- Pringsheim T, Wiltshire K, Day L, Dykeman J, Steeves T, Jette N (2012) The incidence and prevalence of Huntington's disease: a systematic review and meta-analysis. *Mov Disord* 27:1083-1091.
- Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M, Spiegelman BM (1998) A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* 92:829-839.
- Rajkowska G, Selemon LD, Goldman-Rakic PS (1998) Neuronal and glial somal size in the prefrontal cortex: a postmortem morphometric study of schizophrenia and Huntington disease. *Arch Gen Psychiatry* 55:215-224.
- Ramaswamy S, Nakamura N, Sansal I, Bergeron L, Sellers WR (2002) A novel mechanism of gene regulation and tumor suppression by the transcription factor FKHR. *Cancer cell* 2:81-91.

- Ramirez F, Ryan DP, Gruning B, Bhardwaj V, Kilpert F, Richter AS, Heyne S, Dundar F, Manke T (2016) deepTools2: a next generation web server for deep-sequencing data analysis. *Nucleic Acids Res* 44:W160-165.
- Rangone H, Poizat G, Troncoso J, Ross CA, MacDonald ME, Saudou F, Humbert S (2004) The serum- and glucocorticoid-induced kinase SGK inhibits mutant huntingtin-induced toxicity by phosphorylating serine 421 of huntingtin. *Eur J Neurosci* 19:273-279.
- Ratovitski T, Chighladze E, Arbez N, Boronina T, Herbrich S, Cole RN, Ross CA (2012) Huntingtin protein interactions altered by polyglutamine expansion as determined by quantitative proteomic analysis. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* 11:2006-2021.
- Ravikumar B, Berger Z, Vacher C, O'Kane CJ, Rubinsztein DC (2006) Rapamycin pre-treatment protects against apoptosis. *Human molecular genetics* 15:1209-1216.
- Raymond LA, Andre VM, Cepeda C, Gladding CM, Milnerwood AJ, Levine MS (2011) Pathophysiology of Huntington's disease: time-dependent alterations in synaptic and receptor function. *Neuroscience* 198:252-273.
- Read AP (1993) Huntington's disease: testing the test. *Nat Genet* 4:329-330.
- Ren PH, Lauckner JE, Kachirskaia I, Heuser JE, Melki R, Kopito RR (2009) Cytoplasmic penetration and persistent infection of mammalian cells by polyglutamine aggregates. *Nat Cell Biol* 11:219-225.
- Rena G, Woods YL, Prescott AR, Peggie M, Unterman TG, Williams MR, Cohen P (2002) Two novel phosphorylation sites on FKHR that are critical for its nuclear exclusion. *The EMBO journal* 21:2263-2271.
- Renault VM, Rafalski VA, Morgan AA, Salih DA, Brett JO, Webb AE, Villeda SA, Thekkat PU, Guillerey C, Denko NC, Palmer TD, Butte AJ, Brunet A (2009) FoxO3 regulates neural stem cell homeostasis. *Cell Stem Cell* 5:527-539.
- Renault VM, Thekkat PU, Hoang KL, White JL, Brady CA, Kenzelmann Broz D, Venturelli OS, Johnson TM, Oskoui PR, Xuan Z, Santo EE, Zhang MQ, Vogel H, Attardi LD, Brunet A (2011) The pro-longevity gene FoxO3 is a direct target of the p53 tumor suppressor. *Oncogene* 30:3207-3221.
- Rey A (2003) [Are stem cells well named?]. *Medecine sciences : M/S* 19:645.
- Rigby M, Le Bourdelles B, Heavens RP, Kelly S, Smith D, Butler A, Hammans R, Hills R, Xuereb JH, Hill RG, Whiting PJ, Sirinathsinghji DJ (1996) The messenger RNAs for the N-methyl-D-aspartate receptor subunits show region-specific expression of different subunit composition in the human brain. *Neuroscience* 73:429-447.
- Ring KL, An MC, Zhang N, O'Brien RN, Ramos EM, Gao F, Atwood R, Bailus BJ, Melov S, Mooney SD, Coppola G, Ellerby LM (2015) Genomic Analysis Reveals Disruption of Striatal Neuronal Development and Therapeutic Targets in Human Huntington's Disease Neural Stem Cells. *Stem Cell Reports* 5:1023-1038.
- Rishi AK, Zhang X, Wali A (2009) Targeting of Apoptosis Signaling Pathways and Their Mediators for Cancer Therapy. In: *Pharmaceutical Perspectives of Cancer Therapeutics* (Lu Y, Mahato IR, eds), pp 149-188. New York, NY: Springer US.
- Robbins A, Ho A, Barker RA (2006) Weight changes in Huntington's disease. *Eur J Neurol* 13:e7 FAU - Robbins, A O.
- Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK (2010) edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26:139-140.

- Robinton DA, Daley GQ (2012) The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy. *Nature* 481:295-305.
- Rogers MB, Hosler BA, Gudas LJ (1991) Specific expression of a retinoic acid-regulated, zinc-finger gene, Rex-1, in preimplantation embryos, trophoblast and spermatocytes. *Development (Cambridge, England)* 113:815-824.
- Rogina B, Helfand SL (2004) Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:15998-16003.
- Rosas HD, Hevelone ND, Zaleta AK, Greve DN, Salat DH, Fischl B (2005) Regional cortical thinning in preclinical Huntington disease and its relationship to cognition. *Neurology* 65:745-747.
- Rosas HD, Liu AK, Hersch S, Glessner M, Ferrante RJ, Salat DH, van der Kouwe A, Jenkins BG, Dale AM, Fischl B (2002) Regional and progressive thinning of the cortical ribbon in Huntington's disease. *Neurology* 58:695-701.
- Rosner MH, Vigano MA, Ozato K, Timmons PM, Poirier F, Rigby PW, Staudt LM (1990) A POU-domain transcription factor in early stem cells and germ cells of the mammalian embryo. *Nature* 345:686-692.
- Ross CA, Poirier MA (2004) Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nature medicine* 10 Suppl:S10-17.
- Rotblat B et al. (2014) HACE1 reduces oxidative stress and mutant Huntingtin toxicity by promoting the NRF2 response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111:3032-3037.
- Rubinsztein DC et al. (1996) Phenotypic characterization of individuals with 30-40 CAG repeats in the Huntington disease (HD) gene reveals HD cases with 36 repeats and apparently normal elderly individuals with 36-39 repeats. *Am J Hum Genet* 59:16-22.
- Rui YN, Le W (2015) Selective role of autophagy in neuronal function and neurodegenerative diseases. *Neuroscience bulletin* 31:379-381.
- Rui YN, Xu Z, Patel B, Chen Z, Chen D, Tito A, David G, Sun Y, Stimming EF, Bellen HJ, Cuervo AM, Zhang S (2015) Huntingtin functions as a scaffold for selective macroautophagy. *Nature cell biology* 17:262-275.
- Runne H, Kuhn A, Wild EJ, Pratyaksha W, Kristiansen M, Isaacs JD, Regulier E, Delorenzi M, Tabrizi SJ, Luthi-Carter R (2007) Analysis of potential transcriptomic biomarkers for Huntington's disease in peripheral blood. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:14424-14429.
- Salih DA, Brunet A (2008) FoxO transcription factors in the maintenance of cellular homeostasis during aging. *Curr Opin Cell Biol* 20:126-136.
- Salih DA, Rashid AJ, Colas D, de la Torre-Ubieta L, Zhu RP, Morgan AA, Santo EE, Ucar D, Devarajan K, Cole CJ, Madison DV, Shamloo M, Butte AJ, Bonni A, Josselyn SA, Brunet A (2012a) FoxO6 regulates memory consolidation and synaptic function. *Genes Dev* 26:2780-2801.
- Salih DAM, Rashid AJ, Colas D, de la Torre-Ubieta L, Zhu RP, Morgan AA, Santo EE, Ucar D, Devarajan K, Cole CJ, Madison DV, Shamloo M, Butte AJ, Bonni A, Josselyn SA, Brunet A (2012b) FoxO6 regulates memory consolidation and synaptic function. *Genes & development* 26:2780-2801.
- Sanberg, Fibiger HC, Mark RF (1981) Body weight and dietary factors in Huntington's disease patients compared with. *Med J Aust* 1:407-409.

- Sanders SS, Hayden MR (2015) Aberrant palmitoylation in Huntington disease. *Biochem Soc Trans* 43:205-210 LID - 210.1042/BST20140242 [doi].
- Sandri M (2012) FOXOphagy path to inducing stress resistance and cell survival. *Nat Cell Biol* 14:786-788.
- Santamaria-Martinez A, Barquinero J, Barbosa-Desongles A, Hurtado A, Pinos T, Seoane J, Poupon MF, Morote J, Reventos J, Munell F (2009) Identification of multipotent mesenchymal stromal cells in the reactive stroma of a prostate cancer xenograft by side population analysis. *Experimental cell research* 315:3004-3013.
- Santos JA, Logarinho E, Tapia C, Allende CC, Allende JE, Sunkel CE (1996) The casein kinase 1 alpha gene of *Drosophila melanogaster* is developmentally regulated and the kinase activity of the protein induced by DNA damage. *Journal of cell science* 109 ( Pt 7):1847-1856.
- Sapp E, Kegel KB, Aronin N, Hashikawa T, Uchiyama Y, Tohyama K, Bhide PG, Vonsattel JP, DiFiglia M (2001) Early and progressive accumulation of reactive microglia in the Huntington disease brain. *J Neuropathol Exp Neurol* 60:161-172.
- Scarpulla RC (2006) Nuclear control of respiratory gene expression in mammalian cells. *J Cell Biochem* 97:673-683.
- Schmid R, Schick T, Steffen R, Tschopp A, Wilk T (1994) Comparison of Seven Commonly Used Agents for Prophylaxis of Seasickness. *J Travel Med* 1:203-206.
- Schmidt M, Fernandez de Mattos S, van der Horst A, Klompmaker R, Kops GJ, Lam EW, Burgering BM, Medema RH (2002) Cell cycle inhibition by FoxO forkhead transcription factors involves downregulation of cyclin D. *Mol Cell Biol* 22:7842-7852.
- Scholer HR, Ruppert S, Suzuki N, Chowdhury K, Gruss P (1990) New type of POU domain in germ line-specific protein Oct-4. *Nature* 344:435-439.
- Schulte J, Littleton JT (2011) The biological function of the Huntingtin protein and its relevance to Huntington's Disease pathology. *Curr Trends Neurol* 5:65-78.
- Seoane J, Le HV, Shen L, Anderson SA, Massague J (2004) Integration of Smad and forkhead pathways in the control of neuroepithelial and glioblastoma cell proliferation. *Cell* 117:211-223.
- Sepers MD, Raymond LA (2014) Mechanisms of synaptic dysfunction and excitotoxicity in Huntington's disease. *Drug discovery today* 19:990-996.
- Seredenina T, Luthi-Carter R (2012) What have we learned from gene expression profiles in Huntington's disease? *Neurobiology of Disease* 45:83-98.
- Shamblott MJ, Axelman J, Wang S, Bugg EM, Littlefield JW, Donovan PJ, Blumenthal PD, Huggins GR, Gearhart JD (1998) Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:13726-13731.
- Sherman MY, Goldberg AL (2001) Cellular defenses against unfolded proteins: a cell biologist thinks about neurodegenerative diseases. *Neuron* 29:15-32.
- Shi C, Zhu J, Leng S, Long D, Luo X (2016) Mitochondrial FOXO3a is involved in amyloid beta peptide-induced mitochondrial dysfunction. *Journal of bioenergetics and biomembranes* 48:189-196.
- Shin JY, Fang ZH, Yu ZX, Wang CE, Li SH, Li XJ (2005) Expression of mutant huntingtin in glial cells contributes to neuronal excitotoxicity. *The Journal of cell biology* 171:1001-1012.

- Shirasaki DI, Greiner ER, Al-Ramahi I, Gray M, Boontheung P, Geschwind DH, Botas J, Coppola G, Horvath S, Loo JA, Yang XW (2012) Network organization of the huntingtin proteomic interactome in mammalian brain. *Neuron* 75:41-57.
- Siddiqui A, Rivera-Sanchez S, Castro Mdel R, Acevedo-Torres K, Rane A, Torres-Ramos CA, Nicholls DG, Andersen JK, Ayala-Torres S (2012) Mitochondrial DNA damage is associated with reduced mitochondrial bioenergetics in Huntington's disease. *Free Radic Biol Med* 53:1478-1488.
- Simons M, Mlodzik M (2008) Planar cell polarity signaling: from fly development to human disease. *Annual review of genetics* 42:517-540.
- Singh LN, Hannehalli S (2008) Functional diversification of paralogous transcription factors via divergence in DNA binding site motif and in expression. *PLoS one* 3:e2345.
- Slusarski DC, Corces VG, Moon RT (1997) Interaction of Wnt and a Frizzled homologue triggers G-protein-linked phosphatidylinositol signalling. *Nature* 390:410-413.
- Smith AG, Heath JK, Donaldson DD, Wong GG, Moreau J, Stahl M, Rogers D (1988) Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* 336:688-690.
- Smith TA, Hooper ML (1983) Medium conditioned by feeder cells inhibits the differentiation of embryonal carcinoma cultures. *Experimental cell research* 145:458-462.
- Snell RG, MacMillan JC, Cheadle JP, Fenton I, Lazarou LP, Davies P, MacDonald ME, Gusella JF, Harper PS, Shaw DJ (1993) Relationship between trinucleotide repeat expansion and phenotypic variation in Huntington's disease. *Nat Genet* 4:393-397.
- Soerensen M, Dato S, Christensen K, McGue M, Stevnsner T, Bohr VA, Christiansen L (2010) Replication of an association of variation in the FOXO3A gene with human longevity using both case-control and longitudinal data. *Aging cell* 9:1010-1017.
- Song C, Zhang Y, Parsons CG, Liu YF (2003) Expression of polyglutamine-expanded huntingtin induces tyrosine phosphorylation of N-methyl-D-aspartate receptors. *The Journal of biological chemistry* 278:33364-33369.
- Song W, Chen J, Petrilli A, Liot G, Klinglmayr E, Zhou Y, Poquiz P, Tjong J, Pouladi MA, Hayden MR, Masliah E, Ellisman M, Rouiller I, Schwarzenbacher R, Bossy B, Perkins G, Bossy-Wetzler E (2011) Mutant huntingtin binds the mitochondrial fission GTPase dynamin-related protein-1 and increases its enzymatic activity. *Nature medicine* 17:377-382.
- Spokes EG (1980) Neurochemical alterations in Huntington's chorea: a study of post-mortem brain tissue. *Brain : a journal of neurology* 103:179-210.
- Squitieri F, Frati L, Ciarmiello A, Lastoria S, Quarrell O (2006) Juvenile Huntington's disease: does a dosage-effect pathogenic mechanism differ from the classical adult disease? *Mechanisms of ageing and development* 127:208-212.
- Squitieri F, Berardelli A, Nargi E, Castellotti B, Mariotti C, Cannella M, Lavitrano ML, de Grazia U, Gellera C, Ruggieri S (2000) Atypical movement disorders in the early stages of Huntington's disease: clinical and genetic analysis. *Clin Genet* 58:50-56.
- Stadtfeld M, Nagaya M, Utikal J, Weir G, Hochedlinger K (2008) Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science (New York, NY)* 322:945-949.
- Stahl M, Dijkers PF, Kops GJ, Lens SM, Coffey PJ, Burgering BM, Medema RH (2002) The forkhead transcription factor FoxO regulates transcription of p27Kip1 and Bim in response to IL-2. *J Immunol* 168:5024-5031.
- Stahl WL, Swanson PD (1974) Biochemical abnormalities in Huntington's chorea brains. *Neurology* 24:813-819.

- Stankiewicz MJ, Crispino JD (2009) ETS2 and ERG promote megakaryopoiesis and synergize with alterations in GATA-1 to immortalize hematopoietic progenitor cells. *Blood* 113:3337-3347.
- Steffan JS, Kazantsev A, Spasic-Boskovic O, Greenwald M, Zhu YZ, Gohler H, Wanker EE, Bates GP, Housman DE, Thompson LM (2000) The Huntington's disease protein interacts with p53 and CREB-binding protein and represses transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:6763-6768.
- Steffan JS, Agrawal N, Pallos J, Rockabrand E, Trotman LC, Slepko N, Illes K, Lukacsovich T, Zhu YZ, Cattaneo E, Pandolfi PP, Thompson LM, Marsh JL (2004) SUMO modification of Huntingtin and Huntington's disease pathology. *Science (New York, NY)* 304:100-104.
- Steffan JS, Bodai L, Pallos J, Poelman M, McCampbell A, Apostol BL, Kazantsev A, Schmidt E, Zhu YZ, Greenwald M, Kurokawa R, Housman DE, Jackson GR, Marsh JL, Thompson LM (2001) Histone deacetylase inhibitors arrest polyglutamine-dependent neurodegeneration in *Drosophila*. *Nature* 413:739-743.
- Stoy N, McKay E (2000) Weight loss in Huntington's disease. *Ann Neurol* 48:130-131 FAU - Stoy, N.
- Strong TV, Tagle DA, Valdes JM, Elmer LW, Boehm K, Swaroop M, Kaatz KW, Collins FS, Albin RL (1993) Widespread expression of the human and rat Huntington's disease gene in brain and nonneural tissues. *Nat Genet* 5:259-265.
- Stuge U, Ellingsen JE (1991) [Frialit ceramic implants--a four-year follow-up study]. *Nor Tannlaegeforen Tid* 101:296-303.
- Sturrock A, Leavitt BR (2010) The clinical and genetic features of Huntington disease. *Journal of geriatric psychiatry and neurology* 23:243-259.
- Sugars KL, Rubinsztein DC (2003) Transcriptional abnormalities in Huntington disease. *Trends Genet* 19:233-238.
- Sunayama J, Tsuruta F, Masuyama N, Gotoh Y (2005) JNK antagonizes Akt-mediated survival signals by phosphorylating 14-3-3. *The Journal of cell biology* 170:295-304.
- Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, Forslund K, Heller D, Huerta-Cepas J, Simonovic M, Roth A, Santos A, Tsafou KP, Kuhn M, Bork P, Jensen LJ, von Mering C (2015) STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res* 43:D447-452.
- Tabrizi SJ, Scahill RI, Owen G, Durr A, Leavitt BR, Roos RA, Borowsky B, Landwehrmeyer B, Frost C, Johnson H, Craufurd D, Reilmann R, Stout JC, Langbehn DR (2013) Predictors of phenotypic progression and disease onset in premanifest and early-stage Huntington's disease in the TRACK-HD study: analysis of 36-month observational data. *The Lancet Neurology* 12:637-649.
- Tabrizi SJ, Scahill RI, Durr A, Roos RA, Leavitt BR, Jones R, Landwehrmeyer GB, Fox NC, Johnson H, Hicks SL, Kennard C, Craufurd D, Frost C, Langbehn DR, Reilmann R, Stout JC (2011) Biological and clinical changes in premanifest and early stage Huntington's disease in the TRACK-HD study: the 12-month longitudinal analysis. *The Lancet Neurology* 10:31-42.
- Tabrizi SJ, Reilmann R, Roos RA, Durr A, Leavitt B, Owen G, Jones R, Johnson H, Craufurd D, Hicks SL, Kennard C, Landwehrmeyer B, Stout JC, Borowsky B, Scahill RI, Frost C, Langbehn DR (2012) Potential endpoints for clinical trials in premanifest and early

- Huntington's disease in the TRACK-HD study: analysis of 24 month observational data. *The Lancet Neurology* 11:42-53.
- Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y, Agarwal S, Iyer LM, Liu DR, Aravind L, Rao A (2009) Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science (New York, NY)* 324:930-935.
- Takahashi K, Yamanaka S (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126:663-676.
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131:861-872.
- Tamura RE, de Vasconcellos JF, Sarkar D, Libermann TA, Fisher PB, Zerbini LF (2012) GADD45 proteins: central players in tumorigenesis. *Current molecular medicine* 12:634-651.
- Tan Y, Zhang Q, Wong SG, Hua Q (2016) Anti-Alzheimer Therapeutic Drugs Targeting gamma-Secretase. *Current topics in medicinal chemistry* 16:549-557.
- Tang ED, Nunez G, Barr FG, Guan KL (1999) Negative regulation of the forkhead transcription factor FKHR by Akt. *The Journal of biological chemistry* 274:16741-16746.
- Tang TT, Dowbenko D, Jackson A, Toney L, Lewin DA, Dent AL, Lasky LA (2002) The forkhead transcription factor AFX activates apoptosis by induction of the BCL-6 transcriptional repressor. *J Biol Chem* 277:14255-14265.
- Tartari M, Gissi C, Lo Sardo V, Zuccato C, Picardi E, Pesole G, Cattaneo E (2008) Phylogenetic comparison of huntingtin homologues reveals the appearance of a primitive polyQ in sea urchin. *Mol Biol Evol* 25:330-338.
- Tebbenkamp AT, Green C, Xu G, Denovan-Wright EM, Rising AC, Fromholt SE, Brown HH, Swing D, Mandel RJ, Tessarollo L, Borchelt DR (2011) Transgenic mice expressing caspase-6-derived N-terminal fragments of mutant huntingtin develop neurologic abnormalities with predominant cytoplasmic inclusion pathology composed largely of a smaller proteolytic derivative. *Human molecular genetics* 20:2770-2782.
- Telenius H, Kremer B, Goldberg YP, Theilmann J, Andrew SE, Zeisler J, Adam S, Greenberg C, Ives EJ, Clarke LA, et al. (1994) Somatic and gonadal mosaicism of the Huntington disease gene CAG repeat in brain and sperm. *Nat Genet* 6:409-414.
- Tesar PJ, Chenoweth JG, Brook FA, Davies TJ, Evans EP, Mack DL, Gardner RL, McKay RD (2007) New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature* 448:196-199.
- TheHD-Consortium (2012) Induced pluripotent stem cells from patients with Huntington's disease show CAG-repeat-expansion-associated phenotypes. *Cell stem cell* 11:264-278.
- Thomson JA, Marshall VS (1998) Primate embryonic stem cells. *Current topics in developmental biology* 38:133-165.
- Thomson JA, Marshall VS, Trojanowski JQ (1998a) Neural differentiation of rhesus embryonic stem cells. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* 106:149-156; discussion 156-147.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM (1998b) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science (New York, NY)* 282:1145-1147.

- Tiedemann H, Asashima M, Grunz H, Knochel W (2001) Pluripotent cells (stem cells) and their determination and differentiation in early vertebrate embryogenesis. *Development, growth & differentiation* 43:469-502.
- Todd PK, Oh SY, Krans A, He F, Sellier C, Frazer M, Renoux AJ, Chen KC, Scaglione KM, Basrur V, Elenitoba-Johnson K, Vonsattel JP, Louis ED, Sutton MA, Taylor JP, Mills RE, Charlet-Berguerand N, Paulson HL (2013) CGG repeat-associated translation mediates neurodegeneration in fragile X tremor ataxia syndrome. *Neuron* 78:440-455.
- Tokusumi T, Iida A, Hirata T, Kato A, Nagai Y, Hasegawa M (2002) Recombinant Sendai viruses expressing different levels of a foreign reporter gene. *Virus research* 86:33-38.
- Tothova Z, Kollipara R, Huntly BJ, Lee BH, Castrillon DH, Cullen DE, McDowell EP, Lazo-Kallanian S, Williams IR, Sears C, Armstrong SA, Passegué E, DePinho RA, Gilliland DG (2007) FoxOs Are Critical Mediators of Hematopoietic Stem Cell Resistance to Physiologic Oxidative Stress. *Cell* 128:325-339.
- Tourette C et al. (2014a) The Wnt receptor Ryk reduces neuronal and cell survival capacity by repressing FOXO activity during the early phases of mutant huntingtin pathogenicity. *PLoS Biol* 12:e1001895.
- Tourette C et al. (2014b) The Wnt receptor Ryk reduces neuronal and cell survival capacity by repressing FOXO activity during the early phases of mutant huntingtin pathogenicity. *PLoS biology* 12:e1001895.
- Tran H, Brunet A, Grenier JM, Datta SR, Fornace AJ, Jr., DiStefano PS, Chiang LW, Greenberg ME (2002) DNA repair pathway stimulated by the forkhead transcription factor FOXO3a through the Gadd45 protein. *Science (New York, NY)* 296:530-534.
- Troemel ER, Chu SW, Reinke V, Lee SS, Ausubel FM, Kim DH (2006) p38 MAPK regulates expression of immune response genes and contributes to longevity in *C. elegans*. *PLoS genetics* 2:e183.
- Trushina E et al. (2004) Mutant huntingtin impairs axonal trafficking in mammalian neurons in vivo and in vitro. *Molecular and cellular biology* 24:8195-8209.
- Tsai KL, Huang CY, Chang CH, Sun YJ, Chuang WJ, Hsiao CD (2006) Crystal structure of the human FOXK1a-DNA complex and its implications on the diverse binding specificity of winged helix/forkhead proteins. *The Journal of biological chemistry* 281:17400-17409.
- Tsai KL, Sun YJ, Huang CY, Yang JY, Hung MC, Hsiao CD (2007) Crystal structure of the human FOXO3a-DBD/DNA complex suggests the effects of post-translational modification. *Nucleic acids research* 35:6984-6994.
- Tsai W-B, Chung YM, Takahashi Y, Xu Z, Hu MCT (2008) Functional interaction between FOXO3a and ATM regulates DNA damage response. *Nature cell biology* 10:460-467.
- Tuteja G, Kaestner KH (2007a) SnapShot: forkhead transcription factors I. *Cell* 130:1160.
- Tuteja G, Kaestner KH (2007b) Forkhead transcription factors II. *Cell* 131:192.
- Twelvetrees AE, Yuen EY, Arancibia-Carcamo IL, MacAskill AF, Rostaing P, Lumb MJ, Humbert S, Triller A, Saudou F, Yan Z, Kittler JT (2010) Delivery of GABAARs to synapses is mediated by HAP1-KIF5 and disrupted by mutant huntingtin. *Neuron* 65:53-65.
- Utikal J, Polo JM, Stadtfeld M, Maherali N, Kulalert W, Walsh RM, Khalil A, Rheinwald JG, Hochedlinger K (2009) Immortalization eliminates a roadblock during cellular reprogramming into iPS cells. *Nature* 460:1145-1148.

- Valor LM (2015) Transcription, epigenetics and ameliorative strategies in Huntington's Disease: a genome-wide perspective. *Molecular neurobiology* 51:406-423.
- van de Wetering M, Sancho E, Verweij C, de Lau W, Oving I, Hurlstone A, van der Horn K, Batlle E, Coudreuse D, Haramis AP, Tjon-Pon-Fong M, Moerer P, van den Born M, Soete G, Pals S, Eilers M, Medema R, Clevers H (2002) The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell* 111:241-250.
- van der Horst A, Burgering BM (2007) Stressing the role of FoxO proteins in lifespan and disease. *Nature reviews Molecular cell biology* 8:440-450.
- van der Horst A, Tertoolen LG, de Vries-Smits LM, Frye RA, Medema RH, Burgering BM (2004) FOXO4 is acetylated upon peroxide stress and deacetylated by the longevity protein hSir2(SIRT1). *The Journal of biological chemistry* 279:28873-28879.
- van Duijn PW, Ziel-van der Made AC, van der Korput JA, Trapman J (2010) PTEN-mediated G1 cell-cycle arrest in LNCaP prostate cancer cells is associated with altered expression of cell-cycle regulators. *The Prostate* 70:135-146.
- van Ham TJ, Holmberg MA, van der Goot AT, Teuling E, Garcia-Arencibia M, Kim HE, Du D, Thijssen KL, Wiersma M, Burggraaff R, van Bergeijk P, van Rheenen J, Jerre van Veluw G, Hofstra RM, Rubinsztein DC, Nollen EA (2010) Identification of MOAG-4/SERF as a regulator of age-related proteotoxicity. *Cell* 142:601-612.
- Varas F, Stadtfeld M, de Andres-Aguayo L, Maherali N, di Tullio A, Pantano L, Notredame C, Hochedlinger K, Graf T (2009) Fibroblast-derived induced pluripotent stem cells show no common retroviral vector insertions. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 27:300-306.
- Vashishtha M, Ng CW, Yildirim F, Gipson TA, Kratter IH, Bodai L, Song W, Lau A, Labadorf A, Vogel-Ciernia A, Troncosco J, Ross CA, Bates GP, Krainc D, Sadri-Vakili G, Finkbeiner S, Marsh JL, Housman DE, Fraenkel E, Thompson LM (2013) Targeting H3K4 trimethylation in Huntington disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110:E3027-3036.
- Vellai T, Takacs-Vellai K, Zhang Y, Kovacs AL, Orosz L, Muller F (2003) Genetics: influence of TOR kinase on lifespan in *C. elegans*. *Nature* 426:620.
- Venkatraman P, Wetzel R, Tanaka M, Nukina N, Goldberg AL (2004) Eukaryotic proteasomes cannot digest polyglutamine sequences and release them during degradation of polyglutamine-containing proteins. *Molecular cell* 14:95-104.
- Ventrucci A, Cuervo AM (2007) Autophagy and neurodegeneration. *Curr Neurol Neurosci Rep* 7:443-451.
- Vilchez D, Saez I, Dillin A (2014) The role of protein clearance mechanisms in organismal ageing and age-related diseases. *Nature communications* 5:5659.
- Vilchez V, Turcios L, Marti F, Gedaly R (2016) Targeting Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in hepatocellular carcinoma treatment. *World Journal of Gastroenterology* 22:823-832.
- Vonsattel JP, DiFiglia M (1998) Huntington disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 57:369-384.
- Vonsattel JP, Myers RH, Stevens TJ, Ferrante RJ, Bird ED, Richardson EP, Jr. (1985) Neuropathological classification of Huntington's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 44:559-577.
- Wadia JS, Dowdy SF (2002) Protein transduction technology. *Current opinion in biotechnology* 13:52-56.
- Walker KS, Deak M, Paterson A, Hudson K, Cohen P, Alessi DR (1998) Activation of protein kinase B beta and gamma isoforms by insulin in vivo and by 3-phosphoinositide-

- dependent protein kinase-1 in vitro: comparison with protein kinase B alpha. *The Biochemical journal* 331 ( Pt 1):299-308.
- Wan H, Dingle S, Xu Y, Besnard V, Kaestner KH, Ang SL, Wert S, Stahlman MT, Whitsett JA (2005) Compensatory roles of Foxa1 and Foxa2 during lung morphogenesis. *The Journal of biological chemistry* 280:13809-13816.
- Wang F, Chan CH, Chen K, Guan X, Lin HK, Tong Q (2012) Deacetylation of FOXO3 by SIRT1 or SIRT2 leads to Skp2-mediated FOXO3 ubiquitination and degradation. *Oncogene* 31:1546-1557.
- Wang MC, Bohmann D, Jasper H (2005) JNK extends life span and limits growth by antagonizing cellular and organism-wide responses to insulin signaling. *Cell* 121:115-125.
- Wang W, Lin C, Lu D, Ning Z, Cox T, Melvin D, Wang X, Bradley A, Liu P (2008) Chromosomal transposition of PiggyBac in mouse embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:9290-9295.
- Wang YQ, Cao Q, Wang F, Huang LY, Sang TT, Liu F, Chen SY (2015) SIRT1 Protects Against Oxidative Stress-Induced Endothelial Progenitor Cells Apoptosis by Inhibiting FOXO3a via FOXO3a Ubiquitination and Degradation. *Journal of cellular physiology* 230:2098-2107.
- Warby SC, Chan EY, Metzler M, Gan L, Singaraja RR, Crocker SF, Robertson HA, Hayden MR (2005) Huntingtin phosphorylation on serine 421 is significantly reduced in the striatum and by polyglutamine expansion in vivo. *Human molecular genetics* 14:1569-1577.
- Warren L, Manos PD, Ahfeldt T, Loh YH, Li H, Lau F, Ebina W, Mandal PK, Smith ZD, Meissner A, Daley GQ, Brack AS, Collins JJ, Cowan C, Schlaeger TM, Rossi DJ (2010) Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell stem cell* 7:618-630.
- Webb AE, Brunet A (2014) FOXO transcription factors: key regulators of cellular quality control. *Trends in biochemical sciences* 39:159-169.
- Webb AE, Kundaje A, Brunet A (2016) Characterization of the direct targets of FOXO transcription factors throughout evolution. *Aging cell* 15:673-685.
- Webb AE, Pollina EA, Vierbuchen T, Urbán N, Ucar D, Leeman DS, Martynoga B, Sewak M, Rando TA, Guillemot F, Wernig M, Brunet A (2013a) FOXO3 shares common targets with ASCL1 genome-wide and inhibits ASCL1-dependent neurogenesis. *Cell reports* 4.
- Webb AE, Pollina EA, Vierbuchen T, Urban N, Ucar D, Leeman DS, Martynoga B, Sewak M, Rando TA, Guillemot F, Wernig M, Brunet A (2013b) FOXO3 Shares Common Targets with ASCL1 Genome-wide and Inhibits ASCL1-Dependent Neurogenesis. *Cell Rep* 4:477-491.
- Weigel D, Jackle H (1990) The fork head domain: a novel DNA binding motif of eukaryotic transcription factors? *Cell* 63:455-456.
- Weigel D, Jürgens G, Küttner F, Seifert E, Jäckle H (1989) The homeotic gene fork head encodes a nuclear protein and is expressed in the terminal regions of the Drosophila embryo. *Cell* 57:645-658.
- Wellington CL, Singaraja R, Ellerby L, Savill J, Roy S, Leavitt B, Cattaneo E, Hackam A, Sharp A, Thornberry N, Nicholson DW, Bredesen DE, Hayden MR (2000) Inhibiting caspase cleavage of huntingtin reduces toxicity and aggregate formation in neuronal and nonneuronal cells. *The Journal of biological chemistry* 275:19831-19838.

- Wellington CL et al. (1998) Caspase cleavage of gene products associated with triplet expansion disorders generates truncated fragments containing the polyglutamine tract. *The Journal of biological chemistry* 273:9158-9167.
- Wernig M, Meissner A, Foreman R, Brambrink T, Ku M, Hochedlinger K, Bernstein BE, Jaenisch R (2007) In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* 448:318-324.
- Weydt P, Soyal SM, Gellera C, Didonato S, Weidinger C, Oberkofler H, Landwehrmeyer GB, Patsch W (2009) The gene coding for PGC-1alpha modifies age at onset in Huntington's Disease. *Mol Neurodegener* 4:3.
- Willcox DC, Willcox BJ, Wang NC, He Q, Rosenbaum M, Suzuki M (2008) Life at the extreme limit: phenotypic characteristics of supercentenarians in Okinawa. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences* 63:1201-1208.
- Woltjen K, Michael IP, Mohseni P, Desai R, Mileikovsky M, Hamalainen R, Cowling R, Wang W, Liu P, Gertsenstein M, Kaji K, Sung HK, Nagy A (2009) piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature* 458:766-770.
- Wong HC, Bourdelas A, Krauss A, Lee HJ, Shao Y, Wu D, Mlodzik M, Shi DL, Zheng J (2003) Direct binding of the PDZ domain of Dishevelled to a conserved internal sequence in the C-terminal region of Frizzled. *Molecular cell* 12:1251-1260.
- Wong YC, Holzbaur EL (2014) The regulation of autophagosome dynamics by huntingtin and HAP1 is disrupted by expression of mutant huntingtin, leading to defective cargo degradation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 34:1293-1305.
- Wood JG, Rogina B, Lavu S, Howitz K, Helfand SL, Tatar M, Sinclair D (2004) Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. *Nature* 430:686-689.
- Woods YL, Cohen P, Becker W, Jakes R, Goedert M, Wang X, Proud CG (2001) The kinase DYRK phosphorylates protein-synthesis initiation factor eIF2Bepsilon at Ser539 and the microtubule-associated protein tau at Thr212: potential role for DYRK as a glycogen synthase kinase 3-priming kinase. *The Biochemical journal* 355:609-615.
- Wyss M, Kaddurah-Daouk R (2000) Creatine and creatinine metabolism. *Physiol Rev* 80:1107-1213.
- Xia J, Lee DH, Taylor J, Vandelft M, Truant R (2003) Huntingtin contains a highly conserved nuclear export signal. *Human molecular genetics* 12:1393-1403.
- Xu M, Hu XT, Cooper DC, Moratalla R, Graybiel AM, White FJ, Tonegawa S (1994) Elimination of cocaine-induced hyperactivity and dopamine-mediated neurophysiological effects in dopamine D1 receptor mutant mice. *Cell* 79:945-955.
- Xu W, Kimelman D (2007) Mechanistic insights from structural studies of beta-catenin and its binding partners. *Journal of cell science* 120:3337-3344.
- Yamaguchi TP, Bradley A, McMahon AP, Jones S (1999) A Wnt5a pathway underlies outgrowth of multiple structures in the vertebrate embryo. *Development (Cambridge, England)* 126:1211-1223.
- Yamanaka S (2012) Induced Pluripotent Stem Cells: Past, Present, and Future. *Cell stem cell* 10:678-684.
- Yamanaka T, Miyazaki H, Oyama F, Kurosawa M, Washizu C, Doi H, Nukina N (2008) Mutant Huntingtin reduces HSP70 expression through the sequestration of NF-Y transcription factor. *The EMBO journal* 27:827-839.

- Yanai A, Huang K, Kang R, Singaraja RR, Arstikaitis P, Gan L, Orban PC, Mullard A, Cowan CM, Raymond LA, Drisdell RC, Green WN, Ravikumar B, Rubinsztein DC, El-Husseini A, Hayden MR (2006) Palmitoylation of huntingtin by HIP14 is essential for its trafficking and function. *Nature neuroscience* 9:824-831.
- Yang W, Dolloff NG, El-Deiry WS (2008) ERK and MDM2 prey on FOXO3a. *Nature cell biology* 10:125-126.
- Yao J, Lai E, Stifani S (2001) The winged-helix protein brain factor 1 interacts with groucho and hes proteins to repress transcription. *Molecular and cellular biology* 21:1962-1972.
- Yoshikawa S, McKinnon RD, Kokel M, Thomas JB (2003) Wnt-mediated axon guidance via the Drosophila Derailed receptor. *Nature* 422:583-588.
- You H, Yamamoto K, Mak TW (2006a) Regulation of transactivation-independent proapoptotic activity of p53 by FOXO3a. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:9051-9056.
- You H, Jang Y, You-Ten AI, Okada H, Liepa J, Wakeham A, Zaugg K, Mak TW (2004) p53-dependent inhibition of FKHRL1 in response to DNA damage through protein kinase SGK1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:14057-14062.
- You H, Pellegrini M, Tsuchihara K, Yamamoto K, Hacker G, Erlacher M, Villunger A, Mak TW (2006b) FOXO3a-dependent regulation of Puma in response to cytokine/growth factor withdrawal. *The Journal of experimental medicine* 203:1657-1663.
- Young AR, Chan EY, Hu XW, Kochl R, Crawshaw SG, High S, Hailey DW, Lippincott-Schwartz J, Tooze SA (2006) Starvation and ULK1-dependent cycling of mammalian Atg9 between the TGN and endosomes. *Journal of cell science* 119:3888-3900.
- Yu BP (1994) Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 74:139-162.
- Yu G, Wang LG, He QY (2015) ChIPseeker: an R/Bioconductor package for ChIP peak annotation, comparison and visualization. *Bioinformatics* 31:2382-2383.
- Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin, II, Thomson JA (2007) Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science (New York, NY)* 318:1917-1920.
- Yuan H, Corbi N, Basilico C, Dailey L (1995) Developmental-specific activity of the FGF-4 enhancer requires the synergistic action of Sox2 and Oct-3. *Genes & development* 9:2635-2645.
- Yusa K, Rad R, Takeda J, Bradley A (2009) Generation of transgene-free induced pluripotent mouse stem cells by the piggyBac transposon. *Nature methods* 6:363-369.
- Zala D, Hinckelmann MV, Saudou F (2013a) Huntingtin's function in axonal transport is conserved in Drosophila melanogaster. *PLoS one* 8:e60162.
- Zala D, Hinckelmann MV, Yu H, Lyra da Cunha MM, Liot G, Cordelieres FP, Marco S, Saudou F (2013b) Vesicular glycolysis provides on-board energy for fast axonal transport. *Cell* 152:479-491.
- Zallen JA (2007) Planar polarity and tissue morphogenesis. *Cell* 129:1051-1063.
- Zeitlin S, Liu JP, Chapman DL, Papaioannou VE, Efstratiadis A (1995) Increased apoptosis and early embryonic lethality in mice nullizygous for the Huntington's disease gene homologue. *Nat Genet* 11:155-163.

- Zhang N, An MC, Montoro D, Ellerby LM (2010) Characterization of Human Huntington's Disease Cell Model from Induced Pluripotent Stem Cells. *PLoS Currents* 2.
- Zhang SF, Hennessey T, Yang L, Starkova NN, Beal MF, Starkov AA (2011a) Impaired brain creatine kinase activity in Huntington's disease. *Neurodegener Dis* 8:194-201.
- Zhang X, Tang N, Hadden TJ, Rishi AK (2011b) Akt, FoxO and regulation of apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1813:1978-1986.
- Zhang Y, Xing Y, Zhang L, Mei Y, Yamamoto K, Mak TW, You H (2012) Regulation of cell cycle progression by forkhead transcription factor FOXO3 through its binding partner DNA replication factor Cdt1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109:5717-5722.
- Zhang Y, Liu T, Meyer CA, Eeckhoute J, Johnson DS, Bernstein BE, Nusbaum C, Myers RM, Brown M, Li W, Liu XS (2008) Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS). *Genome Biol* 9:R137.
- Zhang Y, Ikeno Y, Qi W, Chaudhuri A, Li Y, Bokov A, Thorpe SR, Baynes JW, Epstein C, Richardson A, Van Remmen H (2009) Mice deficient in both Mn superoxide dismutase and glutathione peroxidase-1 have increased oxidative damage and a greater incidence of pathology but no reduction in longevity. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences* 64:1212-1220.
- Zhao B, Tumaneng K, Guan KL (2011) The Hippo pathway in organ size control, tissue regeneration and stem cell self-renewal. *Nature cell biology* 13:877-883.
- Zhao J, Brault JJ, Schild A, Cao P, Sandri M, Schiaffino S, Lecker SH, Goldberg AL (2007) FoxO3 coordinately activates protein degradation by the autophagic/lysosomal and proteasomal pathways in atrophying muscle cells. *Cell metabolism* 6:472-483.
- Zheng Z, Diamond MI (2012) Huntington disease and the huntingtin protein. *Prog Mol Biol Transl Sci* 107:189-214.
- Zhong J, Kim HT, Lyu J, Yoshikawa K, Nakafuku M, Lu W (2011) The Wnt receptor Ryk controls specification of GABAergic neurons versus oligodendrocytes during telencephalon development. *Development (Cambridge, England)* 138:409-419.
- Zhou H, Wu S, Joo JY, Zhu S, Han DW, Lin T, Trauger S, Bien G, Yao S, Zhu Y, Siuzdak G, Scholer HR, Duan L, Ding S (2009) Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell stem cell* 4:381-384.
- Zhu G, Fan Z, Ding M, Mu L, Liang J, Ding Y, Fu Y, Huang B, Wu W (2014) DNA damage induces the accumulation of Tiam1 by blocking beta-TrCP-dependent degradation. *The Journal of biological chemistry* 289:15482-15494.
- Zuccato C, Valenza M, Cattaneo E (2010) Molecular Mechanisms and Potential Therapeutic Targets in Huntington's Disease. *Physiological Reviews* 90:905-981.
- Zuccato C, Ciammola A, Rigamonti D, Leavitt BR, Goffredo D, Conti L, MacDonald ME, Friedlander RM, Silani V, Hayden MR, Timmusk T, Sipione S, Cattaneo E (2001) Loss of huntingtin-mediated BDNF gene transcription in Huntington's disease. *Science (New York, NY)* 293:493-498.
- Zuccato C, Marullo M, Vitali B, Tarditi A, Mariotti C, Valenza M, Lahiri N, Wild EJ, Sassone J, Ciammola A, Bachoud-Levi AC, Tabrizi SJ, Di Donato S, Cattaneo E (2011) Brain-derived neurotrophic factor in patients with Huntington's disease. *PloS one* 6:e22966.