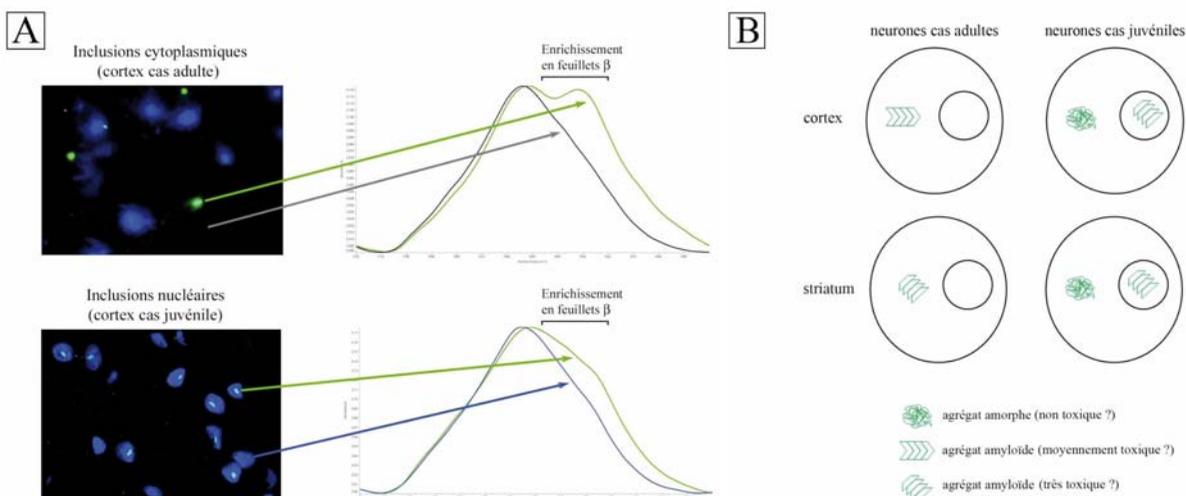


MALADIE DE HUNTINGTON

Etude par micro-spectroscopie infrarouge sur SMIS

La maladie de Huntington (MH) est caractérisée par la formation d'agrégats protéiques (inclusions) dans certaines régions cérébrales. Des données récentes suggèrent que la structure secondaire des protéines agrégées jouerait un rôle majeur dans la dégénérescence neuronale. La micro-spectroscopie infrarouge par rayonnement synchrotron constitue un outil de choix pour étudier la structure secondaire des protéines agrégées et pour déterminer si celle-ci varie en fonction de leur localisation subcellulaire ou tissulaire, ou selon que le patient est atteint de forme adulte ou juvénile de la maladie.



Analyse de la structure secondaire des protéines dans les inclusions. (A) Microscopie de fluorescence et spectroscopie infrarouge. Ces images révèlent la présence des inclusions dans le cytoplasme ou dans les noyaux des coupes de cortex de patients atteints de la forme adulte et juvénile de la MH. Les noyaux sont colorés en bleu et les inclusions en vert. Les spectres infrarouges des inclusions (vert) et des compartiments témoins (cytoplasme et noyau, respectivement en noir et en bleu) se différencient par la présence d'un épaulement correspondant à un enrichissement en feuillets β . (B) Modèle de l'agrégation protéique dans la MH proposé à partir des résultats obtenus sur la ligne SMIS.

La MH est une maladie génétique neurodégénérative qui affecte environ 6000 personnes en France. La symptomatologie associe des troubles moteurs, des troubles du comportement et une démence. La mutation responsable consiste en l'expansion d'une séquence répétitive du codon CAG dans le gène de la huntingtine. La traduction de cette séquence conduit à la synthèse d'une chaîne polyglutamine (polyQ) excessivement longue dans la protéine. Chez les individus sains, cette séquence comporte 20 à 35 répétitions. Une séquence longue de 36 à 60 répétitions conduit à la forme adulte de la maladie et une séquence dépassant 60 répétitions à la rare forme juvénile. La pathologie se caractérise surtout par une dégénérescence progressive très prononcée du striatum, mais également du cortex. La maladie est plus sévère et progresse plus rapide-

ment dans les cas juvéniles. Les inclusions se forment dans les neurones du corps strié et du cortex ; elles sont majoritairement cytoplasmiques dans les cas adultes et nucléaires dans les cas juvéniles.

Importance de la structure secondaire des agrégats protéiques

Les mécanismes d'agrégation entrant en jeu dans la MH sont étudiés depuis le début des années 90 et la capacité de peptides polyQ synthétiques à former des agrégats riches en feuillets β (dits amyloïdes) a rapidement été mise en évidence. La huntingtine peut former une variété d'agrégats in vitro : oligomériques (petits agrégats solubles), annulaires, amorphes (sans organisation structurelle apparente) et fibrillaires. Des études récentes ont montré que les conditions expérimentales ont une influence sur

la structure secondaire adoptée par les protéines dans les agrégats de polyQ, et que cette structure jouerait un rôle décisif dans la toxicité cellulaire. Par exemple, une simple variation de la température peut modifier à la fois la structure d'un peptide polyQ et sa cytotoxicité.

La structure secondaire des agrégats protéiques présents dans le cerveau des patients atteints de MH reste inconnue et rien ne prouve que les agrégats formés in vitro reproduisent la structure des agrégats des malades. Si l'environnement joue un rôle important dans la conformation adoptée par les agrégats, la complexité biochimique du cerveau humain pourrait moduler l'agrégation différemment de ce qui a été rapporté in vitro. L'examen d'échantillons de cerveaux de patients offre l'occasion de déterminer la structure des inclusions in situ. Pour ce genre

Guylaine Hoffner,
William André
et Philippe Djian,
de l'Unité CNRS
« Régulation de
la Transcription
et Maladies
Génétiques »,
Université Paris
Descartes.



d'étude, l'analyse par microspectroscopie infrarouge (IR) par rayonnement synchrotron est particulièrement adaptée.

Analyse de la structure secondaire des inclusions protéiques par micro-spectroscopie infrarouge synchrotron

Du fait de la petite taille des inclusions (quelques microns), l'analyse de leur structure requiert une technique extrêmement sensible, comme la source IR synchrotron, puisque la finesse du faisceau et son intensité rendent possible une analyse à l'échelle cellulaire. Le spectre IR d'un échantillon permet de définir la constitution chimique de l'échantillon ainsi que la conformation de ses liaisons atomiques ; il donne ainsi accès à des informations sur la structure secondaire des protéines. Cette technique n'est pas destructrice et il est possible de coupler l'analyse IR à la microscopie de fluorescence qui permet de repérer les inclusions marquées par des anticorps couplés à un marqueur fluorescent.

Guylaine Hoffner et William André, qui travaillent dans l'équipe de Philippe Djian, ont étudié des cerveaux de patients atteints de MH en collaboration avec la ligne de lumière SMIS. Des coupes de cerveau ont été déposées sur des lames et les inclusions localisées grâce à un marquage fluorescent de la huntingtine à l'aide d'un anticorps spécifique. Les coupes ont ensuite été analysées avec un microscope IR Thermo Nicolet Continuum XL en mode transmission. Pour les

analyses dans l'IR moyen (4000-800 cm^{-1}), le faisceau synchrotron est focalisé sur l'échantillon avec une résolution spatiale de 6 μm . Dans ces conditions, le rayonnement IR synchrotron est 100 fois plus brillant que celui émis par une source conventionnelle.

Les chercheurs ont acquis des spectres IR des différents types d'inclusions et de leurs compartiments témoins (cytoplasmes ou noyaux). Ils se sont focalisés sur la bande d'absorption de l'amide I (1600-1720 cm^{-1}), une région spectrale très sensible à la structure secondaire des protéines. L'étude des différences entre les spectres des inclusions et des témoins a ensuite révélé les caractéristiques structurales des inclusions. Les structures amyloïdes ont une signature particulière en IR (fig. 1A).

Mise en évidence du polymorphisme structural des inclusions et lien avec la dégénérescence neuronale

Les inclusions cytoplasmiques du cortex et du corps strié des patients adultes sont toutes deux fortement enrichies en feuillets β (fig. 1A), mais leurs spectres IR et donc leurs conformations amyloïdes présentent des différences. Le fait que la dégénérescence soit plus prononcée dans le corps strié que dans le cortex des cas adultes suggère que la structure amyloïde des inclusions du corps strié est plus toxique pour les neurones que celle du cortex. Quant aux cas juvéniles, leurs inclusions nucléaires ont une conformation amyloïde comparable à celle des in-

clusions cytoplasmiques du corps strié des cas adultes alors que leurs inclusions cytoplasmiques constituent des agrégats amorphes sans structure amyloïde. Les inclusions nucléaires seraient donc toxiques chez le patient juvénile, alors que les inclusions cytoplasmiques seraient inoffensives.

Ce travail confirme l'existence d'agrégats amyloïdes et décrit un tableau complexe de l'agrégation à son stade terminal dans la MH (fig. 1B). Il suggère aussi un lien entre la nature des structures amyloïdes des agrégats et leur toxicité neuronale. Il reste maintenant à vérifier expérimentalement la toxicité des conformations amyloïdes décrites dans cette étude et à essayer de comprendre les mécanismes de cette toxicité. La flexibilité des agrégats protéiques pourrait, par exemple, dépendre de leur conformation amyloïde, permettant ou non l'exposition de la polyQ à leur surface. Cette dernière pourrait ainsi interagir avec des composants cellulaires et conduire à la mort de la cellule.

→ Contacts :

guylaine.hoffner@parisdescartes.fr,
paul.dumas@synchrotron-soleil.fr

Références :

- Chen et al. *Biochemistry*, 41, 7391-7399 (2002)
- Hiramatsu & Kitagawa, *Biochim Biophys Acta*, 1753, 100-107 (2005)
- Jackson & Mantsch, *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 30: 95-120 (1995)
- Nagai & Popiel, *Curr Pharm Des*, 14, 3267-3279 (2008)
- Nekooki-Machida et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 9679-9684 (2009)
- Poirier et al. *J Biol Chem*, 277, 41032-41037 (2002)
- Scherzinger et al. *Cell*, 90, 549-558 (1997)
- Wacker et al. *Nat Struct Mol Biol*, 11, 1215-1222 (2004)