

Université de Montréal

Caractérisation de sarsine, la protéine responsable de l'ataxie de Charlevoix-Saguenay

Chantal LeBlanc

Département de biochimie

Faculté de médecine



Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.) en biochimie

août 2004

11618366

©Chantal LeBlanc, 2004



W
4
U58
2005
V.110

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

**Caractérisation de sarsine, la protéine responsable de l'ataxie
récessive de Charlevoix-Saguenay**

présenté par :

Chantal LeBlanc

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Président-rapporteur : Michaud, Jacques

Directrice de recherche: Richter, Andrea

Membre du jury: Desgroseillers, Luc

RÉSUMÉ

L'ataxie récessive spastique autosomique de Charlevoix-Saguenay (ARSACS) est une maladie neurodégénérative progressive de prévalence élevée dans la région de Charlevoix-Saguenay-Lac-St-Jean, au nord-est du Québec. Le gène responsable de l'ARSACS, nommé *SACS*, a été identifié. Ce gène code pour une protéine d'environ 520 kDa appelée saccine, dont le rôle est présentement inconnu. Des analyses de comparaison de séquences n'ont démontré aucune similarité extensive entre saccine et une autre protéine. Cependant, elle possède trois régions semblables à la portion N-terminale de la chaperonne Hsp90 et un motif semblable au domaine J de DnaJ. Ce projet de recherche avait pour but la caractérisation de saccine. Nous avons démontré la présence de saccine dans des fibroblastes normaux et son absence dans les fibroblastes de patients. Des analyses de l'expression de saccine ont révélé qu'elle est principalement exprimée au niveau du cerveau. La localisation subcellulaire de saccine a été analysée par fractionnement subcellulaire et par immunocytochimie. Nos résultats suggèrent que saccine est localisée au niveau du cytoplasme et du réticulum endoplasmique. Étant donné la présence des domaines Hsp90 et DnaJ dans la séquence de saccine, nous avons étudié l'effet d'un stress thermique sur son niveau d'expression. Aucune différence d'expression n'a été observée suite à un choc thermique. Finalement, dans le but d'identifier les partenaires d'interaction de saccine, nous avons utilisé le système de double hybride en levure. Malgré plusieurs criblages d'une banque d'ADNc de cerveaux humain, aucun partenaire d'interaction n'a été identifié.

Mots clés: saccine, ARSACS, ataxie, double-hybride, chaperone moléculaire

ABSTRACT

Autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay (ARSACS) is a neurodegenerative disease with high prevalence in the Charlevoix-Saguenay-Lac-Saint-Jean region of northeastern Québec. The disease causing gene, *SACS*, has been identified. It encodes a large protein (520 kDa) of unknown function called saccin. This protein does not share extensive similarity with other known proteins. It does however possess 3 regions similar to the N-terminal domain of Hsp90 and a DnaJ domain. The aim of this project was to begin the characterisation of saccin. We show that saccin is absent in patient fibroblasts, in contrast to control fibroblasts. Expression analysis using mouse tissue revealed that saccin is predominantly expressed in the brain. Subcellular localisation analysis was done using cell fractionation techniques as well as immunocytochemistry. Our results suggest that saccin is localised in the cytoplasm as well as being associated with the endoplasmic reticulum. The presence of heat shock protein domains in the primary sequence of saccin suggests a possible chaperone function for this protein. In order to address this question, we analysed the expression of saccin in fibroblast cells before and after a heat shock. We did not observe a difference in the level of expression. Finally, in order to identify saccin's interaction partners, we screened a human cDNA library using the yeast two-hybrid system. Though many different screenings were done, no interaction partners were revealed.

Key words: saccin, ARSACS, ataxia, yeast two-hybrid, molecular chaperone

TABLE DES MATIERES

<u>Titres</u>	<u>Pages</u>
RÉSUMÉ.....	III
ABSTRACT	IV
TABLE DES MATIÈRES	V
Liste des figures	IX
Liste des tableaux.....	XI
Liste des abréviations.....	XII
Liste des codes des acides aminés.....	XIV
REMERCIEMENTS.....	XV
CHAPITRE I: INTRODUCTION.....	1
I.1 ARSACS	
I.1.1 Épidémiologie de la maladie.....	2
I.1.2 Description clinique de l'ARSACS.....	3
I.1.3 Observations neuropathologiques.....	6
I.2 Identification du gène responsable de l'ARSACS.....	6
I.2.1 Clonage positionnel.....	6
I.2.2 Cartographie physique de haute résolution et gènes candidats.....	7
I.2.3 Révélation d'un ORF de 11.5 kb et du gène <i>SACS</i>	9

I.3 <i>SACS</i>	10
I.3.1 Structure du gène.....	10
I.3.2 Mutations identifiées chez les patients ARSACS.....	10
I.3.3 Expression de <i>SACS</i>	14
I.4 Sacsine.....	14
I.4.1 Domaine HEPN.....	17
I.4.2 Domaines Hsp90 et DnaJ.....	19
I.4.3 Distribution taxonomique de saccine.....	21
I.5 Objectifs du projet de recherche	21
CHAPITRE II: MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	23
II.1 Purification des anticorps anti-saccine.....	24
II.2 Culture cellulaire	25
II.2.1 Mise en culture des lignées cellulaires.....	25
II.2.2 Entretien des cultures.....	25
II.3 Étude de l'expression de saccine.....	26
II.3.1 Extraction des protéines totales.....	26
II.3.2 Buvarpage western.....	26
II.3.2.1 SDS-PAGE et transfert.....	26
II.3.2.2 Immunodétection indirecte.....	27
II.4 Localisation subcellulaire de saccine.....	29

II.4.1 Immunocytochimie.....	29
II.4.2 Fractionnement subcellulaire.....	31
II.5 Technique du double hybride	31
II.5.1 Principe de la technique du double hybride.....	31
II.5.2 Souches de levures.....	32
II.5.3 Entretien des cultures de levures.....	32
II.5.4 Construction des appâts.....	33
II.5.4.1 Production des produits PCR- <i>attB</i>	33
II.5.4.2 Clonage des produits PCR- <i>attB</i>	35
II.5.4.3 Sous-clonage du vecteur d'entrée dans un vecteur d'expression	35
II.5.4.4 Séquençage.....	36
II.5.5 Transformation de l'appât dans les levures.....	36
II.5.6 Vérification de l'absence d'auto-activation par les appâts.....	37
II.5.7 Préparation de la banque d'ADNc.....	37
II.5.8 Criblage de la banque d'ADNc.....	38
II.5.9 Détection des partenaires d'interaction candidats.....	39
CHAPITRE III: RÉSULTATS.....	40
III.1 Détection de sarsine.....	41
III.1.1 Caractérisation des anticorps anti-sarsine.....	41
III.1.2 Expression de sarsine dans les fibroblastes humains.....	44
III.1.3 Distribution de sarsine dans les tissus murins.....	47

III.2 Localisation subcellulaire de sarsine.....	49
III.2.1 Fractionnement subcellulaire.....	49
III.2.2 Immunocytochimie.....	52
III.3 Analyse de l'effet d'un choc thermique sur l'expression et la localisation subcellulaire de sarsine.....	56
III.4 Technique du double hybride.....	61
CHAPITRE IV: DISCUSSION	64
IV.1 Expression de sarsine.....	65
IV.2 Localisation subcellulaire.....	67
IV.3 Recherche des partenaires d'interaction de sarsine par la technique du double hybride.....	70
IV.3.1 Stratégie utilisée pour la recherche Des partenaires d'interaction.....	70
IV.4 Analyse de l'effet d'un choc thermique sur l'expression et la localisation subcellulaire de sarsine.....	74
IV.5 Isoforme de sarsine.....	76
IV.6 Distribution phylogénétique de sarsine.....	76
IV.7 Hypothèses concernant la fonction cellulaire de sarsine.....	78
IV.7.1 Domaines Hsp90.....	78
IV.7.2 Motif DnaJ.....	81
IV.7.3 Domaine HEPN.....	86
IV.7.4 Interaction potentiel entre sarsine et le récepteur LRP1b.....	87
IV.8 Conclusion et perspectives.....	87

BIBLIOGRAPHIE	90
----------------------------	-----------

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE I		Pages
Figure I.1	Rétine démontrant une hypermyélinisation des fibres nerveuses.....	5
Figure I.2	Représentation schématique de la région du gène d'ARSACS.....	8
Figure I.3	Structure du gène <i>SACS</i>	11
Figure I.4	Alignement de séquence des 4 segments répétés de saccine.....	15
Figure I.5	Domaines et motifs présents dans la séquence de saccine.....	16
 CHAPITRE III		
Figure III.1	Anticorps contre saccine.....	42
Figure III.2	Détection de saccine par buvardage Western.....	43
Figure III.3	Détection de saccine dans des extraits protéiques de cellules fibroblastes humaines par buvardage Western.....	45

Figure III.4	Analyse de l'expression de salsine dans différents tissus murins par buvardage Western.....	48
Figure III.5	Étapes principales du fractionnement subcellulaire du cerveau de souris.....	50
Figure III.6	Analyse de la localisation subcellulaire de salsine par fractionnement subcellulaire.....	51
Figure III.7	Analyse de la localisation subcellulaire de salsine par immunocytochimie.....	53
Figure III.8	Analyse de co-localisation entre salsine et le réticulum endoplasmique.....	55
Figure III.9	Analyse de co-localisation entre salsine et l'appareil de Golgi.....	57
Figure III.10	Analyse de co-localisation entre salsine et l'actine.....	58
Figure III.11	Analyse de l'effet d'un choc thermique sur l'expression de salsine par buvardage Western.....	59
Figure III.12	Analyse immunocytochimique de l'effet d'un choc thermique sur l'expression et la localisation subcellulaire de salsine.....	60
Figure III.13	Appâts utilisés lors des criblages par la technique du double hybride en levure.....	63
CHAPITRE IV		
Figure IV.1	Épissage alternatif putatif du gène <i>SACS</i>	77

Figure IV.2	Alignement de séquences entre saccine et son homologue végétal retrouvé chez <i>A.thaliana</i>	79
Figure IV.3	Alignement de séquence des trois domaines Hsp90 de saccine (Rep1, 2 et 3) et de la région N-terminale de Hsp90.....	80
Figure IV.4	Motifs conservés entre les domaines de liaison de l'ATP de Topoisomérase II, Hsp90, MutL et les 3 régions Hsp90 de saccine.....	82
Figure IV.5	Alignement de séquences du domaine DnaJ de saccine et du domaine J de Hsp40.....	83
Figure IV.6	Structure du domaine J.....	85

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE I		Pages
Tableau I	Mutations identifiées dans le gène <i>SACS</i>	13
 CHAPITRE II		
Tableau I	Anticorps utilisés pour les buvardages Western.....	28
Tableau II	Anticorps utilisés pour l'immunocytochimie.....	30
Tableau III	Séquences et positions des amorces utilisées Pour la construction des appâts.....	34

LISTE DES ABREVIATIONS

A	Adénine
3AT	3-Amino-1,2,4-Tiazole
ADN	Acide déoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ARNm	ARN messenger
ARSACS	Ataxie récessive spastique autosomique de Charlevoix-Saguenay
BAC	Chromosome bactérien artificiel
BSA	Albumine de sérum de bovin
CSLSJ	Charlevoix-Saguenay-Lac-St-Jean
C	Cytosine
cM	Centimorgan
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindole
DL	Domaine de liaison
DA	Domaine d'activation
DO	Densité optique
EST	«Expressed sequence tag»
G	Guanine
HEPN	Higher eukaryotes and prokaryotes nucleotide binding
HSE	Heat shock element
kDa	Kilodalton
KDEL	Récepteur KDEL

KNTase	Kanamycine nucléotidyltransférase
MEM	Milieu essential minimum
NCBI	National Centre for Biotechnology Information
NMD	Non-sens mediated decay
nrEST	«Non redundant expressed sequence Tag»
NT	Nucléotidyltransférase
ORF	Cadre de lecture ouvert
PAC	Chromosome P1 artificiel
Pb	Paires de bases
PBS	Phosphate buffered saline
PVDF	Polyvinylidene fluoride
TBS	Tris buffered saline
SC	Synthétique complet
SCA	Ataxie spinocérébelleuse
STS	Séquence étiquetée
T	Thymine
U	Uracyl
YPAD	Extrait de levure-peptone-dextrose-adénine

LISTE DES CODES DES ACIDES AMINES

A	Ala	Alanine
C	Cys	Cystéine
D	Asp	Acide aspartique
E	Glu	Acide glutamique
F	Phe	Phénylalanine
G	Gly	Glycine
H	His	Histidine
I	Ile	Isoleucine
K	Lys	Lysine
L	Leu	Leucine
M	Met	Méthionine
N	Asn	Asparagine
P	Pro	Proline
Q	Gln	Glutamine
R	Arg	Arginine
S	Ser	Sérine
T	Thr	Thréonine
V	Val	Valine
W	Trp	Tryptophane
Y	Tyr	Tyrosine

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier ma directrice de recherche, le Dr. Andrea Richter, pour la confiance qu'elle a eue en mes capacités et surtout pour sa générosité exceptionnelle. De plus, je tiens à souligner sa contribution à la correction de ce mémoire.

Ma reconnaissance va également aux membres de mon laboratoire; Jocelyne, Bin, Virginie et Laura. C'était un plaisir de travailler avec vous. Je remercie aussi les membres des autres laboratoires du centre de génétique de l'hôpital Sainte-Justine.

Je tiens à remercier la Fondation de l'ataxie de Friedrich pour le soutien financier qu'ils m'ont apporté durant ma maîtrise.

Je remercie du fond du cœur mes parents et mes sœurs pour leur soutien et leur encouragement continuel. Je vous aime.

Finalement, je remercie Yannick, sans qui je n'aurais jamais terminé ce mémoire! Je te remercie infiniment pour ton support et ta patience, mais surtout, pour ton amitié.

CHAPITRE I : INTRODUCTION

I.1 ARSACS

L'ataxie récessive spastique autosomique de Charlevoix-Saguenay (ARSACS; OMIM 270550) a été décrite pour la première fois en 1978 par Bouchard *et al.*. Le terme ataxie, d'origine grecque, signifie désordre. Plus précisément, une ataxie consiste en une déficience de la coordination musculaire. Les ataxies héréditaires sont un groupe hétérogène de maladies neurodégénératives héréditaires caractérisées par une ataxie progressive et par une atteinte au cervelet et/ou de ses faisceaux neuronaux (Greenfield, 1954). On distingue deux grands groupes parmi les ataxies héréditaires selon leur mode de transmission : les ataxies autosomiques dominantes et autosomiques récessives (Harding *et al.*, 1983). L'ARSACS est une ataxie récessive, tout comme l'ataxie de Friedrich (OMIM 229300), la forme la plus courante des ataxies héréditaires. Les formes dominantes sont principalement représentées par les ataxies spinocérébelleuses (SCA) (Klockgether & Evert, 1998).

I.1.1 Épidémiologie de l'ARSACS

L'ARSACS doit son nom à la fréquence élevée de la maladie dans la région de Charlevoix-Saguenay-Lac-St-Jean (CSLSJ), au nord-est du Québec. On estime qu'une personne sur 22 est porteuse d'un allèle responsable de l'ARSACS dans cette région de la province (Bouchard *et al.*, 1978). Avec plus de 300 individus affectés par la maladie, l'ARSACS est l'ataxie spastique héréditaire la plus commune au Québec. La prévalence élevée de l'ARSACS et d'autres maladies récessives rares dans la région de CSLSJ est probablement le résultat d'un phénomène appelé « effet fondateur ». L'effet fondateur consiste en une fluctuation importante des fréquences alléliques dans une nouvelle

population créée par la migration d'un petit nombre d'individus à partir d'une population mère (Mayr *et al.*, 1954). Dans le cas de l'ARSACS, un ou plusieurs colonisateurs de Charlevoix étaient probablement porteurs d'un allèle muté responsable de la maladie. Le nombre restreint d'habitants dans cette région géographiquement isolée aurait éventuellement conduit à l'augmentation de la fréquence de cet allèle dans la population, ainsi que d'autres mutations responsables de maladies récessives retrouvées dans cette région (De Braekeleer *et al.*, 1993). En effet, il y a une prévalence élevée pour quatre maladies récessives autres que l'ARSACS dans la région de CSLSJ, soit la fibrose kystique (OMIM 219700), l'acidose lactique par déficience en cytochrome oxydase (OMIM 220111), la tyrosinémie (OMIM 276700) et la neuropathie sensitivomotrice (OMIM 218000) (De Braekeleer *et al.*, 1991; Scriver, 2001).

Jusqu'à très récemment, l'ARSACS avait seulement été identifiée au Québec. Cependant, d'autres cas d'ARSACS ont été rapportés dernièrement dans divers pays, indiquant que cette maladie n'est pas unique au Québec. À ce jour, la maladie a été identifiée en Tunisie, Turquie, Japon et en Italie (Mrissa *et al.*, 2000; El Euch-Fayache *et al.*, 2003; Grieco *et al.*, 2004; Criscuolo *et al.*, 2004). Des ataxies avec des caractéristiques semblables à l'ARSACS ont également été rapportées en France et en Espagne (Pascual-Castroviejo *et al.*, 2000). Toutefois, le diagnostic final n'a pas encore été confirmé.

I.1.2 Description clinique

Un des premiers symptômes de l'ARSACS est la spasticité au niveau des membres inférieurs. Ce symptôme se manifeste habituellement lors de l'apprentissage de la marche et est caractérisé par un manque d'équilibre entraînant des chutes fréquentes

(Bouchard *et al.*, 1978). De plus, on observe des troubles d'articulation lors de l'enfance qui progressent vers des troubles d'élocution plus sévères (dysarthrie) à l'âge adulte. Les signes de type non évolutif de la maladie comprennent des réflexes tendineux augmentés, une réponse plantaire bilatérale anormale et une poursuite oculaire saccadique. Une caractéristique particulière de l'ARSACS est une hypermyélinisation des fibres nerveuses de la rétine (Figure I.1). Ces signes suggèrent que le processus de myélinisation est anormal chez les individus atteints de cette maladie (Bouchard *et al.*, 1978 ; Bouchard *et al.*, 1991).

Les signes progressifs de la maladie deviennent plus évidents lors de l'adolescence et après l'âge de vingt ans. Par exemple, les réflexes achilléens disparaissent vers l'âge de 25 ans et une amyotrophie distale est habituellement observable chez ces patients. De plus, une électromyographie démontre une dénervation sévère dans les muscles distaux (Bouchard *et al.*, 1979). Il a été avancé que les signes progressifs de la maladie seraient dus à une dégénération des neurones moteurs (Bouchard *et al.*, 1993).

Des études sur la conduction nerveuse démontrent une augmentation dans la latence distale et une diminution de la vitesse de conduction des nerfs moteurs. Ce dernier symptôme est plus prononcé au niveau des membres inférieurs (Bouchard *et al.*, 1979). Dans la plupart des cas, il est impossible d'engendrer un potentiel d'action dans la région distale des jambes après l'âge de 40 ans. Ceci indique que toute conduction nerveuse vers cette région est inhibée. En conséquence, l'âge moyen pour que les patients soient contraints à un fauteuil roulant est 41 ans. La maladie ne semble pas affecter les

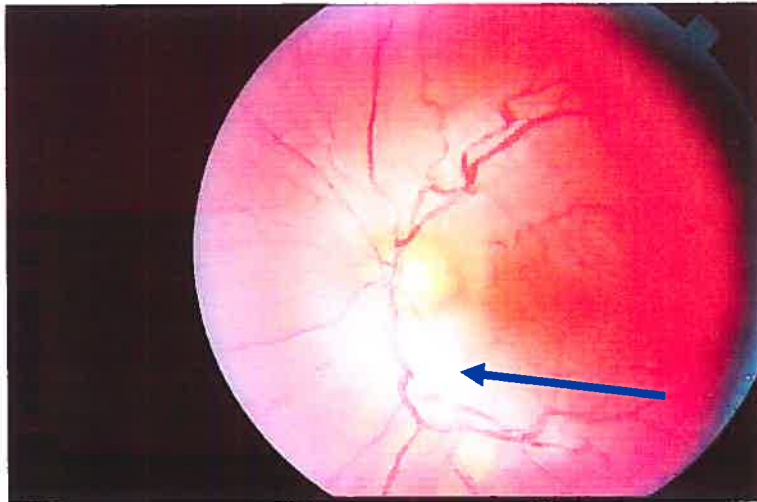


Figure I.1 Rétine démontrant une hypermyélinisation des fibres nerveuses. La flèche indique une région de la rétine affectée par une hypermyélinisation des fibres nerveuses. Cette caractéristique de l'ARSACS a été observée chez tous les patients québécois examinés. Cette figure est tirée de Bouchard *et al.*, 1998.

capacités intellectuelles. De plus, l'espérance de vie des individus atteints de l'ARSACS ne semble pas être affectée par la maladie (Bouchard *et al.*, 1979).

I.1.3 Observations neuropathologiques

Des autopsies ont été effectuées sur 5 patients à ce jour. Dans tous les cas, des observations semblables ont été rapportées. Une atrophie sévère du cerveau a été notée chez les patients atteints de l'ARSACS, particulièrement au niveau du cervelet où on observe une quasi-absence des cellules de Purkinje (Bouchard *et al.*, 1998). Les neurones thalamiques, pyramidaux et olivaires, ainsi que les cellules de Purkinje et les noyaux dentelés, semblent être particulièrement affectés par la maladie, démontrant des signes de chromatolyse (Robitaille *et al.*, en préparation).

I.2 IDENTIFICATION DU GÈNE RESPONSABLE DE L'ARSACS

I.2.1 Clonage positionnel

La cartographie du locus génomique responsable de l'ARSACS a été effectuée par la technique du clonage positionnel. Cette technique permet l'identification de la région chromosomique où se situe un gène grâce à sa liaison génétique avec un ou plusieurs marqueurs situés au niveau du génome. Les microsatellites ont été utilisés comme marqueurs génomiques lors de cette étude. Ces marqueurs polymorphiques sont caractérisés par des motifs d'au moins deux nucléotides répétés en tandem (Litt & Luty, 1989). Afin de cartographier le locus d'ARSACS, 298 microsatellites, séparés par une distance moyenne de 12 cM (1 cM \approx 1 000 000 pb), ont été examinés chez 29 individus atteints de la maladie et 18 parents provenant de 12 familles. Les 298 marqueurs ont été

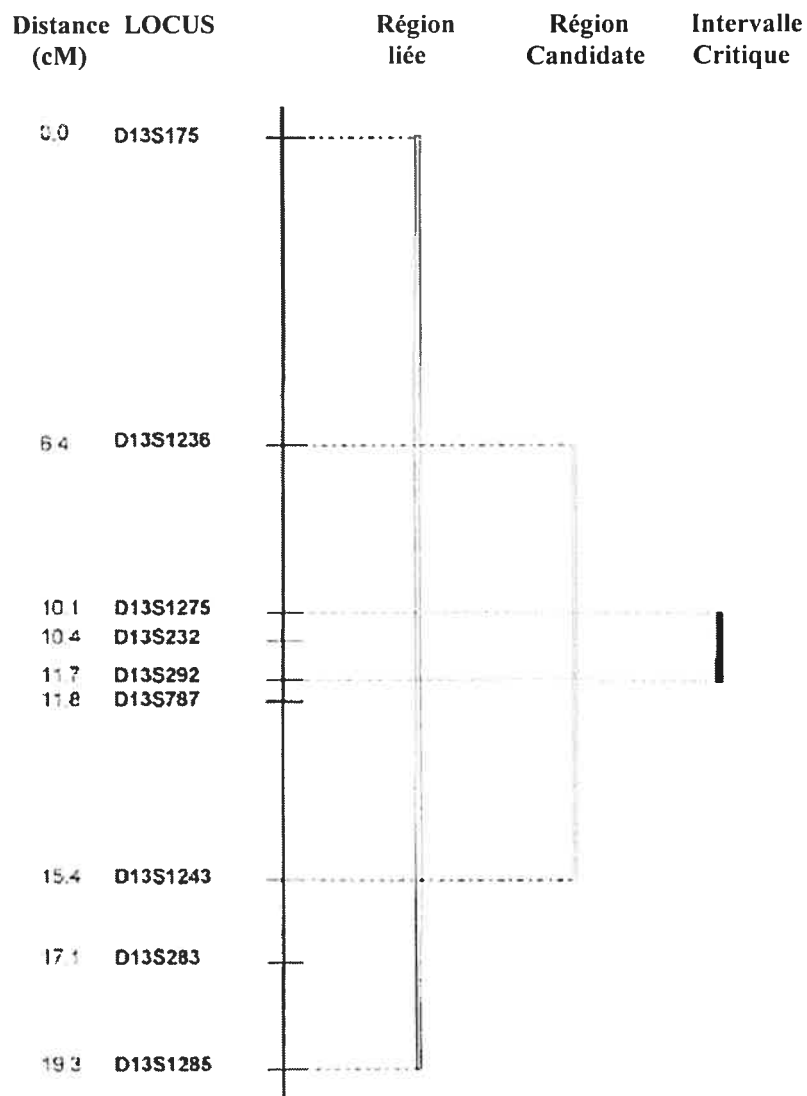


Figure I.2 Représentation schématique de la région du gène d'ARSACS. La région liée a été déterminée par analyse des haplotypes. La région candidate a été délimitée en analysant les évènements de recombinaison observés chez les individus atteints de l'ARSACS. L'intervalle critique a été déterminée par une analyse de lod score. Cette figure est tirée de Engert *et al.*, 1999.

I.2.3 Révélation d'un ORF de 11.5 kb et du gène *Sacs*

Six clones BAC et PAC, comprenant en tout 450 kb au niveau de la région critique du gène de l'ARSACS, ont été sous-clonés dans un vecteur M13 afin d'en faire le séquençage. Les régions codantes potentielles ont été déterminées en comparant la séquence obtenue avec les bases de données nrEST («non-redundant EST») et dbEST («database of EST») maintenues par NCBI («National Centre for Biotechnology Information»). Cette analyse a permis d'identifier la présence de plusieurs ESTs dans la séquence de la région critique. De plus, une analyse avec le logiciel STADEN (version 1997.1) (Bonfield *et al.*, 1995; Bonfield & Saden, 1996) a démontré que l'assemblage de plusieurs de ces ESTs permettait l'obtention d'un cadre de lecture ouvert (ORF). L'assemblage d'un contig de 20 kb a révélé que cet ORF avait une taille de 11 487 pb et qu'il codait pour 3 829 acides aminés (Engert *et al.*, 2000).

Afin de confirmer que l'exon identifié faisait partie du gène responsable de l'ARSACS, des produits de PCR de l'ADN de patients et d'individus normaux ont été séquencés. Deux mutations distinctes ont été retrouvées chez les patients. La première, associée à l'haplotype majeur, est une délétion. Une deuxième mutation de type non-sens a été associée à l'haplotype mineur de l'ARSACS. Le gène a été nommé *SACS* et la protéine qu'il encode, saccine (Engert *et al.*, 2000).

I.3 *SACS*

I.3.1 Structure du gène

Le gène *SACS* a la particularité de contenir un exon d'une longueur remarquable de 12 794 pb. En effet, cet exon est le plus grand exon découvert chez un vertébré à ce jour. Suite à la découverte du gène (Engert *et al.*, 2000), il a été avancé que cet exon comprenait le gène complet. Par la suite, des analyses par reverse transcription sur des extraits d'ARN de fibroblastes humains ont démontré la présence de 9 autres exons situés en 5' du grand exon (Figure I.3) (Mercier *et al.*, en préparation). Étant donné qu'un promoteur en amont du premier exon putatif n'a pas encore été identifié, la possibilité demeure qu'il y ait d'autres exons en 5' des exons déjà identifiés. Des analyses par RT-PCR et par 5' RACE sur des extraits d'ARN de cerveau humain adulte et fœtal ont aussi démontré la présence des 9 exons nouvellement identifiés. Cependant, les résultats préliminaires de ces analyses suggèrent la présence de variants d'épissage du gène (Mercier *et al.*, en préparation). Le gène a donc un cadre de lecture ouvert putatif de 13 740 pb et s'étend sur une région génomique d'environ 105 kb.

I.3.2 Mutations identifiées chez les patients ARSACS

Deux mutations distinctes ont été identifiées chez les patients québécois. La mutation la plus fréquente est une délétion ΔT à la position 6 594 (Genbank NM_014363.1 gi :7657533, exon 10 de la figure I.3). 92,7% des patients québécois sont homozygotes pour cette mutation qui provoque un changement dans le cadre de lecture du gène, menant à l'introduction d'un codon stop prématuré. La deuxième mutation est

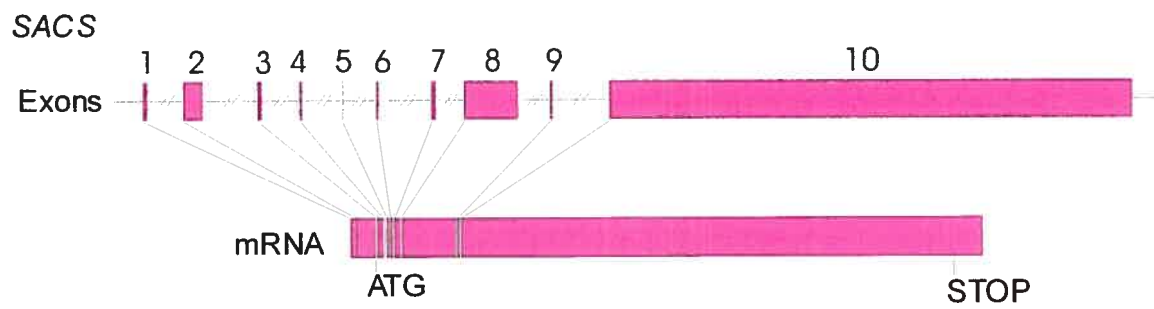


Figure I.3 Structure du gène *SACS*.

du type non-sens, soit une substitution C→T à la position 5 254 (Genbank NM_014363.1 gi :7657533, exon 10 de la figure I.3) provoquant la substitution d'une arginine pour un codon stop. 3,7 % des patients sont hétérozygotes pour les deux mutations connues et seulement un patient homozygote pour la mutation 5254C→T a été identifié à ce jour. 3,7% des patients sont hétérozygotes pour la mutation majeure, mais ne sont pas porteurs de la mutation mineure. Ceci suggère donc la présence d'une mutation inconnue dans le gène *SACS*. Le séquençage complet de tous les exons connus n'a pas mené à l'identification d'une mutation. Des expériences sont présentement en cours pour identifier la (les) mutation(s) inconnue(s). Aucune différence phénotypique n'a été observée entre les patients porteurs de différentes mutations (Richter, 2003).

Des nouvelles mutations dans *SACS* ont récemment été identifiées chez des familles d'origine turque, tunisienne, italienne et japonaise. L'identification de ces mutations a permis de confirmer le diagnostic génétique de l'ARSACS chez ces individus souffrant d'une ataxie. Chez cinq familles turques souffrant d'une ataxie spastique liée à la région chromosomique 13q11, 4 nouvelles mutations dans le gène *SACS* ont été identifiées (Richter *et al.*, 2004). Neuf nouvelles mutations ont été identifiées chez des familles d'origine tunisienne, italienne et japonaise (El Euch-Fayache *et al.*, 2003; Grieco *et al.*, 2004; Criscuolo *et al.*, 2004; Ogawa *et al.*, 2004). Le tableau I.1 résume toutes les mutations de *SACS* identifiées à ce jour chez les individus atteints de l'ARSACS.

Changement de nucléotides*	Type de mutation	Exon muté	Conséquence	Origine	Référence
6594del	délétion	10	Codon stop	Québec	Engert <i>et al.</i> , 2000
5254C→T	non-sens	10	Codon stop	Québec	Engert <i>et al.</i> , 2000
9580-9581del	délétion	10	Codon stop	Turquie	Richter <i>et al.</i> , 2004
8049del	délétion	10	Codon stop	Turquie	Richter <i>et al.</i> , 2004
1942T→C	faux-sens	10	Cys → Arg	Turquie	Richter <i>et al.</i> , 2004
11396A→G	faux-sens	10	Asn → Asp	Turquie	Richter <i>et al.</i> , 2004
10046G→C	faux-sens	10	Ala→Pro	Tunisie	El Euch-Fayache <i>et al.</i> , 2003
1411del	délétion	10	Codon stop	Tunisie	El Euch-Fayache <i>et al.</i> , 2003
1155insA	insertion	10	Codon stop	Tunisie	El Euch-Fayache <i>et al.</i> , 2003
3662T→C	faux-sens	10	Trp→ Arg	Tunisie	El Euch-Fayache <i>et al.</i> , 2003
4999-5003del	délétion	10	Codon stop	Italie	Grieco <i>et al.</i> , 2004
1858C→T	non-sens	10	Codon stop	Italie	Grieco <i>et al.</i> , 2004
4585insA	insertion	10	Codon stop	Italie	Grieco <i>et al.</i> , 2004
1859insC	insertion	10	Codon stop	Italie	Criscuolo <i>et al.</i> , 2004
7492C→T	faux-sens	10	Arg → Trp	Japon	Ogawa <i>et al.</i> , 2004

*Les positions des mutations correspondent à la séquence Genbank NM_014363.1 gi :7657533.

Tableau I.1 Mutations identifiées dans le gène SACS.

I.3.3 Expression de *SACS*

L'ARNm de *SACS* a été détecté par buvardage Northern au niveau de divers tissus humains, soit le cerveau, le muscle squelettique, et en faible quantité dans le pancréas. De plus, des ESTs correspondant à *SACS* ont été identifiés dans plusieurs banques d'ADNc, incluant le cerveau, l'utérus, le rein et le foie. Ceci indique donc que *SACS* est exprimé au niveau de plusieurs tissus. L'ARNm de *SACS* a aussi été détecté dans les fibroblastes d'individus normaux et de patients atteints de l'ARSACS. Le patron d'expression de *SACS* a été examiné en effectuant des hybridations *in situ* sur des cerveaux humains, de singes et de rats. Des signaux intenses ont été détectés dans toutes les régions du système nerveux central (Engert *et al.*, 2000).

I.4 SACSINE

Sacsine, le produit du gène *SACS*, est une protéine de grande taille dont le rôle physiologique demeure inconnu. Le poids moléculaire de la protéine complète putative est d'environ 521 kDa, et son pI, 6.85 (Mercier *et al.*, en préparation). Quelques évidences supportent l'existence de différents isoformes de la protéine. Toutefois, ceci reste à être confirmé. La protéine complète contient 4 régions partageant une séquence similaire (Figure I.4). Les programmes de prédiction de structure suggèrent la présence de deux motifs leucine zipper, de trois structures « coiled-coil », et d'un domaine hydrophobe dans la partie C-terminale de la protéine (Figure I.5) (Engert *et al.*, 2000).

Les analyses de comparaison de séquences n'ont démontré aucune similarité extensive entre sacsine et une protéine connue. Cependant, la portion C-terminale de

```

Rep1 SDWIKIGDITSNCHLFVN-----LQSKGK-----GGGRFGQTTPEVDFLADTIIRRE
Rep2 AEWLKVPCVSTRLIN-----PENMGFE-----QSQREF-LTVRIKNIIEEM
Rep3 --WIKVKITVVKYCHADIPREVAVKLGAVPKRHVALERYASNVCFITLTFEGQKEK-LTSRIMSILNAM
Rep4 -----
Rep1 BEGGQILKEIIGNAEDAGETEVKFLYDETC--YGTETLWSKDMAFYQGPALYVYNNAVFTPELWHGIQEI
Rep2 PSVSDIFKELLQNAEDANATECSFLIMRNMDIRENLLPGMAACHGPALWSFNNSQFSDSDFVNTITRL
Rep3 FSEKEMKELLQNAEDAKATEICVFDPRC--HPVDRIFDKWPLOGPALCVYNNQPTTEDIVRGIQNL
Rep4 ----TLDEIMVKTRAKVLRSIYEFLSAEKH-----EFRFQIRVVFVMVEDG-----WKL
Rep1 ARSRKDDFLKVGRTFGIGFNSVYHITDVECTIFSG-DOIGMLDPHOTLFPNEIGQCW-----NLKDSRE
Rep2 GESLKRREVDKVGKFGIGFNSVYHITDIIIMSR-EFMIIFDENINHSKIKDKSNPGIKINWSKQQR
Rep3 ERGTKEENFYNTGQYIGFNSVYHITDCSFLSNGDILCIFDPHARYAPGATISIPG-----RMFRDL-
Rep4 LKPEE-----VVINLEIESDFKPYLYKLPLELGTWHQLFKHLE-----TED
Rep1 ISELSDQFAPEVGI FGSTKETFING--NFPSTFFRFPLR-----LQPSQLSSNLYNKQKMLELESFRADA
Rep2 LRKFPNQKPEIIVFGCOLPLTVEAPYSYNGILFRLSFTQQEARVSEVSTCYNTADIYSVDFSLCG
Rep3 -ADRTQFSDVLDLYLGFHFLDN-----CIMFRFPLRNAEMKVSEISVFPASDRMQLLKLKLSDG
Rep4 IISTKQYVEVLSRIEKNSEGNQLDP-----NEMRTVRRVMSGLESLQNDIS
Rep1 DTVILLFKSQVIVSLYVREADGT-----EKLVRVTSSESKALKHEFPNSIMILGTASNYCHTTP---
Rep2 HRLIIFTQSVKSMYLKYLKTEEINPSLAQDTVLIKKKSCSKALNTPVLSVLEAKLMKTCSSSNKKLP
Rep3 AELIMFINHMEKIS--ICEIUKS-----TGALNVLYSVGKITDGDRIKRRQFHASVIDSVTKRQ---
Rep4 VKRSDLENMRLALYLPSQGR-----LVKSSIVFDAPHYISR-----
Rep1 -----SNNITCVTYHVIV-----LFEESTDAQKISWLV
Rep2 SDEPKSSCILQITVEEFHVFRRIADLQSPFRGPDPAALFEMAKSGQSKKPSDELQNTVECTTWLL
Rep3 -----LKDIFVQCITYTMD-----TEDS---EGNLFTWLI
Rep4 -----
Rep1 CNSVGGRGISSKLDLADLAFVPIIGIAMPISRDDEAKGATSDFSG--KAFCLPLPPGEESSTGLPV
Rep2 ITCMDTGEALFSLSEGRRLGLVPCVAVGVQLSEIQDQWTVKPHIS--EVFCYLPFR---IKTGLPV
Rep3 CNRSGFSSMEVSKSVISAHKQDIT-----LFPNGGVAACIITHNYKKPHRAFCLPLS---LETGLF
Rep4 -----
Rep1 HISSFFGLDNRHSIKWRELQWRIPAALWNEFVMNVPKAYATILDSIKLEMEKSSDFPLSDVVIY
Rep2 HINGCFAVTSNKEIKK-----TITKGRWNTFMRHVIVKAYLQVLSVIRDLATSGELMDY-----TYI
Rep3 HVNGHFALDSARFNLR--DONGVGVRSWNSLMTALLAPAVVELLIQKKE-----
Rep4 -----
Rep1 KLWEASKVKVHWQPVLEPLFSELLQ-----AVIYSISCDWRLEQVYFSELDN-----LEYTKVL
Rep2 AVWEDPDLVHDDFVICQGFYEDIAHGKKGELTKVFSIDGSTVSMKNRFLDDSIKRRDVGSAAFIFL
Rep3 -----
Rep4 -----
Rep1 NYLQSSKQ
Rep2 KYLKKTKSK
Rep3 -----
Rep4 -----

```

Figure I.4 Alignement de séquence des 4 segments répétés de saccine. Les acides aminés identiques sont colorés en rose et les acides aminés similaires sont indiqués en gris.

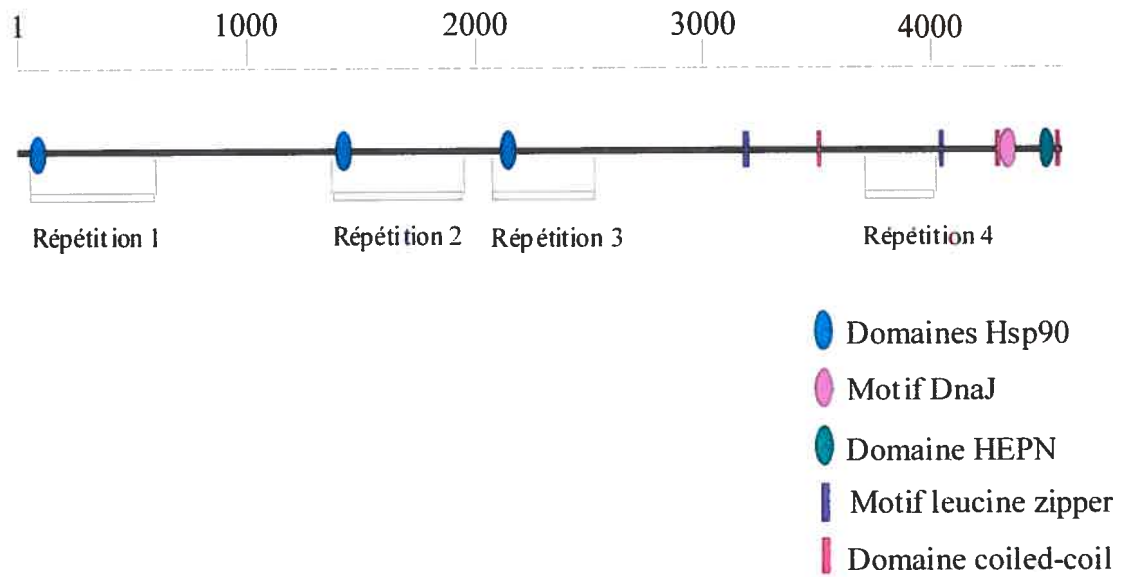


Figure I.5 Domaines et motifs présents dans la séquence de saccine.

sacsine contient un motif « DnaJ », ainsi qu'un domaine HEPN («higher eukaryotes and prokaryotes nucleotide binding»). La protéine contient aussi 3 régions similaires à la portion N-terminale de la chaperone HSP90. Ces régions sont localisées dans les 3 premiers segments répétés de sacsine (Figure I.5).

I.4.1 Domaine HEPN

Le domaine HEPN de sacsine, identifié par analyses comparatives, consiste en une région d'environ 110 acides aminés présente dans la portion C-terminale de sacsine. Ce domaine est également retrouvé dans plusieurs protéines bactériennes et archaebactériennes (Grynberg *et al.*, 2003). La fonction biologique précise du domaine HEPN n'est pas claire, mais certaines évidences suggèrent qu'il serait impliqué dans la liaison de nucléotides (Erlandsen *et al.*, 2004; Grynberg *et al.*, 2003). Les protéines possédant un domaine HEPN ont été regroupées en 3 différentes classes : (I) les protéines possédant uniquement un domaine HEPN, (II) les protéines ayant un domaine nucléotidyltransférase en plus du domaine HEPN, et (III) les protéine à domaines multiples. Sacsine semble être l'unique représentant de la classe III, se distinguant des autres membres de la famille HEPN du fait qu'elle possède plusieurs autres domaines en plus du domaine HEPN, et parce qu'elle est la seule protéine HEPN identifiée chez les eucaryotes (Grynberg *et al.*, 2003).

Les protéines de la première classe sont constituées uniquement du domaine HEPN. Les gènes codant pour ces protéines ont été identifiés chez plusieurs bactéries, et à l'exception de deux cas connus, sont toujours suivis par un gène codant pour une nucléotidyltransférase (NT). Dans tous les cas, ces deux gènes se retrouvent dans

différents cadres de lecture alors que les deux ORF se chevauchent. La structure cristalline de TM0613, une protéine de la classe I retrouvée chez *Thermotoga maritima*, a été élucidée récemment (Erlandsen *et al.*, 2004). Les analyses de similarité structurale ont dévoilé que la structure de cette protéine est semblable au domaine C-terminal de la kanamycine nucléotidyltransférase (KNTase), une enzyme bactérienne capable de conférer la résistance à certains aminoglycosides. KNTase désactive plusieurs aminoglycosides en leur transférant un groupe nucléotidyl à partir d'une molécule d'ATP, de GTP ou d'UTP (Pedersen *et al.*, 1995). KNTase est composée de deux domaines distincts : le domaine N-terminal et le domaine C-terminal. La structure de TM0613 ne partage aucune similarité avec le domaine N-terminal de KNTase. Toutefois, ce domaine est homologue à TM0614, la nucléotidyltransférase encodée par l'ORF chevauchant le gène de TM0613. Il a donc été suggéré que ces deux gènes auraient coévolué et que leurs produits pourraient interagir pour former un complexe hétéro-oligomérique dont le rôle serait de catalyser le transfert d'un groupe nucléotidyl vers un substrat inconnu. Cette hypothèse est appuyée par des études effectuées sur HI0073 et HI0074, deux protéines retrouvées chez *Haemophilus influenzae* partageant également des similarités structurales avec les domaines N-terminal et C-terminal de KNTase, respectivement. Il a été démontré expérimentalement que ces deux protéines interagissent pour former un complexe stable (Lehmann *et al.*, 2003).

Les protéines de la deuxième classe de la famille HEPN possèdent un domaine HEPN dans la portion C-terminale, ainsi qu'un domaine NT dans la portion N-terminale. Le domaine NT est retrouvé dans la séquence de plusieurs membres de la famille des nucléotidyltransférases, incluant KNTase.

I.4.2 Domaines HSP90 et DnaJ

Les protéines de choc thermique, abrégées Hsp pour «heat shock protein», sont un groupe de protéines dont l'expression augmente suite à un choc thermique ou en réponse à divers autres stress cellulaires (Tissieres *et al.*, 1974, Lindquist & Craig, 1998). En effet, il a été démontré que l'expression des Hsp peut être induite par plusieurs agents de stress tels l'alcool, les rayons ultraviolets, les métaux lourds, les oxydants, les antibiotiques, les acides gras, etc. (Roychowdhury & Kapoor, 1988; Levinson *et al.*, 1980; Jacquier-Sarlin *et al.*, 1995; Koizumi *et al.*, 1993). De façon générale, une augmentation de l'expression des Hsp contribue à la survie cellulaire lorsque les conditions environnementales ne sont pas idéales. L'implication des Hsp dans la réponse aux stress cellulaires est liée à leur rôle de chaperones moléculaires. Les chaperones moléculaires sont des protéines qui ont la capacité de reconnaître et lier la surface hydrophobe de protéines afin de prévenir des interactions non désirables qui mèneraient potentiellement à une mauvaise conformation protéique. Les chaperones sont donc responsables d'assister au bon repliement des protéines, un processus essentiel en temps normal, ainsi qu'en condition de stress (Lindquist & Craig, 1998; Morimoto *et al.*, 1994).

Les protéines de la famille Hsp90 sont un groupe de protéines dont le poids moléculaire apparent est environ 90 kDa. Il existe deux formes cytoplasmiques de Hsp90, soit Hsp90 α et Hsp90 β . Les autres membres de la famille Hsp90 incluent Grp94, une protéine localisée au niveau du réticulum endoplasmique, et la protéine mitochondriale Hsp75/TRAP1. Chez les eucaryotes, les protéines de la famille Hsp90 ont été associées au repliement de protéines impliquées dans diverses voies de signalisation, la régulation du cycle cellulaire, et dans la régulation hormonale

(Borkovich *et al.*, 1989; Freeman & Morimoto, 1996)). Ces protéines possèdent toutes une organisation structurale semblable, soit des domaines N-terminal et C-terminal conservés, séparés par une région chargée de longueur variable (Buchner *et al.*, 1999). Les régions Hsp90 de saccine sont similaires au domaine N-terminal. Il a été démontré par cristallographie que ce domaine contient un site de fixation de l'ATP (Prodromou *et al.*, 1997). De plus la structure 3D de ce domaine possède une topologie semblable à celle du domaine de fixation de l'ATP situé en N-terminal de l'ADN gyrase, une topoisomérase bactérienne (Dunbrack *et al.*, 1997).

La protéine DnaJ est l'orthologue bactérien de Hsp40. Cette dernière agit comme co-chaperone pour stimuler l'activité ATPase de Hsp70, une autre chaperone impliquée dans le repliement protéique de diverses protéines. La liaison et le largage des substrats de Hsp70 sont fortement liés à son activité ATPase. Son activité ATPase intrinsèque étant très faible, des co-chaperones tel les Hsp40 sont nécessaires pour stimuler l'hydrolyse de l'ATP. DnaJ contient 4 domaines distincts : un domaine J situé à l'extrémité N-terminale, un domaine riche en résidus glycines et phénylalanines, un domaine doigt de zinc et un domaine en C-terminal potentiellement responsable de la liaison de substrats. Les diverses protéines de la famille Hsp40/DnaJ sont constituées de un ou plusieurs de ces 4 domaines. En effet, certains membres d'une sous-classe de la famille Hsp40 sont constitués uniquement du domaine J. Le motif DnaJ retrouvée dans la portion C-terminale de saccine correspond au domaine J. Plusieurs évidences suggèrent que ce domaine est responsable de la liaison à Hsp70 (Tsai & Douglas, 1996; Suh *et al.*, 1998; Greene *et al.*, 1998; Genevaux *et al.*, 2002; Landry, 2003).

I.4.3 Distribution taxonomique de saccine

Un orthologue de saccine a été identifié chez plusieurs mammifères, ainsi que chez d'autres vertébrés tels *Danio rerio* (poisson zèbre) et *Fugu rubripes* (poisson fugu). Saccine est bien conservée, avec 94% d'identité entre les homologues humains et murins. Des homologues de saccine ont également été trouvés chez *Arabidopsis thaliana* et *Oryza sativa* (plante de riz). L'orthologue de *A. thaliana* possède 16% d'identité et 36% de similarité avec saccine. Le rôle cellulaire de cette protéine chez les plantes est inconnu. Toutefois, elle a été classifiée parmi la famille de protéines contenant un doigt de zinc de type C3HC4 («ring finger»). Ce domaine doigt de zinc n'est pas présent dans la séquence de saccine puisque la région C-terminale n'est pas bien conservée entre saccine et ses homologues végétaux. De plus, ces derniers ne contiennent pas les domaines DnaJ et HEPN. Ils contiennent cependant deux des trois domaines HSP90.

I.5 OBJECTIFS DU PROJET DE RECHERCHE

L'implication de saccine dans l'ARSACS suscite beaucoup d'intérêt au sujet de son rôle physiologique. L'identification du rôle cellulaire de cette protéine mènerait à une meilleure compréhension des symptômes de l'ARSACS, ainsi qu'à d'autres maladies neurodégénératives. La caractérisation fonctionnelle de saccine a donc fait l'objet de cette recherche. Les buts spécifiques de ce projet consistaient en (1) l'analyse de l'expression de saccine, (2) la détermination de sa localisation subcellulaire, (3) l'identification de ses partenaires d'interaction, et finalement, (4) l'analyse de son expression suite à un choc thermique.

Afin d'atteindre les objectifs de ce projet de recherche, la caractérisation de deux anticorps dirigés contre saccine a été effectuée. Nous avons démontré que ces anticorps

sont capables de reconnaître sarsine par buvardage Western. Ils ont ensuite permis l'analyse de l'expression de sarsine par buvardage Western dans des fibroblastes de patients et d'individus normaux, ainsi que dans divers tissus de souris. Ces anticorps ont ensuite servis à l'analyse de la localisation subcellulaire de sarsine par immunocytochimie. Avec le même objectif, des expériences de fractionnement subcellulaire à partir de cerveaux de souris ont également été effectuées.

Afin d'identifier le rôle cellulaire de sarsine, il est nécessaire d'identifier les protéines avec lesquelles elle s'associe physiologiquement. Pour ce faire, un système de double hybride chez la levure a été mis en place afin d'identifier les partenaires d'interaction potentiels de sarsine.

Étant donné la présence des domaines DnaJ et Hsp90 dans la séquence de sarsine, l'hypothèse voulant que sarsine soit une chaperone moléculaire a été émise. Étant donné que l'expression et la localisation subcellulaire de plusieurs chaperones sont influencées par des stress cellulaires, l'effet d'un stress thermique sur l'expression de sarsine a été analysé. Pour ce faire, des fibroblastes ont été soumis à un choc thermique et l'expression ainsi que la localisation subcellulaire de sarsine ont été analysées par buvardage Western et par immunocytochimie.

CHAPITRE II : MATÉRIEL ET MÉTHODES

II.1 PURIFICATION DES ANTICORPS

Des anticorps polyclonaux ont été produits contre deux peptides correspondant aux régions N-terminale et C-terminale de saccine. Afin de purifier les antisérums résultants, les protéines des corps d'inclusion dans lesquels étaient exprimés les deux peptides ont été séparées sur un gel SDS-polyacrylamide et transférées sur une membrane de nitrocellulose tel que décrit dans la section II.4.2.1. La membrane a été colorée au Ponceau S et la bande correspondante au peptide d'intérêt a été découpée et lavée avec du PBS (Dulbecco's phosphate buffered saline, Sigma) pendant 1 heure. La membrane a été incubée en présence de 100 mM de glycine/HCl pH 2,5 pendant 5 minutes afin d'éliminer les protéines faiblement liées. La membrane a ensuite été lavée 2 x 2 minutes dans le TBS (20 mM Tris-HCl pH 7,4; 500 mM NaCl; 0,05% Tween-20). Les sites non spécifiques de la membrane ont été bloqués en incubant la membrane avec agitation pendant 1 heure dans une solution de TBS contenant 3% BSA (albumine de sérum bovin). La membrane a été incubée en présence de l'antisérum pendant 3 heures. La membrane a été lavée 2 x 5 minutes afin d'éliminer les anticorps non spécifiques faiblement liés. Les anticorps liés à la membrane ont été élués en ajoutant 100 mM glycine/HCl pH 2.5 pendant 5 minutes. Le pH de la solution d'anticorps a été neutralisé en ajoutant du Tris-HCl pH 8,0. L'éluât a été centrifugé dans un tube Amicon Ultra-15 (Millipore) afin de concentrer les anticorps.

II.2 CULTURE CELLULAIRE

II.2.1 Mise en culture des lignées cellulaires

Des lignées primaires de cellules fibroblastiques cutanées ont été établies à partir de petits fragments de peau (quelques mm²) prélevés de patients ARSACS et d'individus normaux. Dans une hotte stérile à flux laminaire, les échantillons de peau ont été coupés en morceaux d'environ 1 mm² et répartis sur le fond de flacons de culture de 25 cm². Les flacons ont été placés à environ 10 cm d'une flamme pour permettre aux fragments de peau de sécher et de coller au fond des flacons. Cinq ml de milieu MEM (Minimum Essential Medium, GIBCO BRL) supplémenté avec 20% de sérum de veau foetal (GIBCO BRL), 40 µg/ml de gentamicine et 100 µg/ml de kanamycine, ont été ajoutés délicatement aux flacons afin d'éviter le décollage des morceaux de peau. Les flacons ont été incubés à 37°C dans une atmosphère humidifiée contenant 5% de CO₂ pendant 7 jours. Suite à cette période d'incubation, le milieu de culture a été renouvelé à tous les 2 à 3 jours jusqu'à ce que les fibroblastes deviennent confluents. Les cellules ont ensuite été amplifiées au besoin en les remettant en suspension par traitement enzymatique avec de la trypsine 0,25% pour les répartir sur la surface de culture appropriée.

II.2.2 Entretien des cultures

Les cellules ont été cultivées en milieu MEM supplémenté avec 10% de sérum de veau foetal à 37°C dans une atmosphère humidifiée contenant 5% de CO₂. Le milieu a été changé tous les 2 à 3 jours. Le passage des cellules a été effectué par traitement enzymatique avec de la trypsine 0,25%.

II.3 ÉTUDE DE L'EXPRESSION DE SACSINE

II.3.1 Extraction des protéines totales

Des extractions de protéines totales ont été effectuées à partir de fibroblastes humains et de divers tissus de souris (cerveau, coeur, muscle squelettique, foie, rein et pancréas). Les fibroblastes ont été lysés dans 10 volumes de tampon de lyse Laemmli (60 mM Tris-HCl pH 6,8 ; 10% glycérol ; 100 mM DTT) supplémenté avec des inhibiteurs de protéases (Complete mini, EDTA –free protease inhibitor cocktail tablets, Roche). Les tissus de souris ont été homogénéisés dans 10 volumes du même tampon à l'aide d'un broyeur de type Potter avec un piston en téflon. Les homogénats résultants ont été placés dans l'eau bouillante pendant 5 minutes et centrifugés à 10 000 x g pendant 10 minutes afin d'éliminer les débris cellulaires. Les surnageants ont été recueillis et conservés à -80°C. Le dosage des extraits protéiques a été effectué en utilisant le kit Bio-Rad protein assay (Bio-Rad).

II.3.2 Buvardage Western

II.3.2.1 SDS-PAGE et transfert

Les fractions de protéines totales ont été portées à ébullition pendant 5 minutes, 80 µg de chaque échantillon ont été ensuite déposés sur un minigel de polyacrylamide-SDS de 1,5 mm (Mini-Protean II, Bio-Rad). Un marqueur de masse moléculaire (Kaleidoscope prestained Standards, Bio-Rad) a aussi été déposé avec les échantillons. Les gels de concentration et de séparation contenaient 3% et 4% d'acrylamide (rapport bis-acrylamide : acrylamide), respectivement. L'électrophorèse a été réalisée dans un tampon Tris-glycine (25 mM Tris-HCl; 14,4 g/L Glycine et 0,1% SDS; pH 8,3) à un

voltage constant de 200 V pendant 1 heure à 4°C. Après migration, les protéines ont été transférées électriquement sur une membrane de difluorate de polyvinyle (PDVF) ou de nitrocellulose pendant 1 heure à un voltage de 100 V. Le transfert a été effectué dans un tampon de transfert Tris-glycine (25 mM Tris, 192 mM glycine, 10% méthanol) à 4°C.

II.3.2.2 Immunodétection indirecte

Les membranes ont été incubées pendant 1 heure dans une solution de PBS contenant 2,5% de lait en poudre et 0,1% Tween-20 afin de bloquer les sites non spécifiques. Les membranes ont ensuite été incubées avec les anticorps primaires dilués dans la solution de lait en poudre pendant 1 heure. Le tableau I indique les dilutions qui ont été utilisées pour chaque anticorps. Après 3 lavages de 30 minutes, les membranes ont été incubées en présence de l'anticorps secondaire approprié (anti-lapin ou anti-souris) conjugué à la peroxydase dilué 1:100 000 dans la solution de lait en poudre. Après 3 lavages de 10 minutes, les complexes anticorps-antigènes ont été détectés avec un substrat colorimétrique (Pierce SuperSignal® Chemiluminescent Substrates for Western Blotting). Toutes les incubations ont été réalisées à température ambiante.

Anticorps	Compagnie	Type	Concentration/Dilution
SacI	_____	Polyclonal	1:100
SacII	_____	Polyclonal	1:100
Anti-actine	Sigma	Monoclonal	1:500
Anti-dytrophine	Sigma	Monoclonal	1:10 000
Anti-nucleoporine	BD Biosciences	Monoclonal	1:1000
Anti-HSP60	Stressgen	Monoclonal	1:1000
Anti-HSP70	Stressgen	Monoclonal	1 µg/ml
Anti-KDEL	Stressgen	Monoclonal	4 µg/ml

Tableau I. Anticorps utilisés pour les buvardages Western.

II.4 LOCALISATION SUBCELLULAIRE DE SACSINE

II.4.1 Immunocytochimie

Les fibroblastes ont été traités avec de la trypsine 0,25% (GIBCO BRL) et transférés dans une plaque de culture de 24 puits, au fond desquels ont été placées des lamelles rondes de 14 mm. Après 24 heures, les cellules ont été rincées avec du PBS et fixées dans un mélange acétone / méthanol (1 : 1) pendant 7 minutes. Les cellules ont été lavées dans le PBS 3 x 5 minutes. Elles ont ensuite été incubées pendant 30 minutes en présence d'une solution PBS contenant 10% de sérum de chèvre (Sigma) afin de bloquer les sites de liaison non spécifiques, puis incubées durant la nuit à 4°C en présence des anticorps primaires dans du PBS contenant 1% de sérum de chèvre. Le tableau II indique les dilutions de chaque anticorps. Après 3 rinçages de 10 minutes au PBS/0.2% Triton-100x, les cellules ont été incubées en présence de 1 µg/ml d'anticorps anti-lapin ou anti-souris couplés aux fluorochromes Oregon 514 ou Alexa Fluor 546 (Molecular Probes), respectivement. Les anticorps secondaires étaient dilués dans le PBS contenant 1% de sérum de chèvre. Après 3 rinçages de 10 minutes, les cellules ont été incubées en présence de 0,3 mM 4,6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma). Après un dernier rinçage au PBS, les lamelles ont été montées sur lame avec le milieu de montage VECTASHIELD® Mounting Medium (Vectorlabs). Les cellules ont été observées sous un microscope à fluorescence (Nikon).

Anticorps	Compagnie	Type	Concentration/Dilution
SacI	_____	Polyclonal	1 : 100
SacII	_____	Polyclonal	1 : 250
Anti-actine	Sigma	Monoclonal	1 : 200
Anti-HSP60	Stressgen	Monoclonal	5 µg/ml
Anti-HSP70	Stressgen	Monoclonal	5 µg/ml
Anti-KDEL	Stressgen	Monoclonal	5 µg/ml
Anti-KDEL Receptor	Stressgen	Monoclonal	1 : 1000

Tableau II. Anticorps utilisés pour l'immunocytochimie.

II.4.2 Fractionnement subcellulaire

Les cerveaux de 7 souris ont été rapidement prélevés et homogénéisés dans 30 ml de tampon A (5 mM HEPES (pH 7,4), 0,32 M saccharose, inhibiteurs de protéases (Complete mini, EDTA –free protease inhibitor cocktail tablets, Roche)) à l'aide d'un broyeur de type Potter avec un piston en téflon. L'homogénat a été filtré à travers quatre couches de nylon et centrifugé à 600 x g pendant 10 minutes. Le culot (P1) a été resuspendu dans 10 ml de tampon A et centrifugé à 600 x g pendant 10 minutes. Les surnageants des deux centrifugations ont été combinés et centrifugés à 10 000 x g pendant 30 minutes afin d'obtenir la fraction mitochondriale (P2). Le culot P2 a été resuspendu dans 10 ml de tampon A et centrifugé à 10 000 x g pendant 30 minutes. Les surnageants des deux centrifugations à 10 000 x g ont été combinés et centrifugés pendant 2 heures à 100 000 x g. Le culot résultant (P3) représentant la fraction microsomale, ainsi que les culots P1 et P2 ont été resuspendus dans 8 M d'urée. Le surnageant de l'ultracentrifugation représentant la fraction soluble a été concentré jusqu'à 500 µl dans des tubes Amicon Ultra-15 (Millipore). Un volume équivalent de tampon de migration Laemmli 2X a été ajouté à toutes les fractions. Les fractions P1, P2, P3 et S3 ont été quantifiées et analysées par buvardage Western (Section II.4).

II.5. TECHNIQUE DU DOUBLE HYBRIDE

II.5.1 Principes de la technique du double hybride

Le système de double hybride Proquest™ Two-hybrid system with Gateway Technology® (Invitrogen) a été utilisé pour la recherche de partenaires d'interaction de saccine. Ce système permet l'identification de partenaires d'interaction (X et Y). Les

protéines X et Y sont chacune fusionnées à un domaine du facteur de transcription *GAL4*, le domaine de liaison à l'ADN (DL) et le domaine d'activation (DA). Les protéines de fusion X-DL et Y-DA sont nommées appât et proie, respectivement. Lorsqu'il y a interaction entre X et Y, un facteur de transcription *GAL4* fonctionnel est reconstitué. Ceci permet l'expression de gènes rapporteurs contenant les sites de liaison de *GAL4* dans leur promoteur. Les gènes rapporteurs utilisés dans ce système sont *HIS3*, *URA3* et *LacZ*. Des partenaires d'interaction peuvent donc être identifiées par la croissance d'un clone en absence d'histidine et d'uracil, ainsi que par la coloration bleue d'un clone en présence de X-Gal.

II.5.2 Souches de levures

La souche de levure utilisée pour le criblage par la technique du double hybride était MaV203 (Invitrogen). Le génotype de cette souche est le suivant; *MAT α* , *leu2-3*, *112*, *trp1-901*, *his Δ 3200*, *ade2-101*, *gal4 Δ* , *gal80 Δ* , *SPAL10::URA3*, *GAL11::LacZ*, *His3_{UAS GAL1}::His3@Lys2*, *can1^R*, *cyh2^R*. Des souches contrôles sont aussi utilisées afin d'aider à déterminer les clones candidats contenant des interacteurs probables. Les souches contrôles ont le même génotype que MaV203, à l'exception d'être *MAT α* au lieu de *MAT₋*.

II.5.3 Entretien des cultures de levures

La souche MaV203 a été cultivée sur des boîtes de pétri YPAD (extrait de levure-peptone-dextrose-adénine) à 30°C. Les souches contrôles ont été cultivées sur des boîtes

de pétri contenant un milieu synthétique complet dépourvu de leucine et tryptophane (SC-Leu-Trp) à 30°C.

II.5.4 Construction des appâts

II.5.4.1 Production des produits PCR-*attB*

Les appâts ont été construits en utilisant le système de clonage par recombinaison Gateway (Invitrogen). Les 4 régions de *SACS* codant pour les régions de saccine utilisées comme appâts ont été amplifiées par PCR en utilisant des amorces sens contenant la séquence spécifique de recombinaison *attB1* et des amorces antisens contenant la séquence de recombinaison *attB2*. La séquence et la position de chaque amorce utilisée sont démontrées dans le tableau III. Les réactions PCR ont été réalisées à l'aide de la polymérase Herculase (Stratagene) en utilisant comme gabarit le BAC 206_L_1 qui contient la séquence complète de saccine. Les produits PCR ont été déposés sur un gel d'agarose 1% et les bandes correspondantes aux produits d'intérêt ont été découpées. Les produits PCR ont été purifiés en utilisant un kit d'extraction de gel (Qiagen) et quantifié sur gel d'agarose 1% à l'aide du marqueur High DNA Mass™ Ladder (Invitrogen).

Amorce	position	Direction	Séquence
N-terminaleF		Sens	⁵ GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTGATGAATACATTTGGCCTGGC ³
N-terminaleR		Antisens	³ GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCATTCACTCACTTTTGCCTCTG ⁵
Segment 2F		Sens	⁵ GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTGAAGAAGACTGGGTCCAAAAAC ³
Segment 2R		Antisens	³ GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCAAGAACCAGGGAAATACCGTTT ⁵
C-terminal1F		Sens	⁵ GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTGATGAATACATTTGGCCTGGC ³
C-terminal1R		Antisens	³ GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCACACTTTTGTGCATAAA ⁵
C-terminal2F		Sens	⁵ GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTGATGAATACATTTGGCCTGGC ³
C-terminal2R		Antisens	³ GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTATGAATACATTTGGCCTGGC ⁵

Tableau III. Séquences et positions des amorces utilisées pour la construction des appâts. Les bases colorées en rose et vert sont les séquences *attB1* et *attB2*, respectivement. Les bases colorées en bleu sont les bases complémentaires aux séquences des régions à amplifier.

II.5.4.2 Clonage des produits PCR-*attB*

Les produits PCR purifiés ont été clonés dans le vecteur navette pDONR201 (Invitrogen) à l'aide du mélange d'enzymes « BP Clonase enzyme mix » et du tampon de réaction BP 5X (Invitrogen), permettant ainsi la recombinaison entre les sites *attB* des produits PCR et les sites *attP* du vecteur pDONR201. Cette réaction permet de générer le « clone d'entrée » dans lequel l'insert est flanqué entre les sites *attL1* et *attL2*. L'incubation a été faite à température ambiante pendant 18 heures. La protéinase K (Invitrogen) a été ajoutée au mélange et la réaction a incubé à 37°C pendant 10 minutes. Les plasmides résultants ont été utilisés pour transformer par choc thermique des cellules *E. coli* compétentes (Library Efficiency DH5_ competent cells, Invitrogen). Les colonies résistantes à la kanamycine ont été isolées et cultivées afin d'effectuer une isolation plasmidique à l'aide d'un kit de miniprep (Qiagen).

II.5.4.3 Sous-clonage du vecteur d'entrée dans un vecteur d'expression

Une réaction de recombinaison LR entre les sites *attL* du « vecteur d'entrée » et les sites *attR* du vecteur d'expression pdest32 (Invitrogen) a été effectuée pour tous les appâts. Le vecteur pdEST32 contient le gène codant pour le domaine de liaison à l'ADN du facteur de transcription *GAL4*, ainsi que le gène *LEU2* permettant la sélection des colonies de levure contenant ce plasmide dans un milieu SC-Leu. La réaction de recombinaison a été effectuée en incubant le vecteur d'expression pdEST32 en présence du « vecteur d'entrée », du mélange d'enzymes « LR enzyme Mix » et du tampon de réaction LR 5X (Invitrogen) pendant ~18 heures à température ambiante. La protéinase K (Invitrogen) a ensuite été ajoutée au mélange et le tout incubé à 37°C pendant 10

minutes. Un μl de chaque réaction a été utilisé pour transformer par choc thermique des cellules *E. coli* compétentes. Le mélange de transformation a été étalé sur une boîte de pétri contenant de la gentamicine afin de sélectionner les colonies contenant le vecteur d'expression. La présence de l'insert dans chaque colonie a été vérifiée par PCR. Les colonies appropriées ont été cultivées afin d'effectuer une préparation plasmidique à l'aide d'un kit de miniprep (Qiagen).

II.5.4.4 Séquençage

L'insert de chaque clone a été séquençé afin de vérifier qu'aucune mutation ne se soit introduite durant l'étape d'amplification et pour s'assurer que l'insert soit dans le même cadre de lecture que le gène codant pour le domaine de liaison à l'ADN de *GAL4*. Le séquençage a été effectué à l'aide d'un séquenceur automatique ABI.

II.5.5 Transformation de l'appât dans les levures

Pour chaque transformation, 25 μl de levure MaV203 ont été suspendus dans 1 ml d'eau et centrifugés à 13 000 x g pendant 5 secondes. Le culot a été suspendu dans 1 ml de LiAc 100 mM et incubé à 30°C pendant 5 minutes. La suspension a été centrifugée à 13 000 x g pendant 5 secondes et le surnageant a été décanté. Les constituants suivants ont été ajoutés au culot de cellules; 240 μl de PEG 50%, 36 μl de LiAc 1,0 M, 50 μl d'ADN de sperme de saumon à une concentration de 10 mg/ml (Invitrogen), 5 μl du plasmide approprié et 60 μl d'eau. Le mélange a été incubé pendant 20 minutes à 42°C. La suspension a été centrifugée et le culot a été suspendu dans 300 μl d'eau et étalé sur

une boîte de pétri contenant le milieu sélectif SC –Leu. Le pétri a été incubé à 30°C pendant environ 48 heures jusqu'à l'apparition de colonies transformées.

II.5.6 Vérification de l'absence d'auto-activation par les appâts

Avant d'effectuer le criblage par double hybride, il est important de s'assurer que l'appât seul n'active pas les gènes rapporteurs *HIS3*, *URA3* et *LacZ*. Il est aussi nécessaire de vérifier l'expression basale du gène *HIS3*. Les clones X-DL ont donc été étalés sur des boîtes de pétri SC-Leu-Trp-His + 3-Amino-1,2,4-Tiazole (3AT) afin de déterminer la concentration de 3AT nécessaire pour inhiber la croissance des colonies.

II.5.7 Préparation de la banque d'ADNc

La banque d'ADNc utilisée pour le criblage provenait du cerveau adulte humain (Proquest™ Libraries, Invitrogen). Les ADNc de cette banque sont insérés dans le vecteur pEXP-AD502. Ce vecteur contient le gène codant pour le domaine d'activation de *GAL4*, ainsi que le gène *TRP1* permettant la sélection des clones contenant ce plasmide sur un milieu SC-Trp. $2,5 \times 10^9$ cellules de la banque ont été cultivées dans 500 ml de milieu « Terrific Broth » (12 g tryptone, 24 g d'extraits de levure, 4 ml de glycérol, 9,4 g de K_2HPO_4 et 2,2 g de KH_2PO_4 dans 1 L d'eau) pendant 16 heures avec agitation (275 rpm). Le mélange correspondant à ~ 500 unités de DO_{590} a été transvidé dans 2 tubes de 50 ml et centrifugé à $4\ 800 \times g$ pendant 15 minutes à 4°C. Les culots de cellules ont été resuspendus dans 10 ml du Tampon I (15 mM Tris-HCl, pH 8,0; 10 mM EDTA; 100 $\mu g/ml$ RNase A; 1200 U/ml RNase T1) et 10 ml du tampon II (0,2 M NaOH, 1%SDS). Suite à une incubation de 5 minutes à température ambiante, 10 ml d'acétate

d'ammonium 7.5 M ont été ajoutés. Les tubes ont été inversés quelques fois et incubés sur glace pendant 10 minutes, suivit d'une centrifugation de 15 minutes à 3 000 x g (4°C). Le surnageant a été filtré à travers quatre couches de nylon. Un volume équivalent d'isopropanol froid a été ajouté au filtrat, suivit d'une centrifugation à 3 000 x g pendant 15 minutes (4°C). Le culot de cellules a été resuspendu dans 1 ml du tampon I et centrifugé à 14 000 x g pendant 1 minute (4°C). Le surnageant a été incubé à 37°C pendant 10 minutes, suivit d'une incubation de 5 minutes à 65°C. Un volume équivalent de phénol:chloroforme:alcool isoamyl (25:24:1) a été ajouté à l'échantillon, mélangé à l'aide d'un vortex, et suivit d'une centrifugation à 14 000 x g pendant 5 minutes à température ambiante. La phase aqueuse a été isolée et ajoutée à un volume équivalent d'isopropanol (4°C). L'extraction au phénol:chloroforme:alcool isoamyl a été répétée 2 fois. Le surnageant a été décanté et le culot a été rincé avec de l'éthanol 70%. Une dernière centrifugation de 15 minutes à 14 000 x g a été effectuée et le culot a été séché à l'air pendant 10 minutes. Le culot a été dissout dans le TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) et l'échantillon a été conservé à -20°C.

II.5.8 Criblage de la banque d'ADNc

Pour chaque criblage, plusieurs colonies MaV203 contenant l'appât ont été isolées et suspendues dans 50 µl d'eau stérile. Le mélange a été étalé sur une boîte de pétri SC-Leu et incubé pendant ~18 heures à 30°C. Les cellules ont été récoltées et resuspendues dans 500 ml de milieu YPD ($DO_{600} \approx 0.1$). Le mélange a été incubé à 30°C avec agitation pendant environ 5 heures jusqu'à la phase exponentielle de la croissance des cellules ($DO_{600} \approx 0.4$). Le mélange a été centrifugé dans 2 tubes de 250 ml à 3000 x g

pendant 5 minutes et les culots de cellules résultants ont chacun été suspendus dans 100 ml d'eau. Après une autre centrifugation à 3000 x g pendant 5 minutes, les culots ont été suspendus dans 50 ml d'une solution TE/LiAc (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA, 0,1 M LiAc). Les mélanges ont été centrifugés à 3000 x g pendant 5 minutes. Les culots ont été rassemblés et suspendus dans la solution TE/LiAc pour donner un volume total de 2.5 ml. 125 µl d'ADN de sperme de saumon (10 mg/ml) (Invitrogen), 12.5 µg de la banque d'ADNc et 15 ml de PEG/LiAc ont été ajoutés au mélange de cellules. Le tout a été incubé pendant 30 minutes à 30°C, suivit d'un choc thermique à 42°C pendant 15 minutes. Le mélange a été centrifugé pendant quelques secondes et le culot de cellule a été suspendu dans de l'eau stérile. Le mélange a été étalé sur plusieurs boîtes de pétri SC-Leu-Trp + 3AT de 15 cm² pendant ~ 60 heures à 30°C.

II.5.9 Détection des interacteurs candidats

Les colonies capables de croître sur le milieu SC-Leu-Trp + 3AT ont été isolées et étalées sur des boîtes de pétri SC-Leu-Trp-Ura. De plus, un essai X-gal a été effectué sur les colonies candidates. Pour se faire, les colonies ont été étalées sur des boîtes de pétri YPAD et incubées à 30°C pendant 18 heures. Les colonies ont été transférées sur un filtre Whatman 541 (Fisher) en plaçant le filtre directement sur le pétri. Le filtre a été placé dans de l'azote liquide pendant 30 secondes afin de détruire la paroi des cellules. Les filtres ont été incubés en présence d'une solution X-gal (60 mM Na₂HPO₄, 40 mM NaH₂PO₄·H₂O, 10 mM KCl, 1 mM MgSO₄·7H₂O, 39 mM 2-mercaptoethanol, 1 mg/ml X-Gal) pendant 24 heures.

CHAPITRE III : RÉSULTATS

III. 1 DÉTECTION DE SACSINE

III.1.1 Caractérisation des anticorps anti-sacsine

Afin de débiter la caractérisation de sacsine, des anticorps polyclonaux anti-sacsine ont été produits. Les anticorps ont été produits en utilisant deux peptides nommés Sac1 et Sac2, correspondant aux acides aminés 883 à 1170 et 3943 à 4580 de l'homologue humain de sacsine, respectivement (Figure III.1). Ces peptides, correspondant aux deux extrémités de sacsine, ont été choisis dans le but de pouvoir distinguer entre la forme tronquée de sacsine et la protéine complète. Ces peptides ont chacun été injectés dans un lapin et les antisérums ont été recueillis après 81 jours. Les antisérums ont été purifiés par affinité afin d'isoler uniquement les anticorps spécifiques contre sacsine. La spécificité des anticorps contre sacsine a été évaluée par buvardage Western (Figure III.2). Pour ce faire, les protéines totales de cerveaux de souris ont été extraites, séparées sur gel et transférées sur une membrane PDVF ou de nitrocellulose. Un extrait protéique de cerveau a été utilisé parce qu'il a été trouvé auparavant que l'ARNm de sacsine est grandement exprimé dans ce tissu, tant chez l'humain que chez la souris (Engert *et al.*, 2000). Étant donné la grande taille de sacsine, aucun marqueur de poids moléculaire commercial atteignant cette taille n'était disponible. Afin de contourner ce problème, la protéine dystrophine (427 kDa), révélée à l'aide d'un anticorps anti-dystrophine, a été utilisée comme marqueur de poids moléculaire (Koenig *et al.*, 1988). Une bande de plus de 427 kDa a été révélée par l'anticorps Sac1 (Figure III.2A), ainsi que par l'anticorps Sac2 (Figure III.2B). Les bandes révélées par les deux anticorps migrent à la même hauteur sur le gel et correspondent approximativement au poids moléculaire prédit (521 kDa) pour sacsine. De plus, ces bandes ne sont pas

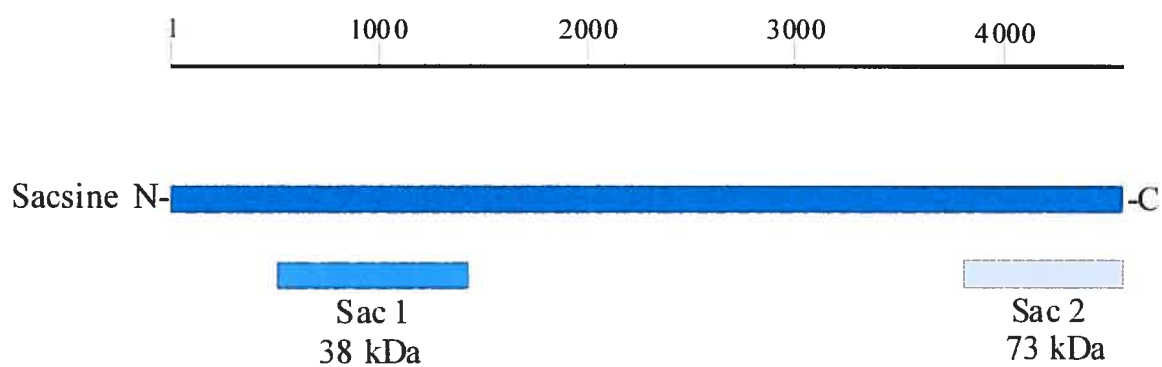


Figure III.1 **Anticorps contre saccine.** Le schéma démontre les positions des peptides Sac1 et Sac2, relativement à la protéine complète de 4580 aa.

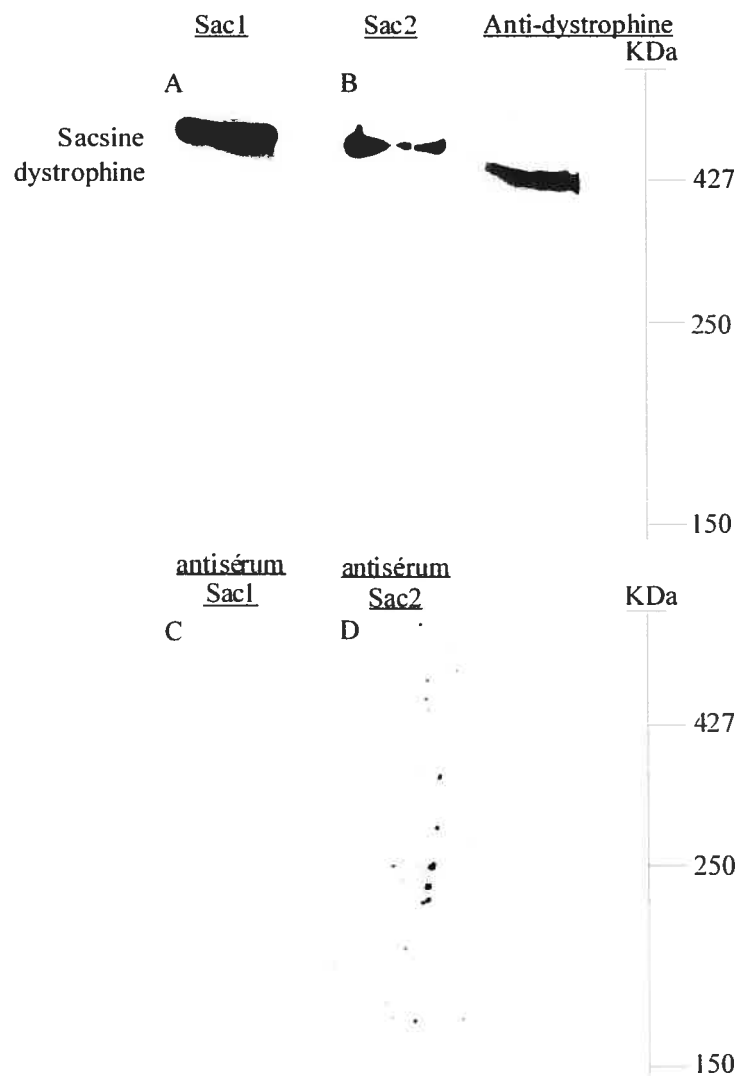


Figure III.2 Détection de saccine par buvardage Western. Des extraits protéiques de cerveau de souris ont été séparés sur gel SDS-polyacrylamide 4% et transférés sur une membrane PVDF ou de nitrocellulose. Les membranes ont été incubées en présence des anticorps Sac1 (A) et Sac2 (B), ainsi qu'un anticorps monoclonal anti-dystrophine servant comme marqueur de poids moléculaire. Deux bandes de taille équivalente de plus de 427 kDa ont été révélées par les anticorps Sac1 et Sac2. Aucune bande n'a été révélée par les sérums pré-immuns de Sac1 (C) et Sac2 (D).

révélées par les sérums pré-immuns (Figure III.2C et D). Ces résultats suggèrent fortement que les bandes révélées par les anticorps Sac1 et Sac2 correspondent à l'homologue murin de saccine. De plus, la détection de saccine au niveau d'un tissu de souris démontre que les anticorps Sac1 et Sac2 peuvent être utilisés pour révéler la protéine murine, malgré le fait qu'ils aient été générés contre des fragments de l'homologue humain de saccine. Ce résultat était attendu puisque saccine est bien conservée entre l'humain et la souris (identité de 94%) (Engert *et al.*, 2000).

III.1.2 Expression de saccine dans les fibroblastes humains

Des analyses par buvardage Western ont été effectuées afin d'étudier l'expression de saccine dans des fibroblastes de patients et d'individus normaux. Les lignées cellulaires utilisées provenaient de patients de génotypes différents, soit $\Delta T/\Delta T$, $\Delta T/C \rightarrow T$, $C \rightarrow T/C \rightarrow T$ et $\Delta T/\text{inconnu}$. Ceux-ci sont les 4 génotypes responsables de l'ARSACS identifiés au Québec (voir section I.3.2). De plus, 2 lignées cellulaires d'individus normaux ont été analysées. Les résultats de la Figure III.3A démontrent que l'anticorps Sac2 révèle une bande correspondante à saccine dans les extraits de protéines totales de fibroblastes normaux, alors qu'aucune bande de cette taille n'est révélée dans les extraits protéiques de fibroblastes de patients. Ces résultats étaient attendus puisque les deux mutations connues (ΔT et $C \rightarrow T$) sont responsables de l'apparition d'un codon stop prématuré dans la séquence de saccine, ce qui a théoriquement comme effet de générer une protéine tronquée. Étant donné que l'anticorps Sac2 est spécifique pour la portion tronquée de la protéine, aucune bande n'était attendue. Il est intéressant de noter

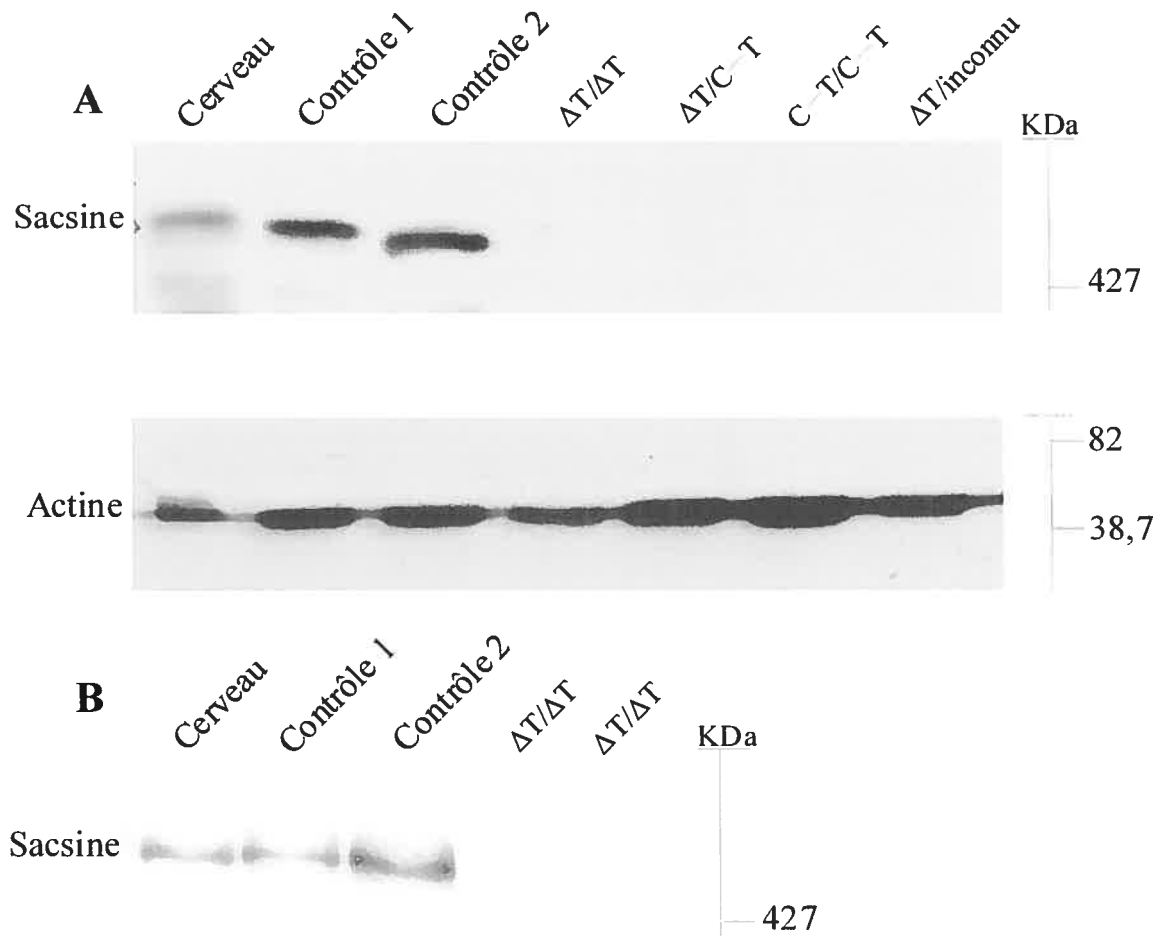


Figure III.3 Détection de sacsin dans des extraits protéiques de fibroblastes humains par buvardage Western. Des extraits protéiques de cerveau de souris et de fibroblastes humains de patients et d'individus normaux ont été séparés sur gel SDS-polyacrylamide 4% et transférés sur une membrane PVDF. Les membranes ont été incubées en présence de l'anticorps Sac2 (A) et Sac1 (B). Une bande de plus de 427 est révélée dans le cerveau et les cellules normales, alors qu'aucune bande n'est révélée dans les cellules de patients.

qu'aucune bande n'a été révélée dans l'extrait protéique de la lignée cellulaire de génotype ΔT /inconnu. Ce résultat suggère que le produit protéique encodé par l'allèle muté est soit dégradé, tronqué ou non-exprimé. L'allèle inconnu pourrait ne pas être exprimé dans le cas où il y aurait une mutation au niveau du promoteur. Il est aussi possible que l'ARNm de l'allèle inconnu soit transcrit, mais qu'un mécanisme de surveillance de l'ARNm tel le NMD («non-sens mediated decay») provoque sa dégradation (Singh & Lykke-Andersen, 2003).

Des analyses par buvardage Western ont aussi été effectuées en utilisant l'anticorps Sac1 contre des extraits protéiques provenant des lignées cellulaires d'individus normaux et de patients de génotypes $\Delta T/\Delta T$ (Figure III.3B). Comme pour l'anticorps Sac2, des bandes représentatives de saccine ont été révélées dans les lignées de fibroblastes d'individus normaux, alors qu'aucune bande n'a été détectée dans les fibroblastes de patients. La mutation ΔT a comme effet de tronquer environ 40% de la protéine. Puisque l'anticorps Sac1 reconnaît la séquence en N-terminale du codon stop prématuré, on aurait pu s'attendre à ce que la protéine tronquée soit détectée. Cependant, aucune bande d'une taille inférieure à saccine n'a été détectée par buvardage Western dans les extraits protéiques des cellules de patients. Ceci suggère donc que si la protéine est produite dans les fibroblastes, sa demi-vie est de courte durée. La perte de 40% de la séquence pourrait empêcher la protéine de se replier correctement. La forme tronquée pourrait donc être dégradée spécifiquement par des protéases reconnaissant les protéines mal repliées (Pickart, 2004).

Ces analyses confirment la spécificité des anticorps Sac1 et Sac2 contre saccine. De plus, l'absence de saccine dans les cellules de patients suggère que la forme tronquée est dégradée dans ces cellules.

III.1.3 Distribution de saccine dans les tissus murins

La distribution de saccine au niveau des différents tissus murins a été analysée par buvardage Western. Les protéines totales ont été extraites à partir de divers tissus de souris, séparées sur gel et transférées sur une membrane PVDF. Les résultats de la Figure III.4 démontrent que saccine est principalement exprimée au niveau du cerveau. Une bande de plus faible intensité correspondante à saccine est également présente au niveau du cœur. Une exposition de plus longue durée permet également la révélation d'une bande correspondante à saccine dans le muscle squelettique, ainsi que dans le pancréas (résultats non montrés). Ces résultats sont en accord avec les analyses par buvardage Northern qui montrait que l'ARNm de saccine est présent au niveau du cœur, cerveau, muscle squelettique et en faible quantité au niveau du pancréas (Engert *et al.*, 2000). L'absence d'une bande dans les autres tissus n'exclut pas la possibilité que saccine y soit exprimée, mais en quantité non-délectable par buvardage Western et Northern. En effet, des EST correspondant à l'ARNm de *SACS* ont été identifiés dans plusieurs tissus (Engert *et al.*, 2000). Les résultats de la Figure III.4 démontrent cependant que le niveau d'expression de saccine n'est pas équivalent dans tous les tissus et qu'il est plus important au niveau du cerveau.



Figure III.4 Analyse de l'expression de sacsin dans différents tissus murins par **buvardage Western**. Des extraits protéiques ont été isolés à partir de différents tissus de souris : cerveau, coeur, muscle, rein, pancréas et foie. Des quantités équivalentes d'échantillons de protéines totales ont été séparées sur gel SDS-polyacrylamide 4% et transférées sur une membrane PVDF. Les membranes ont été incubées en présence de l'anticorps Sac2. Une bande de forte intensité correspondant à sacsin est révélée au niveau du cerveau. Une bande de plus faible intensité est révélée au niveau du coeur.

III.2 LOCALISATION SUBCELLULAIRE DE SACSINE

La localisation subcellulaire de saccine a été analysée en utilisant deux approches différentes, soit la technique du fractionnement subcellulaire et l'immunocytochimie.

III.2.1 Fractionnement subcellulaire

Des fractions subcellulaires ont été préparées à partir de cerveaux de souris fraîchement prélevés. Le cerveau a été choisi pour ces expériences puisque nos résultats indiquent que c'est le tissu dans lequel le niveau d'expression de saccine est le plus élevé (Figure III.4). De plus, le système nerveux est le système affecté par l'ARSACS. Ceci suggère que saccine joue un rôle important au niveau des tissus du système nerveux. La procédure utilisée pour effectuer le fractionnement est schématisée sur la Figure III.5. Afin de vérifier la pureté des fractions, des protéines dont la localisation subcellulaire est connue ont été utilisées comme marqueurs des différentes fractions. Ces protéines ont été révélées à l'aide de divers anticorps monoclonaux. La Figure III.6 démontre que nucléoporeine, une protéine nucléaire, se retrouve principalement dans la fraction P1, alors que Hsp60, une chaperonne mitochondriale, est principalement localisée dans la fraction P2. De plus, l'anticorps anti-KDEL révèle Grp78 (Bip) et Grp94, deux protéines résidentes du réticulum endoplasmique, dans la fraction microsomiale P3. Il est à noter que ces deux protéines sont aussi retrouvées dans les fractions P1 et P2, mais en quantité moindre. La contamination de la fraction P1 pourrait être due au fractionnement du réticulum endoplasmique avec le noyau étant donné qu'il est en continuité directe avec l'enveloppe nucléaire. Cette contamination pourrait aussi être due à la présence de cellules intactes dans le culot P1. Cette dernière possibilité est appuyée par le fait qu'une

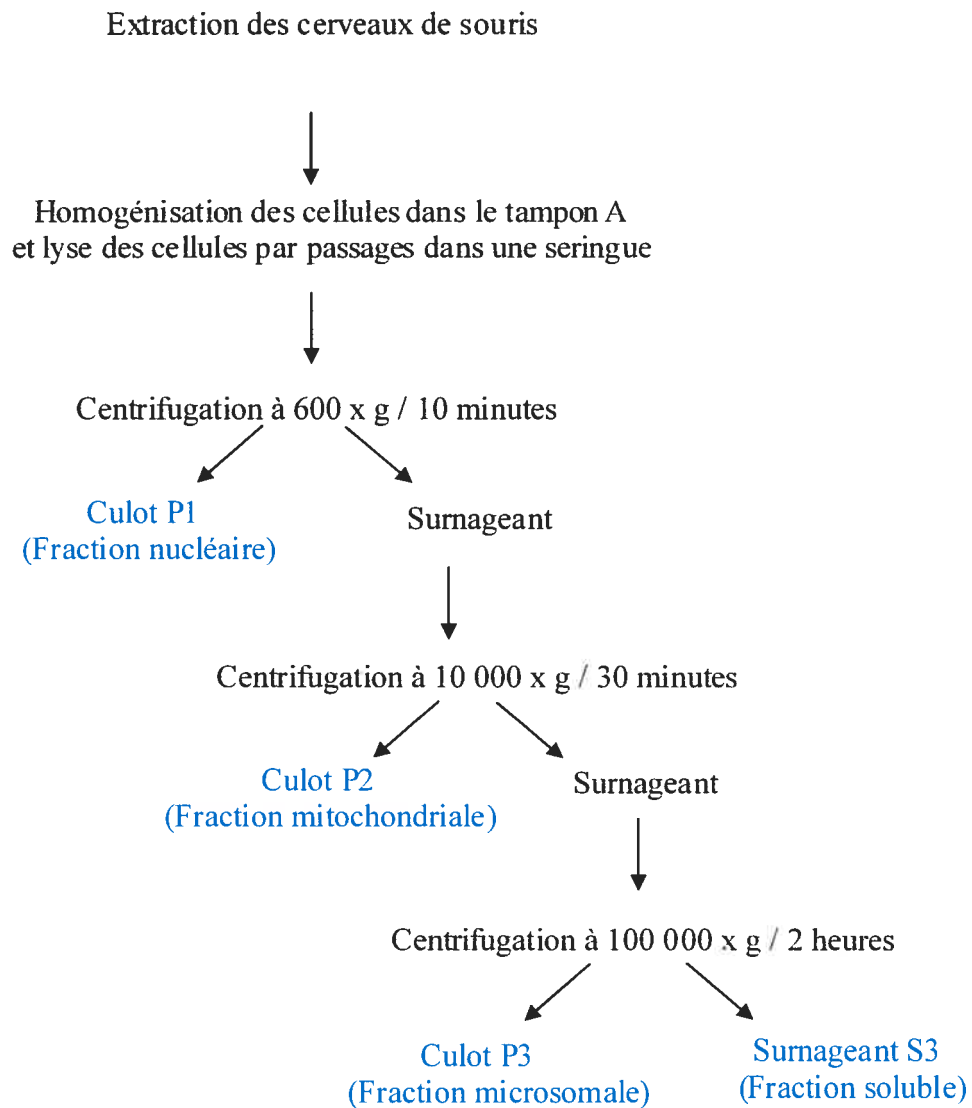


Figure III.5 Étapes principales du fractionnement subcellulaire du cerveau de souris.

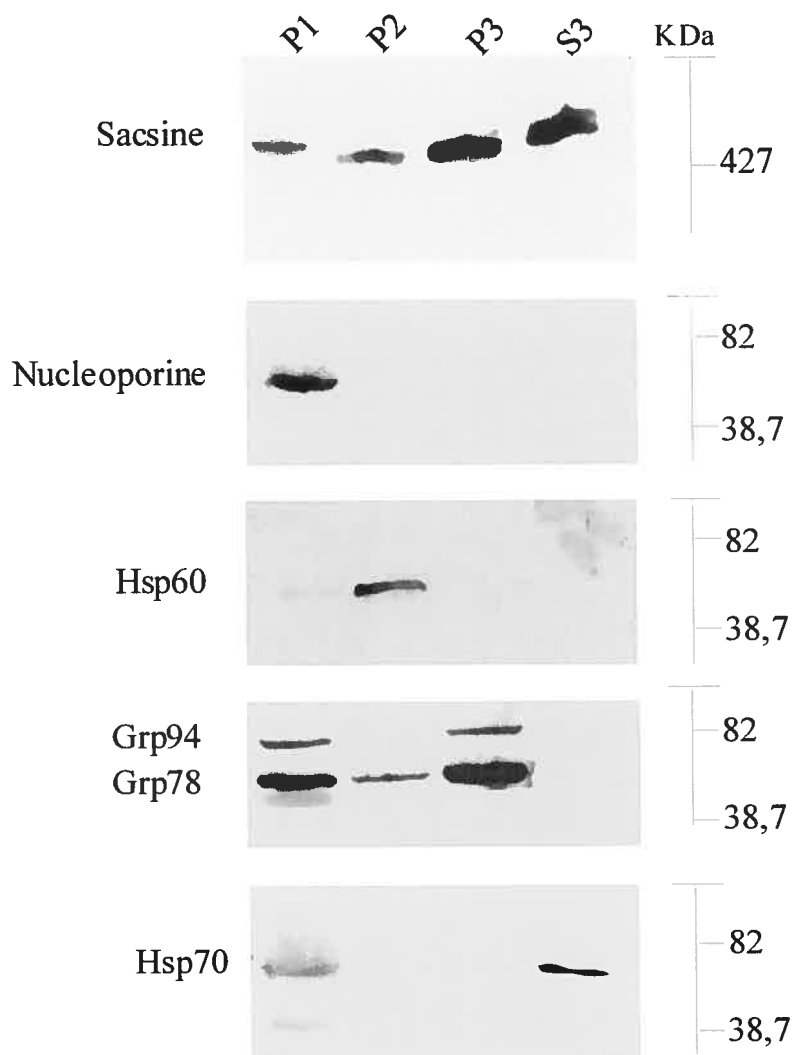


Figure III.6 Analyse de la localisation subcellulaire de saccine par fractionnement subcellulaire. Les fractions subcellulaires du cerveau de souris ont été préparées par centrifugation différentielle (Figure III.5). Les fractions obtenues ont été analysées par buvardage Western avec l'anticorps Sac2. La pureté de chaque fraction a été analysée à l'aide d'anticorps dirigés contre une protéine nucléaire (nucléoporine), mitochondriale (Hsp60), microsomale (Grp94 et Grp78) et à la fois nucléaire et cytoplasmique (Hsp70). Saccine est principalement enrichie dans les fractions P3 et S3. Les mêmes résultats ont été obtenus lors de deux expériences indépendantes.

faible contamination dans la fraction P1 par la protéine mitochondriale Hsp60 peut aussi être observée. Finalement, Hsp70, une chaperonne localisée au niveau du cytoplasme et du noyau, est présente dans les fractions P1 et S3, soit les fractions nucléaires et cytoplasmiques, respectivement. Ces résultats démontrent la validité de la procédure de fractionnement subcellulaire du cerveau. L'analyse des différentes fractions par buvardage Western avec l'anticorps Sac2 démontre que saccine est enrichie dans les fractions P3 et S3. La présence de saccine dans les fractions P1 et P2 peut aussi être observée, mais en quantité moindre. La présence de la protéine dans ces fractions est probablement due à une contamination de la fraction P3 dans les fractions P1 et P2, tel qu'observé par les protéines du réticulum endoplasmique. Ces résultats suggèrent donc que saccine est enrichie dans la fraction microsomale (P3), ainsi que dans la fraction soluble (S3).

III.2.2 Immunocytochimie

Afin de mieux caractériser la localisation subcellulaire de saccine, des expériences d'immunocytochimie ont été effectuées avec des fibroblastes à l'aide de l'anticorps Sac2. La Figure III.7 démontre un signal cytoplasmique dans les cellules d'individus normaux qui est absent dans les cellules de patients. Ce résultat était attendu puisque la région de saccine qui est reconnue par l'anticorps Sac2 est tronquée par la présence d'un codon stop prématuré chez les patients. La différence entre les résultats obtenus par les fibroblastes de patients et d'individus normaux permet aussi de démontrer la spécificité de l'anticorps Sac2 contre saccine lors des expériences d'immunocytochimie. De plus, le sérum pré-immun a été testé sur ces cellules. Un signal très faible, semblable au signal révélé

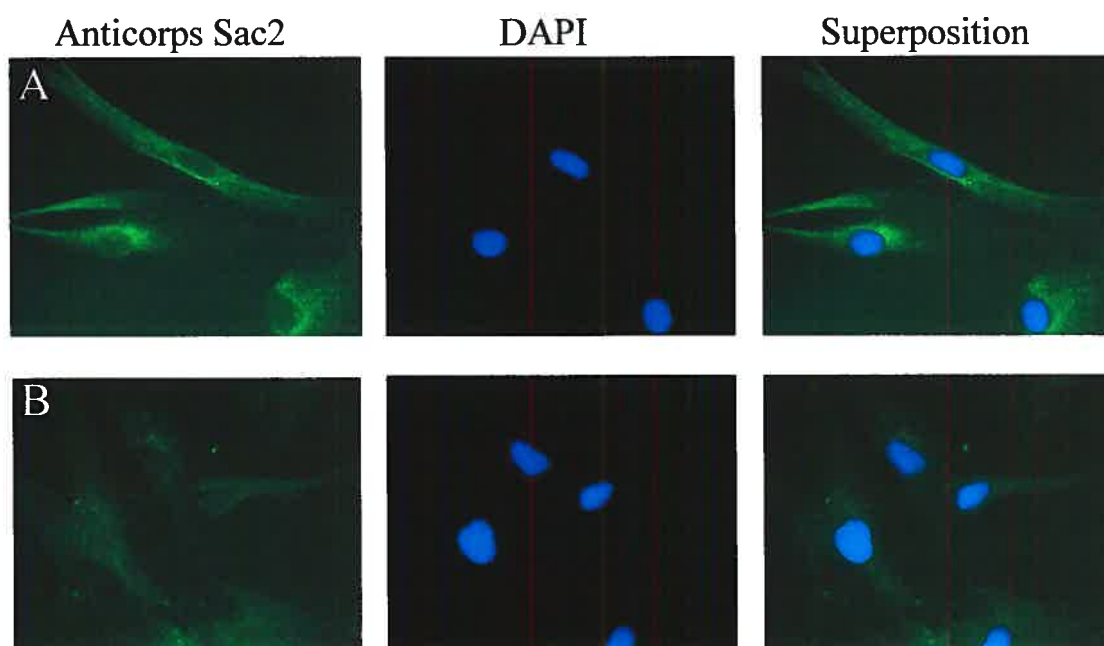


Figure III.7 Analyse de la localisation subcellulaire de saccine par immunocytochimie. Des fibroblastes normaux (A) et de patients (B) ont été fixés et incubés en présence de l'anticorps Sac2 suivit d'une incubation avec un anticorps secondaire couplé au fluorochrome oregon 514 (vert). Les noyaux des cellules ont été marqués au DAPI (bleu). Un signal cytoplasmique est révélé dans les cellules normales alors qu'aucun signal n'est révélé dans les cellules de patients.

par l'anticorps Sac2 dans les cellules de patients, a été observé (résultats non montrés). Il est à noter que l'anticorps Sac1 a aussi été utilisé pour ces expériences sans toutefois donner des résultats conclusifs et reproductibles.

La Figure III.7 montre que saccine est présente dans le cytoplasme, mais absente dans le noyau. Ces résultats sont en accord avec les analyses par fractionnement subcellulaire du cerveau de souris démontrant un enrichissement de saccine dans les fractions microsomales et cytoplasmiques. Il est intéressant de noter que dans plusieurs cellules, la distribution du signal est périnucléaire. Afin d'investiguer cette observation plus en détail, des expériences de double immunofluorescence avec différentes protéines dont la localisation subcellulaire est connue ont été effectuées. Dans un premier temps, une expérience de double immunofluorescence a été effectuée avec l'anticorps Sac2 et un anticorps monoclonal anti-KDEL. KDEL est le signal de rétention des protéines résidentes du réticulum endoplasmique (Munro & Pelham, 1987). Cet anticorps permet donc le marquage de cette organelle. La Figure III.8 montre une colocalisation partielle entre saccine et les protéines du réticulum endoplasmique. Il est à noter que cette colocalisation entre saccine et les protéines du réticulum endoplasmique n'est pas présente dans toutes les cellules. Ces résultats suggèrent que saccine est localisée dans le cytoplasme, ainsi qu'au niveau du réticulum endoplasmique. Il reste à déterminer si la localisation de saccine est dépendante de certaines conditions cellulaires, tel le cycle cellulaire. Il faudra aussi vérifier si la protéine est localisée dans le lumen du réticulum ou si elle est tout simplement liée à la membrane, soit directement ou via un intermédiaire.

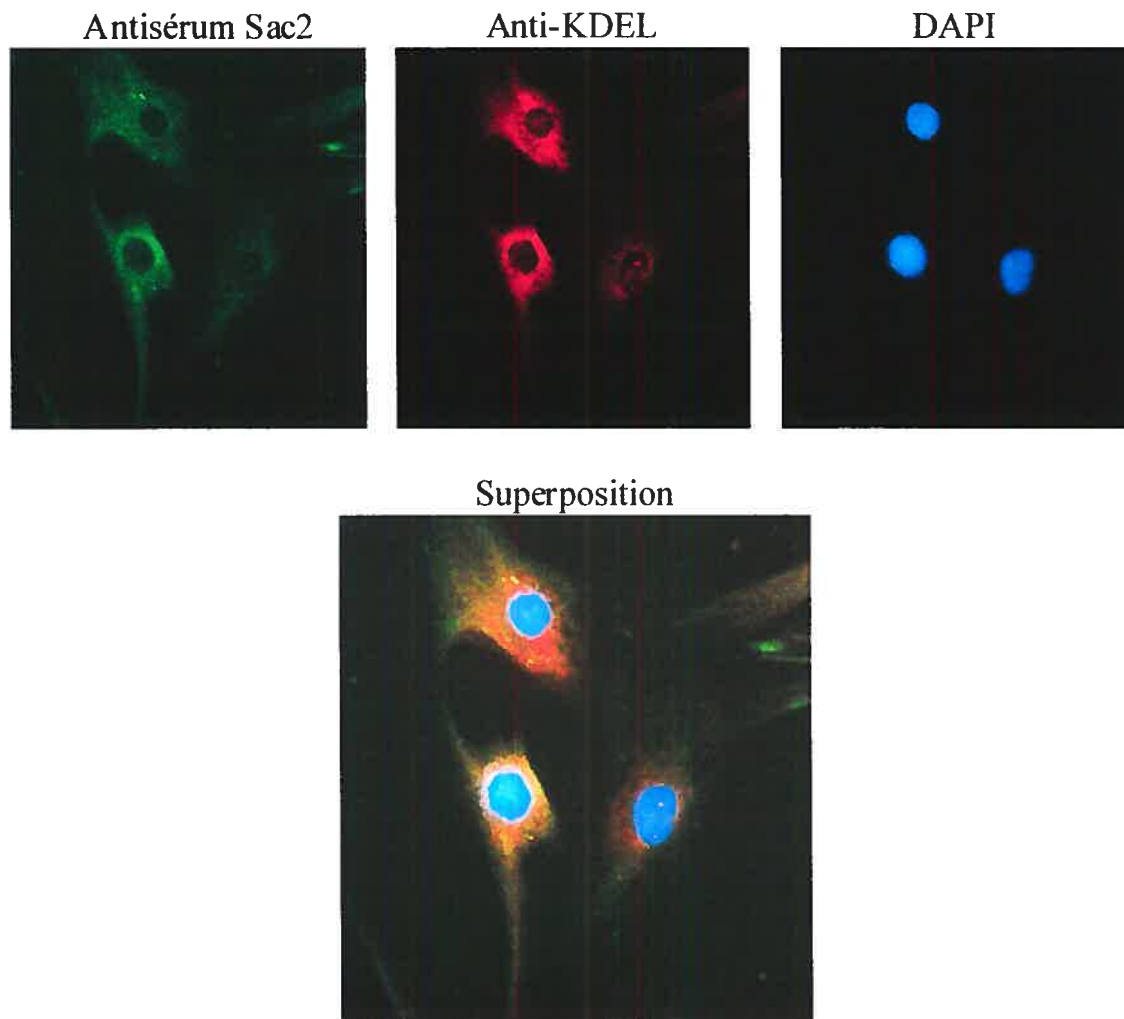


Figure III.8 Analyse de la localisation subcellulaire de saccine par double-immunofluorescence. Des fibroblastes normaux ont été fixés et incubés en présence de l'anticorps Sac2 et un anticorps monoclonal anti-KDEL, suivit d'une incubation avec un anticorps secondaire couplé au fluorochrome oregon 514 (vert) et au alexa fluor (rouge), respectivement. Les noyaux des cellules ont été marqués au DAPI (bleu). Il y a co-localisation partielle entre saccine et le réticulum endoplasmique.

La colocalisation entre saccine et l'appareil de golgi a aussi été analysée en utilisant un anticorps contre le récepteur KDEL (KDELRL). Les résultats de la figure III.9 indiquent qu'il n'y a pas de colocalisation entre ces deux protéines, indiquant que saccine n'est pas associée à l'appareil de golgi. Un anticorps contre la protéine actine a aussi été utilisé lors de ces expériences. La Figure III.10 démontre qu'il n'y a pas de colocalisation entre ces deux protéines.

III.3 ANALYSE DE L'EFFET D'UN CHOC THERMIQUE SUR L'EXPRESSION ET LA LOCALISATION SUBCELLULAIRE DE SACSINE

Étant donné la présence des domaines semblables aux protéines Hsp90 et dnaJ chez saccine, il a été suggéré qu'elle pourrait être une protéine de stress (Engert *et al.*, 2000). Afin d'explorer cette possibilité, l'effet d'un choc thermique sur son expression a été analysé. Pour cette expérience, des fibroblastes humains ont été soumis à un choc thermique à 43°C pendant 30 minutes, suivit d'une période de récupération d'une durée de 12 heures. L'expression de saccine a ensuite été analysée par buvardage Western et par immunocytochimie. Les résultats de la Figure III.11 montrent que le niveau d'expression de saccine n'est pas modifié par un choc thermique. En revanche, une augmentation de l'expression de Hsp70 est observée, tel que rapporté antérieurement (Welch & Suhan, 1986).

Puisque la localisation subcellulaire de certaines chaperones est dépendante de stress cellulaires (Welch & Suhan, 1986), la localisation subcellulaire de saccine a été analysée par immunocytochimie suite à un choc thermique. La Figures III.12A montre les cellules n'ayant pas été soumises à un choc thermique, alors que la Figure III.12B représente les cellules suite à un choc thermique à 43°C pendant 30 minutes, suivit d'une

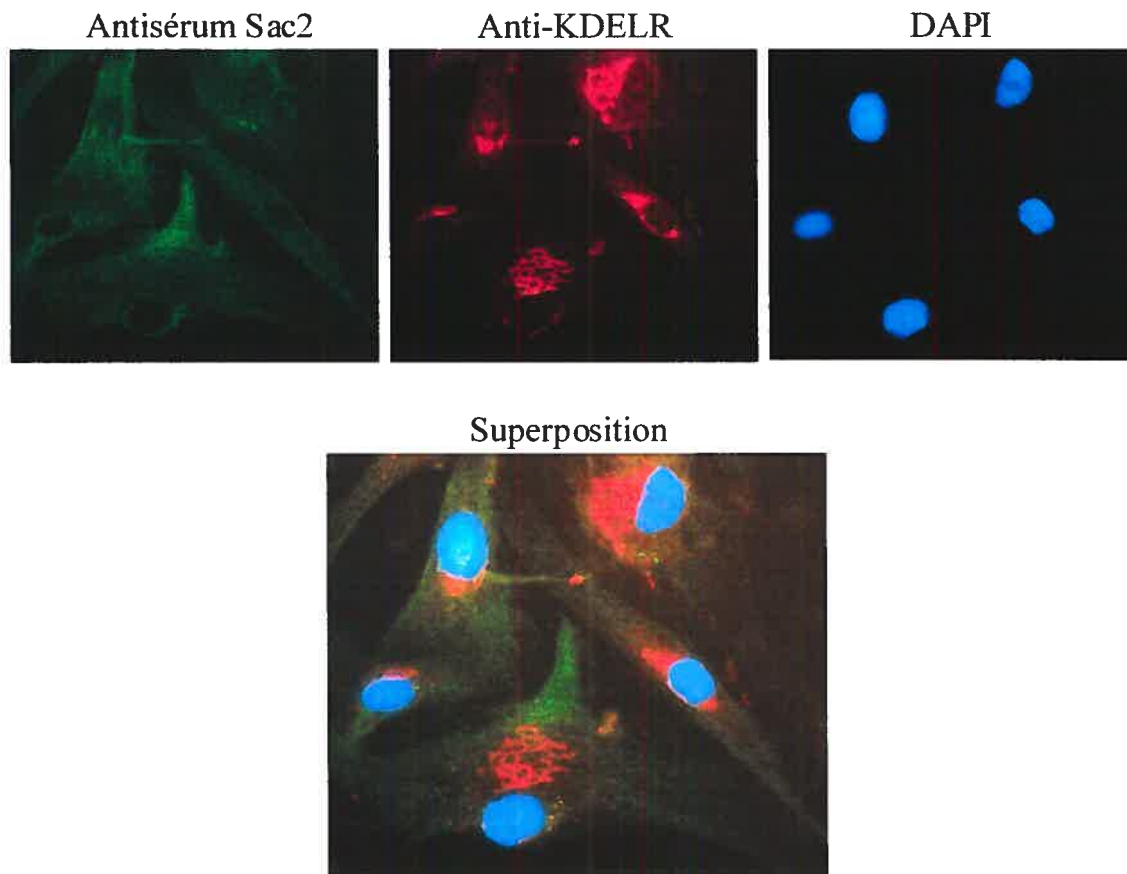


Figure III.9 Analyse de la localisation subcellulaire de saccine par double-immunofluorescence. Des fibroblastes normaux ont été fixés et incubés en présence de l'anticorps Sac2 et un anticorps monoclonal KDELR suivit d'une incubation avec un anticorps secondaire couplé au fluorochrome oregon 514 (vert) et au alexa fluor (rouge), respectivement. Les noyaux des cellules ont été marqués au DAPI (bleu). Saccine ne co-localise pas avec l'appareil de Golgi.

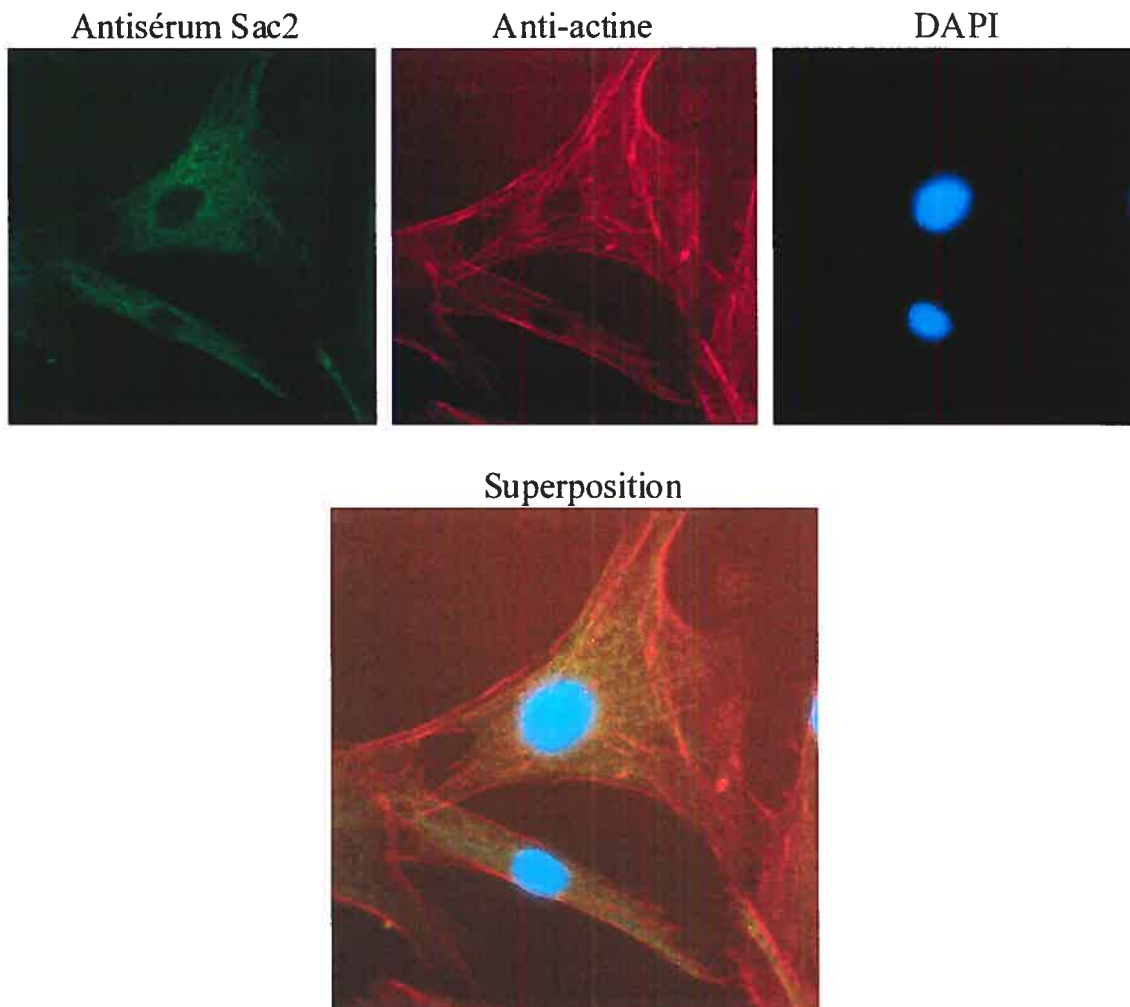


Figure III.10 Analyse de la localisation subcellulaire de sarsine par double-immunofluorescence. Des fibroblastes normaux ont été fixés et incubés en présence de l'anticorps Sac2 et un anticorps monoclonal anti-actine, suivit d'une incubation avec un anticorps secondaire couplé au fluorochrome oregon 514 (vert) et au alexa fluor (rouge), respectivement. Les noyaux des cellules ont été marqués au Dapi (bleu). Sarsine ne co-localise pas avec actine.

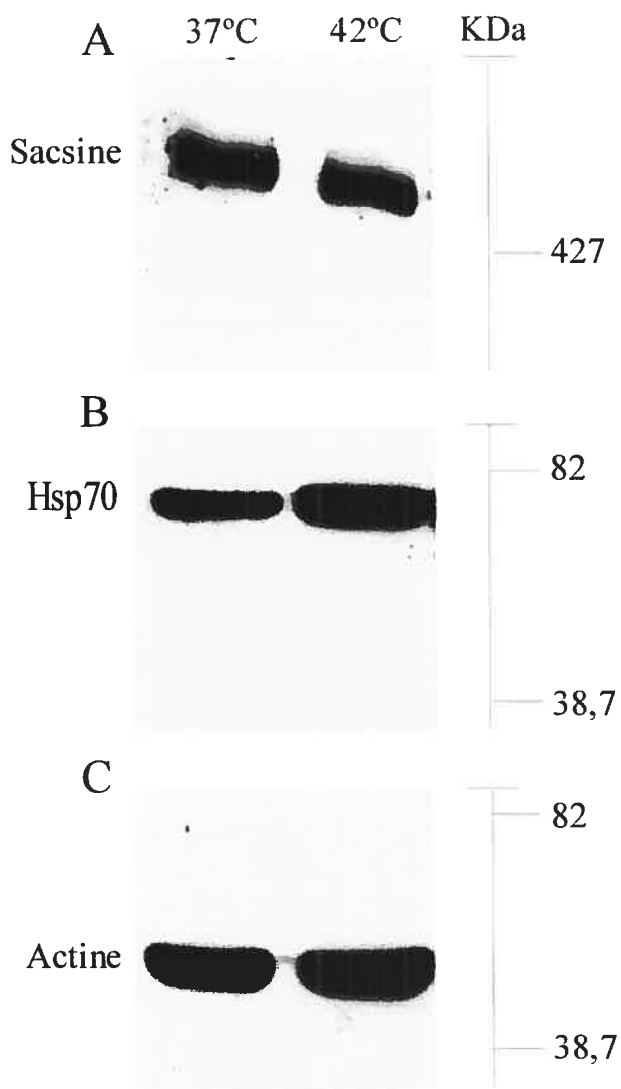


Figure III.11 Analyse de l'effet d'un choc thermique sur l'expression de saccine par buvardage Western. Des fibroblastes normaux ont été soumis ou non à un choc thermique de 43°C, suivit d'une période de récupération de 12 heures. Des extraits de protéines totales ont été isolés à partir des cellules, séparés sur gel SDS-polyacrylamide 4%, et transférés sur une membrane PVDF. Les membranes ont été incubées en présence de l'anticorps Sac2 (A), anti-Hsp70 (B) et anti-actine (C).

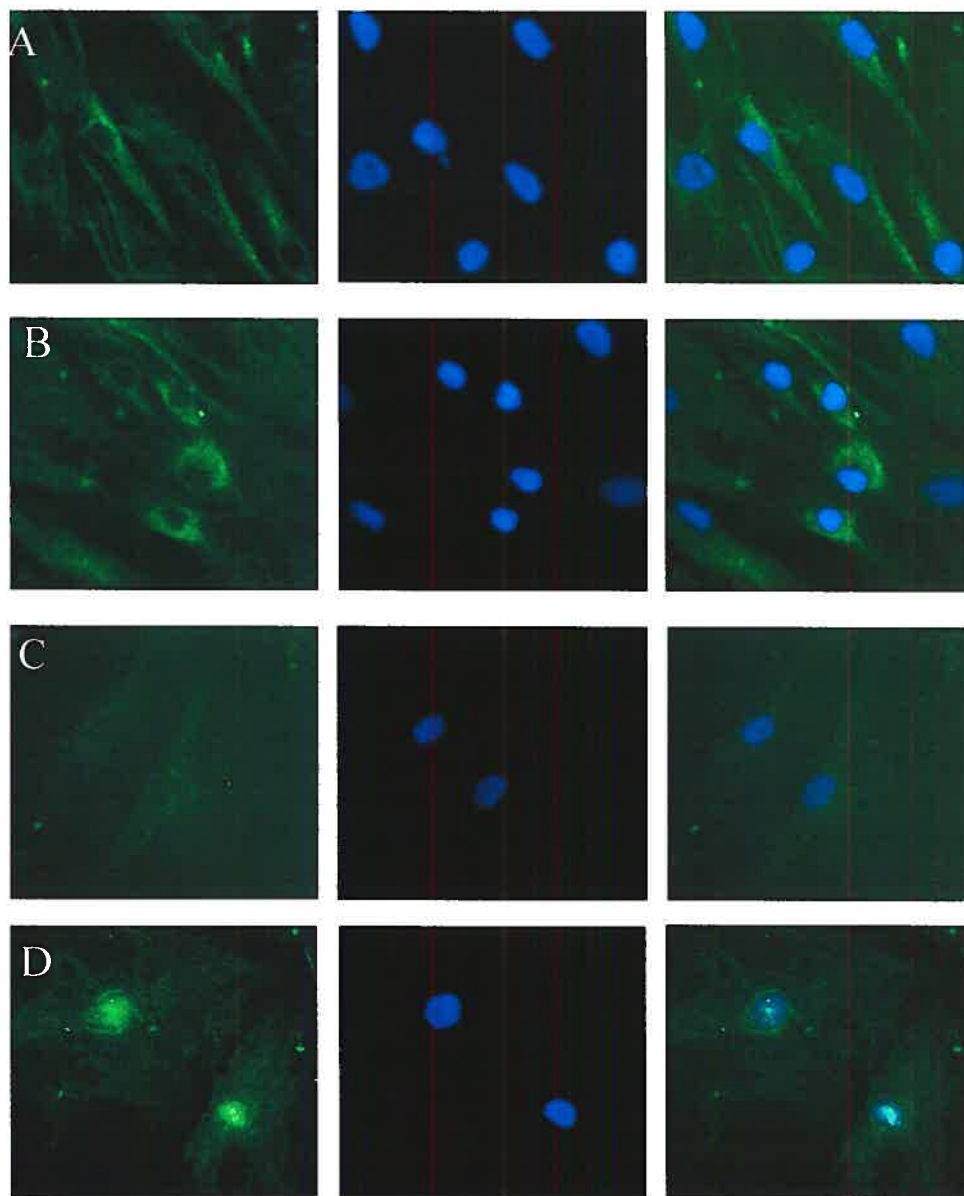


Figure III.12 Analyse immunocytochimique de l'effet d'un choc thermique sur l'expression et la localisation subcellulaire de saccine. Des fibroblastes normaux ont été soumis ou non à un choc thermique de 43°C, suivit d'une période de récupération de 12 heures. Les cellules ont été fixées et incubées en présence de l'anticorps Sac2 et un anticorps monoclonal anti-actine, suivit d'une incubation avec un anticorps secondaire couplé au fluorochrome oregon 514 (vert) et au alexa fluor (rouge). Les noyaux des cellules ont été marqués au DAPI (bleu) (C).

période de récupération d'une durée de 12 heures. Ces résultats suggèrent qu'un stress thermique ne provoque pas de changement au niveau de l'expression de saccine. De plus, il ne semble pas y avoir de différence dans la localisation subcellulaire de saccine suite à un choc thermique. Comme contrôle positif, un anticorps anti-Hsp70 a été utilisé afin de révéler cette protéine. Les cellules montrées dans la Figure III.12C n'ont pas été exposées à un choc thermique, contrairement à celles montrées dans la Figure III.12D. Ces résultats démontrent clairement une augmentation du niveau d'expression d'Hsp70, ainsi qu'une translocation de la chaperonne du cytoplasme vers le noyau après un choc thermique. Ces résultats correspondent à ceux rapportés dans la littérature concernant l'effet d'un stress thermique sur l'expression et la distribution de Hsp70 (Welch & Suhan, 1986).

Les analyses par buvardage Western et par immunocytochimie suggèrent donc que l'expression et la distribution de saccine ne sont pas affectées par un choc thermique. Il est cependant possible que différentes conditions thermiques pourraient avoir un effet sur la protéine. De plus, l'effet de différents types de stress cellulaires sur l'expression et la distribution de saccine pourrait être analysé.

III.4 TECHNIQUE DU DOUBLE HYBRIDE

Afin d'identifier le rôle cellulaire de saccine, il est nécessaire d'identifier les partenaires avec lesquels elle s'associe. Dans ce but, les partenaires d'interaction potentiels de saccine ont été recherchés à l'aide de la technique du double hybride en levure. Quatre criblages indépendants d'une banque d'ADNc de cerveau adulte humain ont été effectués. Le choix de cette banque était basé sur l'expression importante de saccine dans ce tissu, ainsi que par la nature de la maladie causée par une déficience de

cette protéine. Les appâts utilisés lors de ces criblages ont été générés en insérant différents fragments de *SACS* (Figure III.13) dans le vecteur pdEst32 en fusion avec un gène codant pour le domaine de liaison à l'ADN du facteur de transcription *GAL4*. Étant donné la grande taille de saccine, la protéine complète n'a pas pu être utilisée comme appât. Le premier criblage a été effectué en utilisant comme appât une région en N-terminal de saccine. Cette région contient un des 4 segments répétitifs de la protéine, ainsi que le motif similaire à la portion N-terminale de Hsp90. Un appât contenant la région codante pour le troisième segment répétitif de saccine, nommé segment 3, a aussi été utilisé lors d'un criblage. Finalement, deux clones codant pour la région C-terminal de saccine ont été générés. Les deux appâts contiennent le motif DnaJ et le domaine HEPN. Malgré un criblage de plus de 4×10^6 clones d'ADNc, aucun des appâts n'a révélé une interaction avec un partenaire cellulaire. Dans le cas de l'appât C-terminal 1, quelques clones ont été retenus, mais se sont éventuellement avérés des faux positifs. Bien que la technique de double hybride soit un système puissant d'identification de partenaires d'interactions, plusieurs facteurs peuvent faire en sorte que des interactions physiologiquement importantes ne soient pas détectées par ce système. Ces facteurs, mis dans le contexte de ce projet, seront discutés en détail dans le chapitre IV.

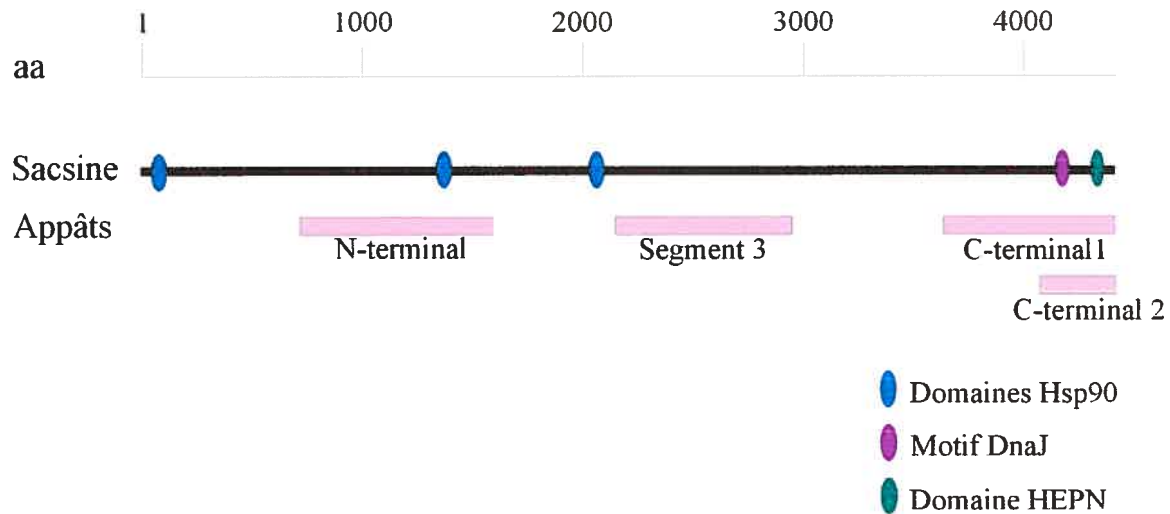


Figure III.13 Appâts utilisés lors des criblages par la technique du double hybride en levure. Les positions relatives des appâts (pdEST32-N-terminal, pdEST32-Segment3, pdEST32-C-terminal1 et pdEST32-C-terminal2) utilisés lors des criblages d'une banque d'ADNc de cerveau humain adulte sont indiquées. Les positions des domaines Hsp90 et DnaJ sont schématisées en relation avec la protéine complète de 4580 aa.

CHAPITRE IV : DISCUSSION

L'ARSACS est une maladie neurodégénérative qui affecte un grand nombre d'individus au Québec et dans plusieurs autres régions du monde. Le gène responsable de la maladie, nommé *SACS*, a été identifié par la technique du clonage positionnel. Au moment de sa découverte, rien n'était connu au sujet de ce gène et de la protéine qu'il encode. La présente étude marque le début de la caractérisation de saccine, la protéine codée par *SACS*.

IV.1 EXPRESSION DE SACSINE

Suite à la découverte du gène *SACS*, il a été démontré par buvardage Northern que l'ARNm de ce gène est exprimé au niveau du cerveau, du muscle squelettique et du pancréas. De plus, des ESTs correspondant au gène ont été retrouvés dans des banques d'ADNc provenant du cerveau, de l'utérus, du rein et du foie (Engert et *al.*, 2000). Au cours de notre étude, nous avons démontré la présence de saccine par buvardage western au niveau du cerveau, du cœur, et en faible quantité au niveau du muscle squelettique et du pancréas. Ceci indique donc que le gène *SACS* est exprimé au niveau de divers tissus. Toutefois, nos résultats confirment que l'expression de saccine est beaucoup plus importante au niveau du cerveau, ce qui est en ligne avec la nature de la maladie causée par une mutation dans le gène codant pour saccine. L'ARSACS est une maladie dégénérative qui affecte le système nerveux central ainsi que le système nerveux périphérique. Il est donc raisonnable de s'attendre à ce que l'activité de la protéine responsable de la maladie soit critique au niveau du cerveau.

Lors de nos expériences, nous avons vérifié que saccine est absente dans les fibroblastes de patients. Ce résultat était attendu puisque les cellules que nous avons utilisées pour effectuer nos expériences provenaient de patients porteurs de mutations

dans le gène *SACS* engendrant des codons stop prématurés. Il a été démontré antérieurement que l'ARNm de *SACS* est présent dans les fibroblastes de patients (Engert *et al.*, 2000). Ceci suggère donc que l'ARNm muté n'est pas dégradé par un système de contrôle de qualité de l'ARNm, et que la protéine tronquée est traduite dans la cellule. La mutation majeure ΔT provoque un changement dans le cadre de lecture qui engendre un codon stop prématuré. Cette mutation tronquerait environ 40% de la protéine générant un produit protéique d'environ 330 kDa. La mutation mineure C \rightarrow T est une mutation non-sens qui engendrerait un produit d'environ 280 kDa. Aucune bande correspondante à une protéine tronquée n'a été révélée par buvardage Western en utilisant l'anticorps Sac1, spécifique pour la région N-terminale de saccine, contre les extraits protéiques des cellules de patients. Ceci suggère que la protéine tronquée est dégradée dans la cellule. Sa dégradation pourrait être causée par un mauvais repliement. Les protéines mal repliées sont sujettes à une dégradation spécifique par la voie du protéasome (Pickart, 2004).

Il a été suggéré que les problèmes cliniques associés à certaines ataxies héréditaires seraient causés par la toxicité d'agrégats de protéines mutées et non par la perte de leur activité cellulaire (Ordway *et al.*, 1997; Zoghbi & Orr, 2000). Étant donné que la pathogénie de l'ARSACS n'est pas encore connue, l'hypothèse de l'agrégat protéique demeure une possibilité. Nos expériences par buvardage Western n'ont pas permis la détection d'une protéine tronquée dans les extraits protéiques de cellules de patients. Il est cependant possible que la protéine mutante ne soit dégradée que partiellement ou pas du tout et qu'elle aurait la capacité de former des agrégats insolubles non détectés sur gel. Si cela est le cas, il est possible qu'une bande de petite taille

représentative de la protéine mutante tronquée ait passée inaperçue lors de nos études par buvardage Western.

Il est aussi possible que des inclusions stables formées par la protéine tronquée ne soient pas dénaturées et solubilisées adéquatement lors de nos expériences et que le poids moléculaire de l'inclusion soit trop important pour pénétrer dans un gel de polyacrylamide. En résumé, il sera crucial de déterminer si les symptômes reliés à l'ARSACS sont causés par la perte de fonction de saccine ou par la toxicité d'agrégats comme dans plusieurs maladies neurologiques connues, telles les ataxies spinocérébelleuses (Zoghbi & Orr, 2000).

IV.2 LOCALISATION SUBCELLULAIRE DE SACSINE

L'identification du compartiment cellulaire dans lequel agit une protéine peut donner plusieurs indices au sujet de son rôle cellulaire. Les résultats obtenus à partir de programmes de prédiction de localisation subcellulaire se sont avérés peu informatifs. En effet, la séquence de saccine ne contient aucun peptide signal connu qui permettrait la prédiction de sa localisation subcellulaire avec un niveau de confiance élevé. De plus, elle ne contient aucune région hydrophobe caractéristique d'une protéine membranaire.

Nous avons étudié la localisation subcellulaire de saccine en utilisant deux approches indépendantes; le fractionnement subcellulaire et l'immunocytochimie. Les analyses par fractionnement subcellulaire ont été effectuées en utilisant le cerveau de souris. Ces expériences ont révélé que saccine est enrichie dans la fraction microsomale, ainsi que dans la fraction soluble. Les études par immunocytochimie effectuées à l'aide de l'anticorps Sac2 ont révélé un signal au niveau du cytoplasme de fibroblastes humains.

Nous avons toutefois observé que le signal dans plusieurs cellules était plus intense dans la région périnucléaire. En effet, des expériences de double immunofluorescence ont démontré une co-localisation entre salsine et certaines protéines localisées au niveau du réticulum endoplasmique (Grp78 et Grp94). Toutefois, une co-localisation n'a pas été observée entre salsine et KDELR, une protéine résidente de l'appareil de Golgi. Nous proposons donc que l'enrichissement de salsine dans la fraction microsomale correspondrait à une population de la protéine localisée au niveau du réticulum endoplasmique et que la fraction soluble représenterait une population cytoplasmique de la protéine. Il est important de noter que ces expériences ont été effectuées à partir de deux tissus différents et qu'une localisation subcellulaire différente selon le tissu ne peut pas être exclue. Nous avons tenté des expériences d'immunohistochimie avec des échantillons de cerveaux humains et murins, mais ces expériences se sont avérées non concluantes en raison d'un bruit de fond important révélé par les anticorps anti-salsine. Il sera donc important de démontrer la localisation subcellulaire de salsine dans le cerveau par immunohistochimie, soit en utilisant des anticorps différents ou en utilisant des conditions expérimentales qui permettraient de minimiser le bruit de fond.

Les résultats obtenus à partir de ces expériences ne permettent pas de distinguer si la fraction microsomale de salsine est localisée au niveau du lumen du réticulum endoplasmique ou liée à la membrane de cette organelle. Si elle est associée à la membrane, elle pourrait soit être intégrée dans la membrane ou y être liée via (1) certaines modifications post-traductionnelles, ou (2) des interactions protéiques. Nous avons des résultats préliminaires démontrant que l'enrichissement de salsine dans la fraction microsomale n'est pas affecté par un traitement avec un détergeant non-ionique.

Ceci suggère donc que l'association de saccine avec la fraction microsomale n'est pas affectée par la solubilisation des membranes, indiquant que saccine ne serait pas présente dans le lumen ou dans la membrane du réticulum endoplasmique. Nous avons toutefois observé un déplacement partiel de la protéine de la fraction microsomale à la fraction soluble lors d'un traitement avec le KCl. Ceci suggère donc que saccine est associée au réticulum endoplasmique via un complexe.

Il est important de noter qu'une colocalisation entre saccine et les protéines du réticulum endoplasmique n'était pas toujours observable. Il est donc possible que la localisation de saccine est dépendante de certaines conditions cellulaires, telles le cycle cellulaire, certains stress cellulaires, etc. D'autres expériences devront être effectuées afin de répondre à cette question. De plus, nous ne pouvons pas exclure la possibilité que l'absence d'un signal au niveau du réticulum endoplasmique dans certaines cellules soit un artéfact causé par les conditions expérimentales. Lors de nos expériences d'immunocytochimie, les cellules ont été fixées et perméabilisées avec un mélange 50% méthanol/50% acétone. Cette méthode de fixation peut avoir un effet sur l'intégrité de la cellule, ainsi que sur la localisation de certaines protéines (Hoetelmans *et al.*, 2001). Nous avons refait ces expériences en fixant les cellules avec le paraformaldéhyde. Cette méthode n'a pas permis de révéler un signal adéquat avec les anticorps anti-saccine.

Étant donné que l'existence d'isoformes de saccine n'a pas encore été bien étudiée, nous ne pouvons exclure la possibilité que les signaux observés par immunocytochimie correspondent à plus d'une forme de la protéine. Cependant, d'après nos résultats par buvardage Western, où seulement une bande représentative de saccine

distinguait les extraits protéiques provenant de cellules d'individus normaux et de patients, ceci ne semble pas être le cas.

IV.3 RECHERCHE DES PARTENAIRES D'INTERACTION PAR LA TECHNIQUE DU DOUBLE HYBRIDE

L'identification de partenaires d'interaction cellulaires d'une protéine est une étape cruciale dans la détermination de son rôle cellulaire. Généralement, on peut s'attendre à ce que deux protéines qui interagissent directement soient impliquées dans un même processus cellulaire. L'identification d'un partenaire d'interaction de fonction connue peut donc donner des indices au sujet du rôle d'une protéine de fonction inconnue.

IV.3.1 Stratégie utilisée pour la recherche de partenaires d'interaction

La technique du double hybride est un système de détection de partenaires d'interaction puissant qui a permis par le passé l'identification de plusieurs interactions protéiques (Toby *et al.*, 2001). Par exemple, cette technique a été utilisée dernièrement dans le but d'identifier le réseau d'interactions protéiques du protéome de *Drosophila melanogaster* (Giot *et al.*, 2003). Un des nombreux avantages de cette technique comparativement à d'autres méthodes analogues est qu'elle peut être utilisée pour effectuer le criblage d'une banque d'ADNc. Cette particularité est grandement recherchée lorsqu'il n'y a pas de candidat solide, ou lorsque l'on vise l'identification de tous les partenaires cellulaires d'une protéine. Ceci étant le cas pour saccine, nous avons choisi de rechercher ses partenaires cellulaires en utilisant le système du double hybride chez la levure afin de cribler une banque d'ADNc de cerveau humain adulte. Le choix du

cerveau comme tissu d'origine de la banque d'ADNc était basé sur notre étude de l'expression tissulaire de sarsine, démontrant que cette protéine est principalement exprimée au niveau du cerveau.

Un des problèmes associés à la recherche de partenaires d'interaction de sarsine par la technique du double-hybride est lié à la taille de cette protéine (~ 520 kDa). Puisque sarsine est une protéine de grande taille, nous n'avons pas pu utiliser la protéine complète comme appât. Nous avons donc cloné différents segments de la protéine en fusion avec le domaine de liaison à l'ADN *GAL4* pour servir d'appâts. L'utilisation de différents domaines d'une protéine, au lieu de la protéine complète, est une approche qui a souvent été utilisée. Par exemple, l'utilisation de la région N-terminale de la protéine huntingtin comme appât a permis d'identifier l'interaction entre cette protéine et HIP-I (Wanker *et al.*, 1997) Les segments de sarsine que nous avons clonés pour effectuer les criblages sont représentés dans la figure III.13.

Malgré le criblage de plus de 1×10^7 ADNc avec 4 différents appâts recouvrant ~ 60% de sarsine, aucun partenaire d'interaction n'a été révélé. Ceci pourrait être dû à un ou plusieurs des facteurs mentionnés ci-dessous, ceux-ci étant souvent considérés comme des limitations du système double-hybride.

Structure tertiaire et modifications post-traductionnelles des peptides servant d'appât et de proie

La structure tertiaire d'une protéine est fondamentale à son activité physiologique. Ceci est principalement dû au fait qu'une conformation tridimensionnelle différente de la conformation native peut altérer le potentiel d'interaction d'une protéine, et ainsi

compromettre sa fonction physiologique. Il est donc évident que lors d'un criblage par la technique du double hybride, la structure tertiaire adéquate de l'appât est primordiale à l'identification de partenaires d'interaction. Pour les mêmes raisons, la structure tertiaire adéquate de la protéine agissante comme proie est également importante. Il est donc possible qu'aucun partenaire cellulaire de saccine n'a été repêché si les peptides servant d'appât n'étaient pas repliés comme dans la conformation native. Ceci pourrait évidemment être le cas si le repliement est dépendant de la séquence complète de saccine. Il faut également considérer la possibilité que les domaines d'interaction de saccine soient constitués d'acides aminés séparés au niveau de la séquence primaire, mais rapprochés au niveau de la protéine repliée. Ceci pourrait s'appliquer à notre cas si les segments de saccine utilisés pour le criblage ne renfermaient pas tous les acides aminés clés d'un site d'interaction particulier.

L'interaction entre deux protéines peut être dépendante de certaines modifications post-traductionnelles, telles la phosphorylation, la glycosylation et autres. Étant donné que l'expression de la protéine est produite dans un système hétérologue (levure), la possibilité demeure que certaines modifications cruciales ne soient pas effectuées. Les problèmes liés à la structure tertiaire et aux modifications post-traductionnelles pourraient potentiellement être contournés en utilisant un système de double-hybride dans des lignées de cellules de mammifères (Luo *et al.*, 1997). L'utilisation d'un tel système permettrait aux partenaires d'interaction potentiels d'être synthétisés et d'interagir dans un contexte plus naturel que dans la levure.

Étiquetage de la proie et de l'appât

Le principe du système double-hybride est basé sur la reconstitution du facteur de transcription *GAL4* au moyen d'une interaction entre l'appât et la proie, ces derniers étant fusionnés au domaine de liaison à l'ADN et au domaine d'activation de la transcription, respectivement. Une des limitations d'un tel système est la possibilité que la présence d'un domaine *GAL4* fusionné à l'appât ou à un partenaire d'interaction potentiel pourrait nuire au bon repliement de ces protéines. Il est aussi possible que les domaines *GAL4* créent un encombrement stérique empêchant l'interaction entre les partenaires d'interaction.

Banque d'ADNc

La banque d'ADNc utilisée lors de nos essais de double-hybride comprenait environ 1×10^7 clones d'ADNc. Même si ce nombre est très élevé, il est probable que certains transcrits dont l'expression est faible ne soient pas présents dans la banque d'ADNc. L'absence de clones codant pour les partenaires d'interaction potentiels de saccine pourrait donc être responsable de nos échecs de criblage par double-hybride. Il faut aussi tenir compte du fait que l'ADNc fusionné au domaine d'activation *GAL4* doit être inséré dans le même cadre de lecture que la séquence codante pour ce dernier. Il est donc possible que les partenaires cellulaires potentiels de saccine n'aient pas été traduits correctement puisqu'ils étaient fusionnés au domaine d'activation de la transcription dans un mauvais cadre de lecture (Crieking, 1999).

Une étude exhaustive visant l'analyse du patron d'expression de tous les gènes humains et murins a démontré que l'expression de *SACS* au niveau du cerveau est plus

importante au stade embryonnaire qu'au stade adulte (Su *et al.*, 2004). Il serait donc intéressant d'utiliser une banque d'ADNc provenant de tissu embryonnaire afin d'effectuer un criblage par double-hybride. Il est possible que certains partenaires d'interaction de saccine soit exprimés au stade embryonnaire, et non au stade adulte.

IV.4 ANALYSE DE L'EFFET D'UN CHOC THERMIQUE SUR L'EXPRESSION ET LA LOCALISATION SUBCELLULAIRE DE SACSINE

Les analyses par comparaison de séquence n'ont pas permis l'identification d'un homologue ou d'une protéine similaire à saccine dont la fonction serait connue. On retrouve cependant dans la séquence de saccine un motif semblable au domaine J de la protéine DnaJ, ainsi que trois segments qui présentent des similarités avec la région N-terminale de la protéine de stress Hsp90. Hsp90 et DnaJ (l'homologue bactérien de Hsp40) sont des protéines de stress qui jouent le rôle de chaperonne moléculaire et co-facteur d'une chaperone moléculaire, respectivement. Il a donc été proposé que saccine aurait le rôle de chaperone moléculaire (Engert *et al.*, 2000). Il a été démontré que l'expression des Hsp augmente lorsqu'une cellule est soumise à un choc thermique (Tissieres *et al.*, 1974). En conséquence, nous avons formulé l'hypothèse que l'expression de saccine pourrait également être stimulée suite à un choc thermique. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons soumis des fibroblastes à un choc thermique avant d'analyser l'expression de saccine par buvardage Western. Nous avons aussi effectué des expériences d'immunocytochimie pour voir si la localisation subcellulaire de la protéine est affectée par un stress thermique, ceci étant le cas pour d'autres Hsp (Welch & Suhan, 1986). Nos expériences n'ont pas permis de différencier l'expression, ni la localisation de saccine, suite à un choc thermique. Toutefois, ceci n'exclut pas la possibilité que le

niveau d'expression et la localisation subcellulaire soient dépendants d'autres stress cellulaires, ou de conditions de stress thermiques différentes. En effet, il a été démontré que l'expression de plusieurs protéines Hsp est influencée par des stress cellulaires, tels les rayons ultraviolets, l'alcool, les oxydants, les analogues d'acides aminés, etc. (Roychowdhury & Kapoor, 1988; Levinson *et al.*, 1980; Jacquier-Sarlin *et al.*, 1995; Koizumi *et al.*, 1993). De plus, certaines conditions physiologiques peuvent induire l'expression des Hsp. Par exemple, les infections, l'hypoxie, une carence en glucose et l'inflammation ont tous un effet sur l'expression de Hsp (Hickman-Miller & Hildebrand, 2004; Drummond & Steinhardt, 1987; Tanaka *et al.*, 1988; Kilmartin & Reen, 2004). Il demeure aussi une possibilité que l'effet d'un stress thermique sur l'expression de saccine soit tissu-spécifique. Il serait donc intéressant d'effectuer ces études sur d'autres types de cellules, tel des neurones. Il faut aussi tenir compte du fait que des changements non détectables par nos méthodes auraient pu se produire dans la cellule. Des méthodes plus sensibles devront être utilisées pour étudier l'effet de stress cellulaires sur saccine.

L'augmentation de l'expression des protéines de stress thermiques suite à un stress cellulaire est sous le contrôle des «Heat shock transcription factors». Ces facteurs de transcription ont la capacité de lier les éléments de réponse au choc thermique (HSE) retrouvés au niveau des promoteurs des protéines de stress thermique, afin de stimuler l'expression des gènes correspondants. Étant donné que le promoteur du gène *SACS* n'a pas encore été identifié, la présence d'un ou plusieurs HSE dans sa séquence n'a pu être vérifiée. Il sera donc intéressant dans le futur d'analyser la composition du promoteur de saccine afin de vérifier la présence ou l'absence de HSE ou d'autres éléments pouvant indiquer un mode d'expression particulier pour saccine.

IV.5 ISOFORMES DE SACSINE

Aucun isoforme de saccine n'a été bien caractérisé à ce jour. Il y a cependant certaines évidences suggérant qu'il y aurait épissage alternatif du gène *SACS*. La séquence d'un isoforme potentiel de saccine (numéro d'accèsion NCBI: AK090599) a récemment été déposée dans la banque de données NCBI (Ota *et al.*, 2004). Elle provient d'une banque d'ADNc d'astrocytes humains. La séquence correspond à une partie de l'exon 8, l'exon 9 de *SACS*, suivit d'une région retrouvée dans la partie 3'UTR de l'exon 10 (Figure IV.1). La protéine correspondante aurait un poids moléculaire d'environ 37 kDa. Les analyses de séquences de ce transcrit n'ont pas révélé beaucoup d'information au sujet de son rôle cellulaire ou de sa localisation subcellulaire. Des études visant l'identification d'autres isoformes de *SACS* sont présentement en cours.

IV.6 DISTRIBUTION PHYLOGÉNÉTIQUE DE SACSINE

Le gène *SACS* a été identifié chez plusieurs mammifères; le macaque, la souris, et le rat. De plus, des orthologues de *SACS* ont été identifiés chez le poisson zèbre et le poisson Fugu. Les alignements de séquences des protéines codées par ces gènes homologues ont démontré une bonne conservation de la protéine, avec 61% d'identité et 76% de similarité entre la séquence humaine et celle de *Fugu rubripes*. Un homologue de *SACS* n'a pas été identifié chez certains organismes tels *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Saccharomyces cerevisiae* et *Schizosaccharomyces pombe*. Étant donné que le séquençage du génome de ces espèces est complet, il est probable que

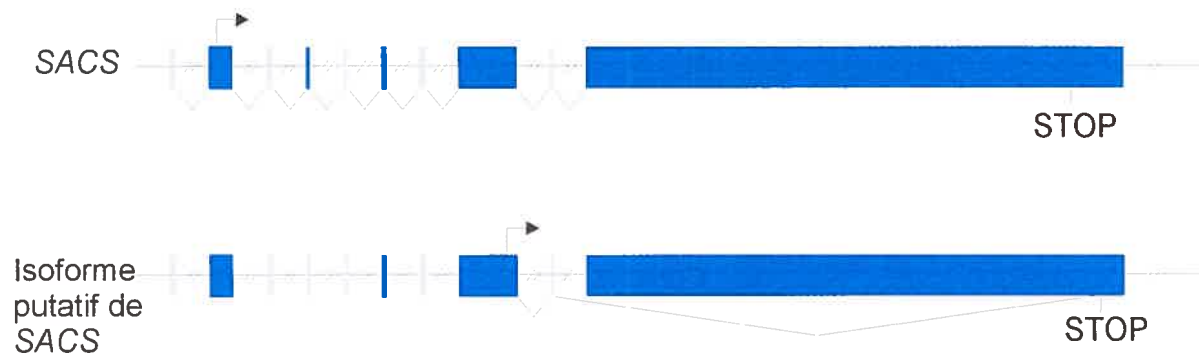


Figure IV.1 Épissage alternatif putatif du gène *SACS*. Les flèches indiquent les sites d'initiation de la transcription

le gène *SACS* y est absent. Il est cependant intéressant de noter qu'un homologue de saccine a été identifié chez *Arabidopsis thaliana* (numéro d'accèsion NCBI: NP_197702), une petite plante herbacée appartenant à la famille des crucifères. Cette protéine possède 16% d'identité et 36% de similarité avec saccine (Figure IV.2). La fonction cellulaire de l'homologue de saccine chez *A. thaliana* est inconnue. Cependant, elle a été classifiée comme étant un membre de la famille des protéines contenant un doigt de zinc C3HC4, étant donné la présence de ce motif dans la région C-terminale de la protéine. Les régions C-terminales de saccine et de son homologue végétal sont peu conservées comparativement au reste de la séquence. En effet, le motif doigt de zinc C3HC4 est absent chez la protéine humaine, tandis que les domaines DnaJ et HEPN sont absents dans la protéine de *A. thaliana*. La différence entre les régions C-terminales de ces protéines suggère un rôle cellulaire différent pour ces deux homologues. Il est cependant intéressant de noter que deux des trois régions présentant une similarité avec Hsp90 sont parmi les régions les mieux conservées. Les protéines ont donc probablement la même origine, mais elles sont probablement dérivées significativement tant au niveau structural que fonctionnel.

IV. 7 HYPOTHÈSES CONCERNANT LA FONCTION CELLULAIRE DE SACSINE

IV.7.1 Domaines Hsp90

Les analyses de comparaison de séquence ont révélé 3 régions dans la séquence de saccine qui sont similaires à la région N-terminale de la chaperone Hsp90 (figure IV.3). Les 3 régions Hsp90 de saccine partagent une grande similarité entre elles, ainsi qu'avec les régions équivalentes des orthologues de saccine retrouvés chez les vertébrés. De plus, ces régions sont parmi les régions les mieux conservées entre saccine et ses homologues

végétaux retrouvés chez *Arabidopsis thaliana* et *Oryza sativa* (Figure IV.2). Il est intéressant de noter que les acides aminés conservés entre saccine et Hsp90 sont parmi les mieux conservés entre les membres de la famille des Hsp90 (Gupta *et al.*, 1995). Les régions hautement conservées entre les Hsp90 de diverses espèces sont représentées sur la figure IV.3. La région N-terminale de Hsp90 contient un domaine de liaison à l'ATP. Il a été démontré que ce domaine partage des similarités avec une famille d'ATPases constituées entre autre de la DNA gyrase, la topoisomérase II, et MutL (Dunbrack *et al.*, 1997). Les domaines de liaison de l'ATP de ces protéines ont tous en commun 3 motifs (Bergerat *et al.*, 1997). Il a été proposé que ces motifs conservés seraient impliqués dans la liaison de l'ATP. Il est intéressant de noter que chaque domaine Hsp90 de saccine possède 2 de ces 3 motifs (Figure IV.4). Nous proposons donc que les 3 régions Hsp90 retrouvées chez saccine ont possiblement un rôle dans la liaison de l'ATP.

IV.7.2 Motif DnaJ

La région C-terminale de saccine possède une région similaire au domaine J des protéines de la famille Hsp40/DnaJ (Figure IV.5). La structure secondaire du domaine J de Hsp40/DnaJ est composée de 4 hélices alpha, dont 2 avec des orientations anti-parallèles liées par une boucle contenant les acides aminés hautement conservés HPD (Pellecchia *et al.*, 1996; Qian *et al.*, 1996). La structure cristalline du motif DnaJ de saccine (résidus 4307-4367, PDB:1IUR) a récemment été élucidée et déposée dans la base de données publiques «Protein Data Bank». La structure secondaire de ce motif est très semblable à celle de Hsp40 (Figure IV.5). De plus, la structure tertiaire contient 2 hélices anti-parallèles liées par une boucle renfermant les résidus HPD (Figure IV.6). Ces derniers sont

	<u>Motif B1</u>	<u>Motif B3</u>
TopoII	IFDELIVNAADNxx	TGGRNGYGARL
Hsp90	FLRELISNSSDAxD	QFGQFGVGFYS
MutL	xxKELIENSLDxA	TxGFRGEALxS
Seg1	ILKELIQNAEDAxx	KVGRFGIGFNS
Seg2	IFKELLQNADDANA	KVGKFGIGFNS
Seg3	MLKELLQNADDAKA	KTGQYGIGFNS

Figure IV.4 Motifs conservés entre les domaines de liaisons de l'ATP de Topoisomérase II, Hsp90, MutL et les 3 régions Hsp90 de saccine. Les résidus colorés en rose et bleu correspondent aux acides amines identiques et similaires, respectivement. Cette figure est basée sur une figure tirée de Bergerat et *al.*, 1997.

retrouvés chez tous les membres de la famille Hsp40/DnaJ. Il a été démontré que la substitution d'un seul de ces résidus aboli la fonction du domaine J (Wall *et al.*, 1994; Tsai & Douglas, 1996; Suh *et al.*, 1998). Au niveau fonctionnel, il a été suggéré que ces résidus seraient directement impliqués dans l'interaction de Hsp40 avec Hsp70 (Greene *et al.*, 1998). Plusieurs évidences suggèrent que l'interface de Hsp40 avec laquelle interagit Hsp70 serait constituée de certains résidus localisés dans l'hélice II, en plus des résidus HPD (Greene *et al.*, 1998; Tsai et Douglas, 1996). Une étude exhaustive par mutagenèse dirigée visant l'identification des acides aminés clés impliqués dans l'interaction du domaine J de Hsp40 avec Hsp70 a révélé l'importance des acides aminés Y24, R25, R26, K35, et F47 (Genevaux *et al.*, 2002). Ces résidus, ainsi que les résidus HPD, se retrouvent tous dans les hélices II et III, ainsi que dans la boucle qui les relie. Les chaînes latérales de ces acides aminés sont tous dirigées dans la même direction. Il a donc été proposé que ces résidus feraient partie de la surface de contact entre le domaine J de Hsp40 et Hsp70. Il est intéressant de noter que tous ces résidus, à l'exception de Y24, sont conservés dans le motif DnaJ de saccine. De plus, la structure tertiaire du motif DnaJ de saccine confirme que ces résidus sont placés dans un arrangement semblable au domaine J de Hsp40 (Figure IV.6). En se basant sur les similarités structurales, nous proposons que le motif DnaJ de saccine joue un rôle analogue au domaine J de Hsp40, soit le recrutement et la liaison de Hsp70 (Greene *et al.*, 1998).

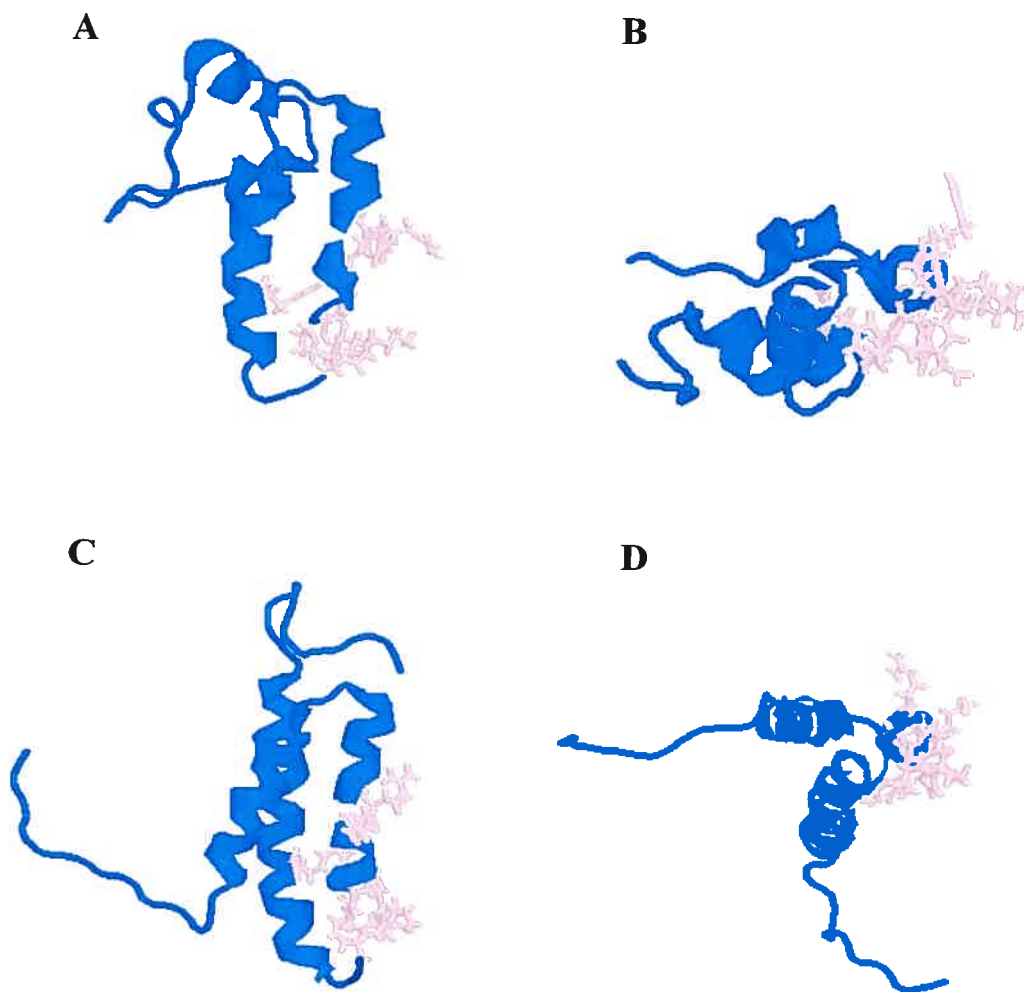


Figure IV.6 Structure du domaine J. (A et B) Structure tertiaire des résidus 1-76 de Hsp40 (PDB ID Hdj1). Les résidus essentiels identifiés par mutagenèse du domaine J sont représentés en rose. (C et D) Structure tertiaire des résidus 4307-4366 de saccine (PDB ID 1IUR). Les résidus analogues à ceux colorés en rose en A et B sont représentés en rose. Cette figure est basée sur une figure tirée de Genevaux *et al.*, 2002.

IV.7.3 Domaine HEPN

HEPN est un domaine retrouvé dans plusieurs protéines bactériennes et archaebactériennes. Ce domaine est également présent dans la région C-terminale de saccine. Il a été proposé que le domaine HEPN serait impliqué dans la liaison de nucléotides. Les évidences supportant cette hypothèse proviennent d'analyses comparatives démontrant que TM0613, une protéine à domaine HEPN retrouvée chez *Thermotoga maritima*, possède des similarités structurales avec le domaine C-terminal de KNTase. Cette dernière est une enzyme responsable de conférer une résistance bactérienne aux aminoglycosides. Elle possède deux domaines distincts, un domaine C-terminal et un domaine N-terminal. Il a été démontré que cette enzyme possède un site de liaison de nucléotide composé d'acides aminés provenant des deux domaines. TM0613 ne partage aucune similarité avec le domaine N-terminal de KNTase, contrairement à TM0614, une protéine codée par un gène chevauchant le gène TM0613. Il a donc été proposé que TM0613 et TM0614 auraient la capacité de former un complexe stable qui aurait la capacité de lier certains nucléotides de la même façon que KNTase.

Certaines évidences suggèrent qu'un groupe de gènes codant pour des protéines appartenant à la famille HEPN serait important pour l'hyperthermophilie de plusieurs espèces procaryotes (Makarova *et al.*, 2003). En effet, deux groupes de protéines orthologues, COG2250 et COG1895, ont été associés au phénotype de l'hyperthermophilie. Les protéines appartenant à ces groupes partagent tous des similarités de séquences avec le domaine HEPN de saccine. Il a été proposé que ces protéines appartiennent à une nouvelle classe de chaperones moléculaires.

IV.7.4 Interaction potentielle entre saccine et le récepteur LRP1b

Tout récemment, il a été démontré que saccine interagit directement avec le récepteur LRP1b (LDL receptor related protein 1b) (Marschang *et al.*, 2004). Ce dernier appartient à la famille des récepteurs LDL («low-density lipoprotein»). Les membres de cette famille sont impliqués dans plusieurs processus cellulaires, incluant le développement cérébral et la neurotransmission (Herz & Bock, 2002). L'interaction entre saccine et LRP1b a été démontrée en utilisant la technique de purification par affinité, en liant les domaines extracellulaires du récepteur à des billes d'agarose. Il est intéressant de noter que la plupart des ligands potentiels du récepteur qui ont été identifiés par cette méthode sont des chaperones moléculaires. Il a été suggéré que ce résultat reflète un besoin de chaperones moléculaires pour le repliement et la sécrétion des récepteurs LDL, ces derniers ayant une structure tertiaire complexe (Herz *et al.*, 2003). Parmi les ligands potentiels identifiés, on retrouve Nedd7, un membre de la famille DnaJ. L'interaction entre saccine et le récepteur LRP1b devra être confirmée *in vivo*.

IV.8 CONCLUSION & PERSPECTIVES

La présente étude marque le début de la caractérisation de saccine, la protéine déficiente chez les individus atteints de l'ARSACS. Dans un premier temps, la spécificité des anticorps Sac1 et Sac2 pour saccine a été démontrée à l'aide de tissus humains et murins. Cette étape était cruciale pour ce projet puisque plusieurs des expériences effectuées demandaient l'utilisation d'anticorps anti-saccine. Nos études visant l'analyse de l'expression de saccine ont démontré qu'elle est principalement exprimée au niveau du cerveau. Nous avons aussi démontré que saccine est absente dans les fibroblastes

d'individus atteints de l'ARSACS. Il sera toutefois important de déterminer si la protéine mutante est complètement dégradée dans les cellules de patients ou si elle a le potentiel de former des agrégats insolubles retrouvés dans les cellules de patients atteints d'autres maladies neurodégénératives connues.

Les résultats que nous avons obtenus à partir d'expériences de fractionnement subcellulaire et d'immunocytochimie suggèrent que salsine est localisée au niveau du cytoplasme et du réticulum endoplasmique. Il sera toutefois nécessaire de déterminer avec certitude la localisation subcellulaire de la protéine. Ceci pourrait exiger la production de nouveaux anticorps anti-salsine qui possèderaient une meilleure spécificité pour la protéine. Ces anticorps pourraient entre autre être utilisés pour effectuer des expériences d'immunohistochimie avec le cerveau. Il sera aussi important de déterminer si la population de salsine localisée au niveau du réticulum endoplasmique se retrouve dans le lumen de cette organelle, ou si elle est associée à la membrane.

Étant donné l'hypothèse que salsine aurait le rôle de chaperone moléculaire, nous avons analysé son niveau d'expression, ainsi que sa localisation subcellulaire, suite à un stress thermique. Nous n'avons pas observé de différence au niveau de l'expression ou de la localisation subcellulaire suite à un tel stress cellulaire. Il sera toutefois intéressant d'analyser l'effet d'autres stress cellulaires sur la protéine. De plus, il sera important de caractériser le promoteur de *SACS* afin de déterminer s'il contient un ou plusieurs éléments de réponse au choc thermique comme les protéines de stress thermique connues.

Afin de déterminer le rôle physiologique de salsine, nous devons identifier ses partenaires d'interaction. Lors de cette étude, ceci a été tenté en utilisant le système de double hybride en levure. Malgré plusieurs criblages d'une banque d'ADNc de cerveau

humain, aucun partenaire d'interaction n'a été révélé. Il serait donc important de rechercher les partenaires d'interaction en utilisant une approche différente. Une possibilité serait d'utiliser un système de double hybride dans des lignées de cellules de mammifères. Cette méthode pourrait permettre de contourner certaines limitations du système de double hybride en levure. L'utilisation d'une banque d'ADNc provenant d'un cerveau embryonnaire pourrait aussi mener à l'identification de partenaires cellulaires. On pourrait également rechercher les partenaires cellulaires de sarsine en utilisant une approche biochimique, telle une colonne d'affinité. Étant donné la présence du domaine DnaJ dans la séquence de sarsine, il faudra vérifier s'il y a une interaction directe entre sarsine et Hsp70.

Enfin, pour mieux caractériser le rôle physiologique de sarsine, il sera utile d'inactiver le gène soit en utilisant un modèle animal (souris knock-out) ou en effectuant des expériences de RNAi avec des cellules en cultures. La compréhension de la fonction cellulaire de Sarsine est la première étape vers le développement de traitements pour l'ARSACS et mènera possiblement à la compréhension d'autres maladies neurodégénératives.

Bibliographie

Arrigo, A.P., Suhan, J.P., and Welch, W.J. 1988. Dynamic changes in the structure and intracellular locale of the mammalian low-molecular-weight heat shock protein. *Mol Cell Biol* **8**: 5059-5071.

Bergerat, A., de Massy, B., Gabelle, D., Varoutas, P.C., Nicolas, A., and Forterre, P. 1997. An atypical topoisomerase II from Archaea with implications for meiotic recombination. *Nature* **386**: 414-417.

Bonfield, J.K., Smith, K., and Staden, R. 1995. A new DNA sequence assembly program. *Nucleic Acids Res* **23**: 4992-4999.

Bonfield, J.K., and Staden, R. 1996. Experiment files and their application during large-scale sequencing projects. *DNA Seq* **6**: 109-117.

Borkovich, K.A., Farrelly, F.W., Finkelstein, D.B., Taulien, J., and Lindquist, S. 1989. hsp82 is an essential protein that is required in higher concentrations for growth of cells at higher temperatures. *Mol Cell Biol* **9**: 3919-3930.

Bouchard, J.P., Barbeau, A., Bouchard, R., and Bouchard, R.W. 1978. Autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay. *Can J Neurol Sci* **5**: 61-69.

Bouchard, J.P., Barbeau, A., Bouchard, R., and Bouchard, R.W. 1979. Electromyography and nerve conduction studies in Friedreich's ataxia and autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay (ARSACS). *Can J Neurol Sci* **6**: 185-189.

Bouchard, J.-P. (1991) Recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay. In *Handbook of Clinical Neurology 16: Hereditary Neuropathies and Spinocerebellar Degenerations* (ed. De Jong, J.M.B.V.), pp. 451-459. Elsevier, Amsterdam.

Bouchard, M., and Langlois, G. 1999. Orthopedic management in autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay. *Can J Surg* **42**: 440-444.

Bouchard, R.W., Bouchard, J.P., Bouchard, R., and Barbeau, A. 1979. Electroencephalographic findings in Friedreich's ataxia and autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay (ARSACS). *Can J Neurol Sci* **6**: 191-194.

Buchner, J. 1999. Hsp90 & Co. - a holding for folding. *Trends Biochem Sci* **24**: 136-141.

Criscuolo, C., Banfi, S., Orio, M., Gasparini, P., Monticelli, A., Scarano, V., Santorelli, F.M., Perretti, A., Santoro, L., De Michele, G., et al. 2004. A novel mutation in SACS gene in a family from southern Italy. *Neurology* **62**: 100-102.

De Braekeleer, M. (1991). Hereditary disorders in Saguenay-Lac-Ct-Jean (Québec, Canada). *Hum. Hered.* **41**: 141-146.

- De Braekeleer, M., Giasson, F., Mathieu, J., Roy, M., Bouchard, J.P., and Morgan, K. 1993. Genetic epidemiology of autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay in northeastern Quebec. *Genet Epidemiol* **10**: 17-25.
- Drummond, I.A., and Steinhardt, R.A. 1987. The role of oxidative stress in the induction of *Drosophila* heat-shock proteins. *Exp Cell Res* **173**: 439-449.
- Dunbrack, R.L., Jr., Gerloff, D.L., Bower, M., Chen, X., Lichtarge, O., and Cohen, F.E. 1997. Meeting review: the Second meeting on the Critical Assessment of Techniques for Protein Structure Prediction (CASP2), Asilomar, California, December 13-16, 1996. *Fold Des* **2**: R27-42.
- El Euch-Fayache, G., Lalani, I., Amouri, R., Turki, I., Ouahchi, K., Hung, W.Y., Belal, S., Siddique, T., and Hentati, F. 2003. Phenotypic features and genetic findings in saccin-related autosomal recessive ataxia in Tunisia. *Arch Neurol* **60**: 982-988.
- Engert, J.C., Berube, P., Mercier, J., Dore, C., Lepage, P., Ge, B., Bouchard, J.P., Mathieu, J., Melancon, S.B., Schalling, M., et al. 2000. ARSACS, a spastic ataxia common in northeastern Quebec, is caused by mutations in a new gene encoding an 11.5-kb ORF. *Nat Genet* **24**: 120-125.
- Engert, J.C., Dore, C., Mercier, J., Ge, B., Betard, C., Rioux, J.D., Owen, C., Berube, P., Devon, K., Birren, B., et al. 1999. Autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay (ARSACS): high-resolution physical and transcript map of the candidate region in chromosome region 13q11. *Genomics* **62**: 156-164.
- Erlandsen, H., Canaves, J.M., Elsliger, M.A., von Delft, F., Brinen, L.S., Dai, X., Deacon, A.M., Floyd, R., Godzik, A., Grittini, C., et al. 2004. Crystal structure of an HEPN domain protein (TM0613) from *Thermotoga maritima* at 1.75 Å resolution. *Proteins* **54**: 806-809.
- Freeman, B.C., and Morimoto, R.I. 1996. The human cytosolic molecular chaperones hsp90, hsp70 (hsc70) and hdj-1 have distinct roles in recognition of a non-native protein and protein refolding. *Embo J* **15**: 2969-2979.
- Genevaux, P., Schwager, F., Georgopoulos, C., and Kelley, W.L. 2002. Scanning mutagenesis identifies amino acid residues essential for the in vivo activity of the *Escherichia coli* DnaJ (Hsp40) J-domain. *Genetics* **162**: 1045-1053.
- Giot, L., Bader, J.S., Brouwer, C., Chaudhuri, A., Kuang, B., Li, Y., Hao, Y.L., Ooi, C.E., Godwin, B., Vitols, E., et al. 2003. A protein interaction map of *Drosophila melanogaster*. *Science* **302**: 1727-1736.
- Gomez, C.M. 2004. ARSACS goes global. *Neurology* **62**: 10-11.

- Greene, M.K., Maskos, K., and Landry, S.J. 1998. Role of the J-domain in the cooperation of Hsp40 with Hsp70. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 6108-6113.
- Greenfield JG. (1954) The Spino-cerebeller degenerations. Oxford, Blackwell.
- Grieco, G.S., Malandrini, A., Comanducci, G., Leuzzi, V., Valoppi, M., Tessa, A., Palmeri, S., Benedetti, L., Pierallini, A., Gambelli, S., et al. 2004. Novel SACS mutations in autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay type. *Neurology* **62**: 103-106.
- Grynberg, M., Erlandsen, H., and Godzik, A. 2003. HEPN: a common domain in bacterial drug resistance and human neurodegenerative proteins. *Trends Biochem Sci* **28**: 224-226.
- Gucuyener, K., Ozgul, K., Paternotte, C., Erdem, H., Prud'homme, J.F., Ozguc, M., and Topaloglu, H. 2001. Autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay in two unrelated Turkish families. *Neuropediatrics* **32**: 142-146.
- Gupta, R.S. 1995. Phylogenetic analysis of the 90 kD heat shock family of protein sequences and an examination of the relationship among animals, plants, and fungi species. *Mol Biol Evol* **12**: 1063-1073.
- Harding, A.E. 1983. Classification of the hereditary ataxias and paraplegias. *Lancet* **1**: 1151-1155.
- Herz, J., and Bock, H.H. 2002. Lipoprotein receptors in the nervous system. *Annu Rev Biochem* **71**: 405-434.
- Herz, J., and Marschang, P. 2003. Coaxing the LDL receptor family into the fold. *Cell* **112**: 289-292.
- Hickman-Miller, H.D., and Hildebrand, W.H. 2004. The immune response under stress: the role of HSP-derived peptides. *Trends Immunol* **25**: 427-433.
- Hoetelmans, R.W., Prins, F.A., Cornelese-ten Velde, I., van der Meer, J., van de Velde, C.J., and van Dierendonck, J.H. 2001. Effects of acetone, methanol, or paraformaldehyde on cellular structure, visualized by reflection contrast microscopy and transmission and scanning electron microscopy. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* **9**: 346-351.
- Jacquier-Sarlin, M.R., Jornot, L., and Polla, B.S. 1995. Differential expression and regulation of hsp70 and hsp90 by phorbol esters and heat shock. *J Biol Chem* **270**: 14094-14099.
- Kilmartin, B., and Reen, D.J. 2004. HSP60 induces self-tolerance to repeated HSP60 stimulation and cross-tolerance to other pro-inflammatory stimuli. *Eur J Immunol* **34**: 2041-2051.

- Klockgether, T., and Evert, B. 1998. Genes involved in hereditary ataxias. *Trends Neurosci* **21**: 413-418.
- Koenig, M., Monaco, A.P., and Kunkel, L.M. 1988. The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell* **53**: 219-226.
- Koizumi, T., Negishi, M., and Ichikawa, A. 1993. Activation of heat shock transcription factors by delta 12-prostaglandin J2 and its inhibition by intracellular glutathione. *Biochem Pharmacol* **45**: 2457-2464.
- Landry, S.J. 2003. Structure and energetics of an allele-specific genetic interaction between dnaJ and dnaK: correlation of nuclear magnetic resonance chemical shift perturbations in the J-domain of Hsp40/DnaJ with binding affinity for the ATPase domain of Hsp70/DnaK. *Biochemistry* **42**: 4926-4936.
- Langelier, R., Bouchard, J.P., and Bouchard, R. 1979. Computed tomography of posterior fossa in hereditary ataxias. *Can J Neurol Sci* **6**: 195-198.
- Lehmann, C., Lim, K., Chalamasetty, V.R., Krajewski, W., Melamud, E., Galkin, A., Howard, A., Kelman, Z., Reddy, P.T., Murzin, A.G., et al. 2003. The HI0073/HI0074 protein pair from *Haemophilus influenzae* is a member of a new nucleotidyltransferase family: structure, sequence analyses, and solution studies. *Proteins* **50**: 249-260.
- Levinson, W., Oppermann, H., and Jackson, J. 1980. Transition series metals and sulfhydryl reagents induce the synthesis of four proteins in eukaryotic cells. *Biochim Biophys Acta* **606**: 170-180.
- Lindquist, S., and Craig, E.A. 1988. The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet* **22**: 631-677.
- Litt, M., and Luty, J.A. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am J Hum Genet* **44**: 397-401.
- Luo, Y., Batalao, A., Zhou, H., and Zhu, L. 1997. Mammalian two-hybrid system: a complementary approach to the yeast two-hybrid system. *Biotechniques* **22**: 350-352.
- Makarova, K.S., Wolf, Y.I., and Koonin, E.V. 2003. Potential genomic determinants of hyperthermophily. *Trends Genet* **19**: 172-176.
- Marschang, P., Brich, J., Weeber, E.J., Sweatt, J.D., Shelton, J.M., Richardson, J.A., Hammer, R.E., and Herz, J. 2004. Normal development and fertility of knockout mice lacking the tumor suppressor gene LRP1b suggest functional compensation by LRP1. *Mol Cell Biol* **24**: 3782-3793.

Mayr E (1954) Change of genetic environment and evolution. In: *Evolution as a Process* (eds Huxley J, Hardy AC, Ford EB), pp. 157-180. Allen & Unwin, London.

Mercier, J., Prevost, C., Engert, J.C., Bouchard, J.P., Mathieu, J., and Richter, A. 2001. Rapid detection of the saccin mutations causing autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay. *Genet Test* **5**: 255-259.

Morimoto, E.I., A. Tissières, and C. Georgopoulos, eds. (1994). The biology of heat shock proteins and molecular chaperones. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

Mrissa, N., Belal, S., Hamida, C.B., Amouri, R., Turki, I., Mrissa, R., Hamida, M.B., and Hentati, F. 2000. Linkage to chromosome 13q11-12 of an autosomal recessive cerebellar ataxia in a Tunisian family. *Neurology* **54**: 1408-1414.

Munro, S., and Pelham, H.R. 1987. A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell* **48**: 899-907.

Ogawa, T., Takiyama, Y., Sakoe, K., Mori, K., Namekawa, M., Shimazaki, H., Nakano, I., and Nishizawa, M. 2004. Identification of a SACS gene missense mutation in ARSACS. *Neurology* **62**: 107-109.

Ordway, J.M., Tallaksen-Greene, S., Gutekunst, C.A., Bernstein, E.M., Cearley, J.A., Wiener, H.W., Dure, L.S.t., Lindsey, R., Hersch, S.M., Jope, R.S., et al. 1997. Ectopically expressed CAG repeats cause intranuclear inclusions and a progressive late onset neurological phenotype in the mouse. *Cell* **91**: 753-763.

Ota, T., Suzuki, Y., Nishikawa, T., Otsuki, T., Sugiyama, T., Irie, R., Wakamatsu, A., Hayashi, K., Sato, H., Nagai, K., et al. 2004. Complete sequencing and characterization of 21,243 full-length human cDNAs. *Nat Genet* **36**: 40-45.

Pascual-Castroviejo, I., Pascual-Pascual, S.I., Viano, J., and Martinez, V. 2000. [Charlevoix-Saguenay type recessive spastic ataxia. A report of a Spanish case]. *Rev Neurol* **31**: 36-38.

Pedersen, L.C., Benning, M.M., and Holden, H.M. 1995. Structural investigation of the antibiotic and ATP-binding sites in kanamycin nucleotidyltransferase. *Biochemistry* **34**: 13305-13311.

Pellecchia, M., Szyperski, T., Wall, D., Georgopoulos, C., and Wuthrich, K. 1996. NMR structure of the J-domain and the Gly/Phe-rich region of the Escherichia coli DnaJ chaperone. *J Mol Biol* **260**: 236-250.

Pickart, C.M. 2004. Back to the future with ubiquitin. *Cell* **116**: 181-190.

- Prodromou, C., Roe, S.M., O'Brien, R., Ladbury, J.E., Piper, P.W., and Pearl, L.H. 1997. Identification and structural characterization of the ATP/ADP-binding site in the Hsp90 molecular chaperone. *Cell* **90**: 65-75.
- Prodromou, C., Roe, S.M., Piper, P.W., and Pearl, L.H. 1997. A molecular clamp in the crystal structure of the N-terminal domain of the yeast Hsp90 chaperone. *Nat Struct Biol* **4**: 477-482.
- Qian, Y.Q., Patel, D., Hartl, F.U., and McColl, D.J. 1996. Nuclear magnetic resonance solution structure of the human Hsp40 (HDJ-1) J-domain. *J Mol Biol* **260**: 224-235.
- Richards, C., Bouchard, J.P., Bouchard, R., and Barbeau, H. 1980. A preliminary study of dynamic muscle function in hereditary ataxia. *Can J Neurol Sci* **7**: 367-377.
- Richter, A., Morgan, K., Bouchard, J.P., Poirier, J., Mercier, J., Gosselin, F., and Melancon, S.B. 1993. Clinical and molecular genetic studies on autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay (ARSACS). *Adv Neurol* **61**: 97-103.
- Richter, A., Rioux, J.D., Bouchard, J.P., Mercier, J., Mathieu, J., Ge, B., Poirier, J., Julien, D., Gyapay, G., Weissenbach, J., et al. 1999. Location score and haplotype analyses of the locus for autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay, in chromosome region 13q11. *Am J Hum Genet* **64**: 768-775.
- Richter, A.M., Ozgul, R.K., Poisson, V.C., and Topaloglu, H. 2004. Private SACS mutations in autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay (ARSACS) families from Turkey. *Neurogenetics*.
- Richter, A. (2003) Autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay (ARSACS/SACS)-No longer a local disease. In *Genetics of Movement Disorders* (ed. Pulst M.S.), pp. 189-193. Elsevier Science, USA.
- Roychowdhury, H.S., and Kapoor, M. 1988. Ethanol and carbon-source starvation enhance the accumulation of HSP80 in *Neurospora crassa*. *Can J Microbiol* **34**: 162-168.
- Scriver, C.R. 2001. Human genetics: lessons from Quebec populations. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **2**: 69-101.
- Singh, G., and Lykke-Andersen, J. 2003. New insights into the formation of active nonsense-mediated decay complexes. *Trends Biochem Sci* **28**: 464-466.
- Su, A.I., Wiltshire, T., Batalov, S., Lapp, H., Ching, K.A., Block, D., Zhang, J., Soden, R., Hayakawa, M., Kreiman, G., et al. 2004. A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 6062-6067.

Suh, W.C., Burkholder, W.F., Lu, C.Z., Zhao, X., Gottesman, M.E., and Gross, C.A. 1998. Interaction of the Hsp70 molecular chaperone, DnaK, with its cochaperone DnaJ. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 15223-15228.

Tacchini, L., Pogliaghi, G., Radice, L., Anzon, E., and Bernelli-Zazzera, A. 1995. Differential activation of heat-shock and oxidation-specific stress genes in chemically induced oxidative stress. *Biochem J* **309 (Pt 2)**: 453-459.

Tanaka, K., Jay, G., and Isselbacher, K.J. 1988. Expression of heat-shock and glucose-regulated genes: differential effects of glucose starvation and hypertonicity. *Biochim Biophys Acta* **950**: 138-146.

Tissieres, A., Mitchell, H.K., and Tracy, U.M. 1974. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *J Mol Biol* **84**: 389-398.

Toby, G.G., and Golemis, E.A. 2001. Using the yeast interaction trap and other two-hybrid-based approaches to study protein-protein interactions. *Methods* **24**: 201-217.

Tsai, J., and Douglas, M.G. 1996. A conserved HPD sequence of the J-domain is necessary for YDJ1 stimulation of Hsp70 ATPase activity at a site distinct from substrate binding. *J Biol Chem* **271**: 9347-9354.

Wall, D., Zylicz, M., and Georgopoulos, C. 1994. The NH₂-terminal 108 amino acids of the *Escherichia coli* DnaJ protein stimulate the ATPase activity of DnaK and are sufficient for lambda replication. *J Biol Chem* **269**: 5446-5451.

Wanker, E.E., Rovira, C., Scherzinger, E., Hasenbank, R., Walter, S., Tait, D., Colicelli, J., and Lehrach, H. 1997. HIP-I: a huntingtin interacting protein isolated by the yeast two-hybrid system. *Hum Mol Genet* **6**: 487-495.

Welch, W.J., and Suhan, J.P. 1986. Cellular and biochemical events in mammalian cells during and after recovery from physiological stress. *J Cell Biol* **103**: 2035-2052.

Zoghbi, H.Y., and Orr, H.T. 2000. Glutamine repeats and neurodegeneration. *Annu Rev Neurosci* **23**: 217-247.