



**Étude de la structure et de la fonction de la petite protéine de choc thermique
DmHsp27**

Thèse

Mohamed Taha Moutaoufik

Doctorat en biologie cellulaire et moléculaire
Philosophiae Doctor (Ph. D.)

Québec, Canada

© Mohamed Taha Moutaoufik, 2017

**Étude de la structure et de la fonction de la petite protéine de choc thermique
DmHsp27**

Thèse

Mohamed Taha Moutaoufik

Sous la direction de :

Robert M. Tanguay, directeur de recherche

Résumé

Les petites protéines de choc thermique (sHsps : small heat shock proteins) sont présentes en nombre variable dans tous les organismes. Le génome de *Drosophila melanogaster* encode 12 sHsps, avec une expression au cours de développement, une localisation intracellulaire et une spécificité de substrats différents. DmHsp27 est l'une des rares sHsps à avoir une localisation nucléaire avant et après un choc thermique. Cette localisation nucléaire est inhabituelle, d'autant plus qu'aucune fonction spécifique de cette protéine n'a encore été identifiée. Les mécanismes responsables de la localisation nucléaire de DmHsp27 ainsi que sa probable fonction dans le noyau restent peu connus.

L'étude des orthologues de DmHsp27 chez les insectes a permis de déterminer que la localisation nucléaire n'est pas spécifique à DmHsp27 et d'autres sHsps chez les insectes présentent le même signal de localisation nucléaire que DmHsp27. Le réseau d'interaction de DmHsp27 nous laisse croire que cette protéine ne joue pas seulement le rôle de chaperon moléculaire, mais qu'elle est probablement impliquée dans différents processus nucléaires.

Au niveau structurel, contrairement aux sHsps chez les métazoaires, DmHsp27 forme deux populations d'oligomères non en équilibre. Des mutations indépendantes de trois arginines hautement conservées au niveau du domaine alpha-cristallin (R122, R131 et R135) à la glycine affectent l'oligomérisation par formation d'une seule population de grand poids moléculaire. *In vitro*, l'activité de chaperon de DmHsp27WT est comparable à celle de ses deux populations isolées et à celle des mutants R122G, R131G et R135G utilisant la luciférase comme substrat. Cependant, dans un essai de protection contre l'aggrégation de l'insuline, l'activité de chaperon de DmHsp27 est inférieure à celle des mutants R122G et R131G.

Une stratégie de délétion et mutation a été utilisée pour étudier le rôle de la région N-terminale sur l'oligomérisation et la fonction chaperon de DmHsp27. Tel que déterminé par chromatographie d'exclusion et gel natif, des mutations au niveau de F29, G30 et G32 présentent des structures oligomériques différentes de celle du type sauvage.

Aucun de ces mutants sauf l'élimination complète de la région N-terminale n'a montré une perte d'activité chaperon, suggérant un rôle important dans la reconnaissance et liaison de substrat. Étonnamment, les deux glycines (G30 et G32) conservées chez les orthologues de DmHsp27 agissent comme régulateurs négatifs de l'activité chaperon; leurs mutations améliorent grandement la prévention d'agrégation d'insuline. La différence du rendement de la protéine sauvage et des mutants G30R et G32R à prévenir l'agrégation de l'insuline à 20 °C et à 42 °C a permis d'établir un lien entre la structure et la fonction chaperon de DmHsp27 et de définir le mode d'action de DmHsp27 suite au stress thermique.

En résumé, cette étude a permis de caractériser DmHsp27 et ses mutants au niveau du domaine alpha cristallin et de la région N-terminale et a donné un aperçu d'un nouveau mécanisme de protection contre l'agrégation des sHsps. Le rôle de chaperon moléculaire joué par DmHsp27 et son induction durant le développement embryonnaire laisse cependant présumer que cette protéine remplit d'autres fonctions cellulaires importantes.

Abstract

Small heat shock proteins are present in varying numbers in all organisms. In *Drosophila melanogaster* there are 12 sHsps, which have distinctive developmental expression patterns, intracellular localizations and substrate specificities. DmHsp27 is one of the very few sHsps that have a nuclear localization before and after heat shock. This nuclear localization is unusual, especially since no specific function has yet been identified. The mechanisms responsible for the nuclear localization of DmHsp27 and its function in the nucleus remain poorly understood.

First, the study of DmHsp27 orthologs helped to determine that nuclear localization is not specific to DmHsp27 and other sHsps in insects have the same nuclear localization signal as DmHsp27. The DmHsp27 interaction network leads to believe that this protein does not only play the role of chaperone, but it is also involved in various nuclear processes.

Second, unlike metazoan sHsps, DmHsp27 forms two populations of oligomers not in equilibrium. Mutations of highly conserved arginine residues in the ACD domain in mammalian sHsps has been reported to be associated with protein conformational defects and intracellular aggregation. Independent mutation of three highly conserved arginines (R122, R131 and R135) to glycine in DmHsp27 results in only one population of higher molecular weight form. *In vitro*, the chaperone-like activity of wild type DmHsp27 was comparable with that of its two isolated populations and to the single population of the R122G, R131G and R135G using luciferase as substrate. However, using insulin, the chaperone-like activity of wild type DmHsp27 was lower than that of R122G and R131G mutants.

Finally, we established the importance of the N-terminal region for oligomerization and we investigated the heat activation under *in vitro* experimental conditions using size exclusion chromatography and gradient native gels electrophoresis. By deletion strategy, we have examined the role of the N-terminal region and delineated a motif (FGFG) important for the oligomeric structure and chaperone-like activity of this sHsp. Deletion of the full N-terminal domain, resulted in total loss of chaperon-like

activity; intriguingly deletion of the (FGFG) at position 29 to 32 or single mutation of G30R and G32R enhanced oligomerization and chaperoning capacity under non heat shock conditions using the insulin assay suggesting the importance of this site for chaperone activity. Unlike mammalian sHsps heat activation of DmHsp27 leads to enhanced dissociation/association of oligomers to form large structures about 1000 kDa. We suggest a new mechanism of heat activation for DmHsp27.

In summary, this study characterized DmHsp27 and mutant in the alpha crystallin domain and the N-terminal region and provided an overview of a new protection mechanism. The role played by DmHsp27 as molecular chaperone and its induction during embryonic development, suggest that this protein may perform other important cellular functions.

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	v
Table des matières.....	vii
Liste des tableaux.....	xi
Liste des figures.....	xii
Liste des abréviations.....	xiv
Remerciements.....	xx
Avant-Propos.....	xxii
Chapitre 1 : Introduction.....	1
1.1 Historique de la réponse au stress.....	3
1.2 Les petites protéines de choc thermique (sHsps).....	3
1.2.1 Evolution des sHsps.....	4
1.2.2 Structure des sHsps.....	7
1.2.3 Reconnaissance des substrats et modèle d'activité des sHsps.....	11
1.2.4 Régulation de l'activité des sHsps.....	16
1.2.5 Activités des sHsps dans les fonctions biologiques et pathologiques.....	20
1.3 La réponse au stress chez <i>Drosophila melanogaster</i>	26
1.3.1 Les sHsps chez <i>Drosophila melanogaster</i>	26
1.3.2 Localisation intracellulaire de DmsHsps.....	28
1.3.3 Expression des sHsps au cours du développement de la drosophile.....	31
1.3.4 Induction des DmsHsps lors du stress.....	34
1.3.5 Modification post-traductionnelles des sHsps de drosophile.....	35
1.3.6 Activités biologiques des DmsHsps.....	35
Problématique et objectifs.....	37
Chapitre 2 : Analyses des sHsps nucléaires chez les insectes.....	39
2.1 Introduction.....	40
2.2 Matériel et méthodes.....	41

2.2.1 Extraction des séquences de petites protéines de choc thermique nucléaire chez les insectes	41
2.2.2 Alignement et LOGOS	41
2.2.3 Phylogénétique moléculaire.....	41
2.3 Résultats et discussion	42
2.3.1 Les sHsps nucléaires chez les insectes.....	43
2.3.2 Analyse des sHsps nucléaires chez les insectes.....	46
2.3.3 Evolution des sHsps nucléaires chez les insectes	51
2.3.4 Les fonctions de DmHsp27 dans le noyau.....	53
2.4 Conclusion	55
Références.....	56

Chapitre 3 : Oligomérisation et activité chaperon de la petite protéine de choc thermique DmHsp27 chez <i>Drosophila melanogaster</i> et de trois mutants arginine dans le domaine alpha-cristallin.....	60
--	----

Avant-Propos	61
Résumé.....	63
Abstract.....	64
3.1 Introduction.....	65
3.2 Materials and methods	66
3.2.1 Cloning and expression of recombinant DmHsp27	66
3.2.2 Purification of recombinant DmHsp27.....	66
3.2.3 Fluorescence spectroscopy.....	67
3.2.4 Analytical SEC.....	67
3.2.5 Native Gel Electrophoresis	68
3.2.6 Luciferase heat-induced aggregation assay	68
3.2.7 Insulin DTT-induced aggregation assay	68
3.2.8 Molecular modeling.....	68
3.2.10 Dynamic light scattering.....	69
3.2.11 Cell culture and transfection conditions	69
3.2.12 Immunofluorescence analyses	69
3.3 Results.....	71
3.3.1 Dimerization of DmHsp27.....	71
3.3.2 Thermal transition of DmHsp27	73
3.3.3 Dissection of DmHsp27 wild type.....	74
3.3.4 Study of three arginines in ACD:.....	78
3.3.5 Chaperon-like activity:.....	81
3.4 Discussion.....	86
3.5 Acknowledgments.....	91
3.6 References.....	92

Chapitre 4 : Analyse fonctionnelle de la région N-terminale de la petite protéine de choc thermique DmHsp27	97
---	----

Avant-Propos	98
Résumé.....	100
Abstract.....	101
4.1 Introduction.....	102
4.2 Results.....	104
4.2.1 Effect of Serine phosphorylation on oligomeric structure and localization of DmHsp27	104
4.2.2 Further characterization of NTR in DmHsp27	106
4.2.3 Dissecting the FGFG (29-32) motif.....	109
4.2.4 Heat activation of DmHsp27	114
4.3 Discussion.....	118
4.4 Material and methods.....	122
4.4.1 Cloning, expression and purification of recombinant DmHsp27.....	122
4.4.2 Analysis of the quaternary structure by size exclusion chromatography.....	123
4.4.3 Analysis of the quaternary structure by native gel electrophoresis.....	124
4.4.4 Chaperone-like activity.....	124
4.4.5 Cell culture, transfection conditions and immunofluorescence analyses.....	124
Acknowledgements.....	126
Contributions	126
Competing interests	126
References.....	127
 Chapitre 5 : Discussion générale et perspectives.....	 133
 5.1 DmHsp27 n'est pas le seule sHsp nucléaire chez les insectes.....	 134
5.2 Oligomérisation de DmHsp27 : Une sHsp distincte.....	136
5.3 Alpha cristallin de DmHsp27 : Un domaine bien conservé au niveau structural et fonctionnel	138
5.4 Région N-terminale de DmHsp27 : une région critique pour la structure et l'activité chaperon.....	139
5.5 Activation thermique de DmHsp27 : relation structure et fonction.....	142
5.6 Conclusion	145
Références.....	146
 Annexe : Matériel et méthodes	 175
 A.1 Clonage, mutagenèse dirigée expression et purification des vecteurs.....	 176
A.2 Expression et extraction des protéines recombinantes.....	180
A.3 Séparation et analyse par chromatographie d'exclusion (ou SEC pour Size Exclusion Chromatography).....	183
A.4 SDS-PAGE électrophorèse et western blot.....	184
A.5 Électrophorèse native.....	185
A.6 Essais in vitro de prévention d'agrégation de substrats	186
A.6.1 Les conditions de stress thermique	186
A.6.2 Les conditions de stress réductifs.....	187

A.8 La diffusion dynamique de la lumière (ou DLS pour Dynamic Light Scattering)	189
A.9 Modélisation moléculaire par homologie	190
A.10 Culture cellulaire et transfection	190
A.11 Immunofluorescence indirecte	191

Liste des tableaux

Chapitre 1

Tableau 1-1: Distribution taxonomique des sHsps.	5
Tableau 1-2: Les mutations au niveau des sHsps et les maladies associées chez l'humain.	25
Tableau 1-3: Les sHsps chez <i>Drosophila melanogaster</i>	31

Chapitre 2

Tableau 2-1 : Les sHsps nucléaires chez les insectes.	45
Tableau 2-2 : Interactions de DmHsp27.	55

Chapitre 4

Tableau 4-1: Primers sequences used to construct DmHsp27 NTR mutants.	123
--	-----

Annexe

Tableau A-1: Amorces utilisées lors du clonage et mutagenèse des différents mutants DmHsp27.	179
Tableau A-2: Caractéristiques des anticorps utilisés en western blot.	185

Liste des figures

Chapitre 1

Figure 1.1: Organisation des sHsps.	6
Figure 1.2 : Dimérisation des sHsps.	8
Figure 1.3 : Oligomérisation des sHsps.	9
Figure 1.4 : Mécanisme de fonctionnement des sHsps.	13
Figure 1.5 : Alignement des séquences des petites protéines de stress chez <i>Drosophila melanogaster</i>	28

Chapitre 2

Figure 2.1 : Alignement de séquence des petites protéines de stress chez les insectes. ...	48
Figure 2.2 : Analyses des petites protéines de stress nucléaires chez les insectes.	50
Figure 2.3 : Analyse phylogénétique des sHsps nucléaires d'insectes par la méthode de maximum de vraisemblance.	52

Chapitre 3

Figure 3.1: Dimeric interface of DmHsp27.	72
Figure 3.2: Thermal transition of DmHsp27 wild type.	74
Figure 3.3: SEC analysis of DmHsp27 WT.	75
Figure 3.4: Complexes of DmHsp27 WT.	78
Figure 3.5: Analysis of three-conserved arginine in ACD.	79
Figure 3.6: SEC analysis of DmHsp27 ACD mutants.	80
Figure 3.7: Effect of DmHsp27, its two peaks and ACD mutants on the heat-induced aggregation of luciferase.	83
Figure 3.8: Effect of DmHsp27, its two peaks and ACD mutants on reduction-induced aggregation of insulin.	85
Figure 3.9: Electrostatic surfaces and charge distribution of DmHsp27WT and its ACD mutants.	89
Figure 3.10: Supplementary Figure.	90

Chapitre 4

Figure 4.1: Phosphorylation effect of on oligomerization and localization of DmHsp27.	105
Figure 4.2: Sequence analysis of the N-terminal region of different sHsp.	108
Figure 4.3: N-Terminal region is essential for oligomerization and chaperon-like activity.	109
Figure 4.4: Effects of FGFG residues in oligomerization and chaperon-like activity.	112
Figure 4.5: Size exclusion chromatography analysis of DmHsp27 N-terminal mutants F29A, F29Y, G30R and G32R.	113
Figure 4.6: Study of heat activation of DmHsp27 and its FGFG mutants.	115
Figure 4.7: Supplementary figure.	116

Chapitre 5

Figure 5.1: Le mécanisme d'activation de DmHsp27.	144
--	-----

Annexe

Figure A.1: Carte des vecteurs.....	177
Figure A.2: Stratégie de mutagenèse de DmHsp27WT.....	178
Figure A.3: Test d'inductibilité des mutants.....	181
Figure A.4: Les différentes étapes de purification de DmHsp27.....	182
Figure A.5: Gel SDS 12% pour contrôle des différentes étapes de purification.	183
Figure A.6: Principe de la prévention d'agrégation par les sHsps de la luciférase induite par la chaleur <i>in vitro</i>	187
Figure A.7: Principe de la prévention d'agrégation par les sHsps de l'insuline induite par la réduction des ponts disulfures <i>in vitro</i>	188

Liste des abréviations

°C : Degré Celsius

° : Degré

% Pd : Pourcentage de polydispersité

µg : Microgramme

µl : Microlitre

µm : Micromètre

µs : Microseconde

Å : Angström

ACD : Le domaine alpha-cristallin

Ack : Activated Cdc42 kinase

AD : Autosomique dominant

ADN : Acide désoxyribonucléique

AR : Autosomique récessif

ARID : AT-rich interaction domain

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : Acide ribonucléique messenger

ARNt : Acide ribonucléique de transfert

ATP : Adénosine triphosphate

Bag3 : Bcl2-associated athanogene 3

BLAST : Basic local alignment search tool

BSA : Bovine serum albumin

CAM : C-terminal Anchoring Module

CMT2 : Maladie de Charcot-Marie-Tooth type 2

CTE : Extention C-terminale

DAPI : Dihydrochlorure de 4',6-diamidino-2-phénylindole

DCM : Cardiomyopathie dilatée

DHMN : Neuropathie motrice héréditaire distale

DLS : Dynamic light scattering

DM : Myopathie distale

DmsHsps : *Drosophila melanogaster* small Heat shock proteins

DRM : Myopathie avec surcharge en desmine

DTT : Dithiothréitol

FBS : Sérum de bovin fœtal

Fwd : forward

h : Heure

Hid : Head involution defective

HSC70 : Heat shock cognate 70

Hsps : Heat shock proteins

IPTG : Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside

kDa : Kilodalton

LB : Luria-Bertani

mAU : Milli absorbance units

MDM2 : Mouse double minute 2 homolog

MFM : myopathies myofibrillaires

Mg²⁺ : magnésium

min : minute

ml : millilitre

mm : millimetre

mM : Millimolaire

MUSCLE : Multiple Sequence Comparison by Log- Expectation

nm : nanomètre

MN : neuropathie motrice

NEB : New England Biolabs

Ni-NTA : *nickel*-nitrilotriacetic acid

NLS : Nuclear Localization Signal

NTR : La région N-terminale

PBS : Tampon phosphate salin

PCR : Réaction en chaîne par polymérase

pg : picogramme

PMSF : Phenylmethylsulfonyl fluoride

PN : neuropathie périphérique

Rev : Reverse

Rh : Hydrodynamic Radius

RMN : résonance magnétique nucléaire

ROS : Dérivé réactif de l'oxygène

s : Second

SD : déviation standard

SDS : Sodium dodecyl sulfate

SEC : Chromatographie d'exclusion

sHsps : small Heat shock proteins

SUMO : Small ubiquitin-like modifier

UPS : Système ubiquitine-protéasome

V : Volt

V_0 : Le volume mort

Je dédie cette thèse à mon oncle, Abdelaatti, qu'il trouve ici le résultat de longues années de sacrifices et de précieux conseils qui m'ont aidé à avancer dans la vie. Merci pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutien permanent. Reçois à travers ces mots l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude.

L'esprit scientifique nous interdit d'avoir une opinion sur des questions que nous ne comprenons pas, sur des questions que nous ne savons pas formuler clairement. Avant tout, il faut savoir poser des problèmes. Et quoi qu'on dise, dans la vie scientifique, les problèmes ne se posent pas d'eux-mêmes. C'est précisément ce sens du problème qui donne la marque du véritable esprit scientifique. Pour un esprit scientifique, toute connaissance est une réponse à une question. S'il n'y a pas eu de question, il ne peut y avoir connaissance scientifique. Rien ne va de soi. Rien n'est donné. Tout est construit.

La formation de l'esprit scientifique. Contribution à une psychanalyse de la connaissance objective (Gaston Bachelard, 1977).

Remerciements

Ce travail s'est déroulé au laboratoire du professeur Robert M Tanguay à l'institut de biologie intégrative et des systèmes (IBIS). La réalisation de ce projet fut une expérience enrichissante à tous les niveaux. Je remercie chaleureusement l'ensemble des personnes qui m'ont accompagné tout au long.

Je voudrais d'abord remercier le Pr Robert M Tanguay de m'avoir accueilli dans son laboratoire, de m'avoir donné les moyens pour suivre ma formation et surtout pour toutes les connaissances qu'il a pu me transmettre durant mon séjour. Qu'il trouve ici toute ma gratitude et toute ma profonde reconnaissance.

Je tiens plus particulièrement à exprimer mes remerciements au Dre Geneviève Morrow pour sa disponibilité, pour les intenses et rationnelles discussions et de m'avoir encadré au laboratoire et sur la réflexion scientifique malgré son occupation et temps chargés. Je lui suis très reconnaissant.

Je tiens à remercier sincèrement Dr. Halim Maaroufi, qui s'est toujours montré à l'écoute et très disponible tout au long de la réalisation de ce projet, ainsi pour les outils, l'aide et le temps qu'il a bien voulu me consacrer.

Je remercie vivement les membres de jury qui se compose de mon directeur de recherche, du Dre Serena Carra, du Dre Josée N. Lavoie et du Pr Edouard W Khandjian d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Je remercie vivement le Dr Rachid El Fatimy pour ses précieux conseils tout au long de mon doctorat et son soutien dans les moments de doutes.

Je tiens à souligner la précieuse compagnie de tous mes collègues de laboratoire et de l'IBIS ; Dre Ornella Pellerito (mama), Dre Francesca Angileri (my friend), les boys (Vincent Roy et Maxime Bourrelle-Langlois) ainsi qu'Idalia Castro, Afrooz Dabaghizadeh et Dr Luca Freschi. Merci pour votre amitié et toutes les discussions, les conseils et l'aide de votre part. C'était *le fun* de travailler à vos côtés.

Je voudrais également remercier Jérémie Hamel (laboratoire Dr Ron Shi) pour avoir donné de son temps et sa connaissance à l'opération de la chromatographie d'exclusion.

Financièrement, je voudrais remercier le regroupement québécois de recherche sur la

fonction, la structure et l'ingénierie des protéines (PROTEO) pour m'avoir octroyé une bourse d'étude. Merci également au conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG) d'avoir financé cette étude et au Fonds de recherche du Québec - Nature et technologies (FQRNT) pour la bourse du programme de stages internationaux

Je remercie Dre Stéphanie Finet qui m'a accueilli dans son laboratoire à l'institut de minéralogie, de physique des matériaux et de cosmochimie (IMPMC), université Pierre-et-Marie-Curie (Paris, France). Merci à tous les membres de l'IMPMC, merci à Fériel Skouri-Panet, Céline Férard et Mélanie Poinot pour l'accueil, le temps, l'amitié et l'encadrement. Merci à Ahmed Haouz de la Plate-forme de cristallographie à l'Institut Pasteur, Paris. Je remercie également Pr Harm Kampinga de l'University Medical Center Groningen (University of Groningen) Pays-Bas de m'avoir accueilli dans son laboratoire et de m'avoir initié aux essais chaperons *in vivo* (DANKU). Merci à Maria Eaarde-Verhagen et à Eduardo de Mattos pour l'aide et l'amitié à Groningen.

J'aimerais remercier ma famille et mes amis pour le support, les encouragements et la compréhension. Un grand merci à mon frère Ahmed Amine à mes amis Ahmed, Lahcen et Fouad. Et en fin, je remercie avec beaucoup d'amour ma blonde pour le soutien inconditionnel qui m'a permis de supporter les moments difficiles, merci Hafsa d'avoir cru en moi et merci pour ton amour.

Avant-Propos

Dans le cadre de ce projet de doctorat, j'ai eu la chance de travailler à l'institut de biologie intégrative et des systèmes (IBIS) de l'Université Laval sur les mécanismes de la réponse au stress en étudiant la structure et la fonction de la petite protéine de choc thermique DmHsp27. J'ai contribué à plusieurs projets dans différents domaines de la recherche vu la pluridisciplinarité de l'IBIS, dont certains ont mené à la publication d'articles.

Dans un premier temps, j'ai cloné DmHsp27 dans les vecteurs pETHSUK et pcDNA, ensuite j'ai mis en place une technique d'extraction des protéines recombinantes et j'ai étudié les profils oligomérique de DmHsp27 et de ses différents mutants. Par la suite, j'ai passé un stage de formation sur les techniques bio-physiques au laboratoire de Dre Stéphanie Finet à l'institut de minéralogie, de physique des matériaux et de cosmochimie, université Pierre et Marie Curie, Paris, France. Notre collaboration a donné deux articles. Le premier (chapitre 3) publié dans le journal Cell Stress and Chaperones (Moutaoufik et al., 2016).

- Contribution des Auteurs

Mohamed Taha Moutaoufik : J'ai réalisé toutes les expériences présentées dans cet article, du clonage, mutagenèse, production, purification, aux analyses biochimiques, bioinformatiques et biophysiques. J'ai également rédigé l'article sous sa forme publiée.

Halim Maaroufi : Aide pour la figure 9

Céline Férard : Aide pour la figure 2 A, B et C

Stéphanie Finet, Geneviève Morrow et Robert M Tanguay : Ils ont supervisé les travaux et ont fait une revision critique du manuscrit.

Le deuxième (chapitre 4) prêt pour soumission

- Contribution des Auteurs

Mohamed Taha Moutaoufik : J'ai réalisé toutes les expériences présentées dans cet article, clonage, mutagenèse, production et purification des protéines, aux analyses

biochimiques. J'ai également rédigé l'article sous sa forme finale.

Stéphanie Finet, Geneviève Morrow et Robert M Tanguay : ont supervisé les travaux et ont fait une lecture critique du manuscrit.

Enfin, j'ai mené avec l'aide de Tasha Stoltz, stagiaire d'été en 2013 au baccalauréat, un projet sur l'étude de la fonction chaperon *in vivo* de DmHsp27. Pour ce même projet j'ai été accueilli au laboratoire du Dr. Harm Kampinga à University Medical Center Groningen, Pays-bas. Ces travaux sont toujours en cours et ne sont pas présentés ici dans les résultats.

Chapitre 1 : Introduction

Les protéines sont des constituants essentiels de tous les organismes qui participent à tous les processus biologiques. Afin de remplir des fonctions spécifiques dans la cellule, les protéines doivent adopter une structure tridimensionnelle unique. Le processus, qui à partir d'une chaîne de polypeptide synthétisé conduit à une structure native, est appelé repliement des protéines (Dobson and Karplus, 1999). Au début des années 60, les travaux de Christian Anfinsen sur la ribonucléase A ont montré que le repliement des protéines est un processus réversible et que les protéines sont capables d'adopter leurs conformations natives spontanément. Il a conclu que la structure tridimensionnelle d'une protéine est déterminée par sa structure primaire, codée dans l'ADN (Anfinsen et al., 1961, Anfinsen, 1973). Ceci est applicable au repliement des protéines *in vitro* dans la plupart des cas sous forme de protéines isolées dans des solutions tampons diluées, repliées et généralement dans leur structure native, biologiquement active de façon spontanée et sans assistance (Jaenicke, 1987).

Le repliement des protéines *in vivo* dans la cellule diffère considérablement de celui *in vitro*. Le cytosol est un environnement très visqueux et surpeuplé présentant des concentrations élevées de protéines et un grand nombre d'autres macromolécules provoquant ce qu'on appelle « l'effet de volume exclu ». Dans ces conditions, les interactions intermoléculaires deviennent fortement favorisées (Ellis, 2001, Ellis and Minton, 2006). Le mécanisme par lequel les protéines sont synthétisées nécessite certaines mesures pour aider et assurer le repliement correct des polypeptides nouvellement synthétisés à l'état natif (Frydman, 2001). En outre, différents types de contraintes peuvent conduire au mal repliement de protéines ou à l'agrégation, ce qui pose une menace pour tous les organismes (Richter et al., 2010, Tyedmers et al., 2010). Les cellules ont mis au point un système de contrôle de la qualité des protéines pour maintenir l'intégrité du protéome. L'homéostasie est atteinte par plusieurs centaines de protéines intégrées dans un réseau complexe, y compris les protéines qui agissent pour aider au repliement des protéines, qu'on appelle les chaperons moléculaires, ou pour éliminer les protéines anormales ou agrégées par la dégradation protéolytique médiée par deux voies: le système ubiquitine-protéasome (UPS) et l'autophagie (Balch et al., 2008, Hartl et al., 2011, Minoia et al., 2014).

1.1 Historique de la réponse au stress

La réponse au stress a été initialement observée chez la drosophile par Ferruccio Ritossa en 1962 via l'apparition de gonflements sur les chromosomes polytènes des glandes salivaires, suite à l'exposition au choc thermique (Ritossa, 1962). Ces gonflements étaient le site d'une transcription intense de l'acide ribonucléique messager (ARNm) codant pour des protéines impliquées dans la réponse au stress, appelées les protéines de choc thermique (Hsps pour Heat shock proteins) ou chaperons dont le résultat est une induction massive de ces protéines (Ritossa, 1962, Tissieres et al., 1974, Pelham, 1982, Wu, 1984, Parker and Topol, 1984, Ashburner, 1970, Lindquist, 1986, Nover and Scharf, 1984). La réponse au choc thermique permet donc d'assurer la survie de la cellule qui en raison du stress présenterait des lésions irréversibles conduisant à la mort cellulaire. Les Hsps sont alors capables de reconnaître les protéines mal repliées et d'empêcher leur agrégation. En plus elles peuvent redonner à ces protéines mal repliées une conformation tridimensionnelle adéquate (Burel et al., 1992). Cette fonction de chaperon moléculaire confère aux Hsps une fonction de première ligne de défense et un rôle essentiel dans la protection lors du métabolisme cellulaire de routine et suite à un stress.

Les Hsps majeures ont été identifiées par des expériences de marquage avec la méthionine marquée au soufre 35 en utilisant les glandes salivaires de Drosophile (Tissieres et al., 1974). Les Hsps ont été divisées par la suite en cinq familles majeures, selon leur poids moléculaire et leur homologie de séquence à savoir : Hsp100/ClpB, Hsp90/HtpG, Hsp70/DnaK, Hsp60/GroEL, et les petites protéines de choc thermique (sHsps pour small Heat shock proteins) (Lindquist, 1986) qui possèdent un poids moléculaire inférieur à 43kDa et feront l'objet d'étude dans cette thèse.

1.2 Les petites protéines de choc thermique (sHsps)

Les sHsps sont ubiquitaires et ont une taille qui varie entre 12-43 kDa. Elles peuvent former des oligomères de grandes tailles pouvant même dépasser les 1000 kDa (Lee et al., 1997, Ehrnsperger et al., 1997, Haslbeck et al., 1999). Ces complexes sont impliqués

dans un équilibre dynamique entre des formes monomériques et/ou dimériques (Singh et al., 2007, McHaourab et al., 2009), et sont capables de lier passivement leurs substrats pour former des réservoirs de protéines mal repliées qui seront finalement repliées par des chaperons ATP-dépendants ou dégradées par le protéasome (Fink, 1999, Haslbeck et al., 2005a). Des études ont montré que les sHsps peuvent aussi jouer une variété de fonctions telles que la régulation de l'apoptose à différents niveaux (Mehlen et al., 1996b, Bruey et al., 2000, Charette et al., 2000), implication dans le processus du développement (Morrow and Tanguay, 2012, Liang and MacRae, 1999, Wehmeyer and Vierling, 2000, Rinehart et al., 2007, Marin et al., 1996a, Marin et al., 1996b, Marin and Tanguay, 1996, Lavoie et al., 1993a, Tanguay et al., 1993, Economou et al., 2016) et l'organisation spatio-temporelle des composants du cytosquelette (Perng et al., 1999, Lavoie et al., 1993a, Lavoie et al., 1993b, Lavoie et al., 1995) mais les mécanismes par lesquels les sHsps remplissent ces fonctions restent peu connus.

1.2.1 Evolution des sHsps

Les sHsps est la famille de chaperon la moins conservée au cours de l'évolution. Ils sont trouvés chez tous les règnes du vivant (de Jong et al., 1993, Kriehuber et al., 2010, Maaroufi and Tanguay, 2013). Les virus et les procaryotes contiennent généralement une ou deux séquences de sHsps (Kappe et al., 2002, Narberhaus, 2002, Kriehuber et al., 2010, Maaroufi and Tanguay, 2013). Cependant, quelques exceptions chez certaines bactéries pathogènes, qui ne codent pas pour les sHsps, et certaines bactéries symbiotiques peuvent avoir jusqu'à 12 gènes sHsps (Arrigo, 1998, Narberhaus, 2002, Kriehuber et al., 2010). Alors que chez la plupart des eucaryotes multicellulaires, le nombre de sHsps par organisme est plus grand (Kriehuber et al., 2010). À titre d'exemple, le génome humain code pour 10 sHsps, 12 chez la drosophile et plus de 20 chez les plantes (Kriehuber et al., 2010, Waters, 2013, Morrow and Tanguay, 2015) (Tableau 1.1).

Phylum		Nombre de séquences de protéines des sHsps
Virus		27
Bactéries		5949
Archées		444
Eucaryotes	Champignons	1067
	Algues	47
	Plantes	2205
	Métazoaires	2271
	Autres	237

Tableau 1-1: Distribution taxonomique des sHsps.

Toutes les séquences de protéines contenant le domaine alpha-cristallin (numéro d'accèsion PF00011) sont extraites du serveur HMMER (<http://hmmer.janelia.org>) (Finn et al., 2011). Le nombre de séquences de protéines par phylum est présenté dans le tableau.

La structure primaire des sHsps peut être divisée en une région non conservée au niveau N-terminal (NTR), un domaine central conservé α -cristallin (ACD) et une courte extension non conservée au niveau C-terminal (CTE) (Figure 1.1) (Caspers et al., 1995, Kriehuber et al., 2010). La longueur du domaine ACD est bien conservée au cours de l'évolution avec une longueur moyenne de 94 aa (Kriehuber et al., 2010, Kappe et al., 2002). Les deux extrémités NTR et CTE montrent des grandes variations : les bactéries et les archées sont les groupes taxonomiques avec des plus petites extensions, tandis que les eucaryotes présentent les séquences les plus longues (Kriehuber et al., 2010).

Les NTR et CTE ont toujours été décrits comme étant non conservés au niveau de la composition en acides aminés (Kriehuber et al., 2010). Toutefois, une conservation de leurs fonctions a été soulignée par plusieurs études (Kim et al., 2003, Quinlan et al., 2013, Hanazono et al., 2013, Saji et al., 2008, Usui et al., 2004, Jiao et al., 2005, Giese and Vierling, 2002, Giese et al., 2005, Studer et al., 2002, Tomoyasu et al., 2010). La question du pourquoi une telle variation dans le nombre de sHsps par génome, leur composition en acides aminés et la longueur des extrémités entre les sHsps procaryotes et eucaryotes reste ouverte mais néanmoins, on peut penser que l'évolution de courtes séquences composant le NTR chez les archées et les bactéries à des séquences plus longues dans les organismes supérieurs a donné au NTR plus de potentiel au niveau d'oligomérisation et de la fonction chaperon.

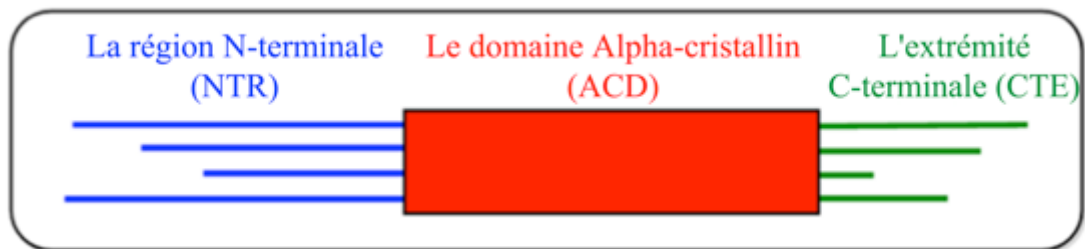


Figure 1.1: Organisation des sHsps.

Organisation des domaines des sHsps. La région N-terminal (NTR; en bleu) variable en composition et en longueur, le domaine conservé α -cristallin domaine (ACD; en rouge) et l'extension variable au niveau du C-terminal (CTE; en vert).

Une analyse complète de 8714 séquences des sHsps a permis de conclure que le domaine ACD a évolué indépendamment du NTR et du CTE (Kriehuber et al., 2010). Une analyse phylogénétique de l'ACD reflète un évènement de spéciation tandis que l'analyse du NTR et du CTE ne montre pas une telle relation. En outre, les sHsps bactériennes sont réparties en plusieurs branches de l'arbre, même quand on tient compte de l'ACD, qui reflète apparemment une diversification fonctionnelle de ces séquences. Les sHsps des métazoaires appartiennent à un clade distinct et semblent avoir évolué à partir d'un gène ancestral unique par des duplications répétées. De même, on suppose que les familles de gènes sHsps de la drosophile et des plantes ont surgi par duplication et divergence, qui a

également inclus l'acquisition de signaux spécifiques de ciblage pour diriger les sHsps encodés aux organites intracellulaires. À cet égard, tel que discuté plus loin (voir paragraphe 1.3 et chapitre 2) les sHsps chez la drosophile et chez les plantes se trouvent non seulement dans le cytosol, mais aussi dans d'autres compartiments tels les mitochondries et le noyau.

En général, les sHsps semblent avoir évoluées avec une flexibilité unique à cette famille de chaperons. Ce concept évolutif indépendant du recrutement des domaines supplémentaires porte essentiellement sur la variation des séquences terminales (NTR et CTE) sans diversification du domaine central conservé (ACD) (Heirbaut et al., 2015). Cela a permis aux différents membres de cette famille d'avoir une diversification structurelle et fonctionnelle.

1.2.2 Structure des sHsps

Bien que la capacité de sHsps à prévenir l'agrégation des protéines soit établie depuis longtemps (Horwitz, 1992), la compréhension de la façon dont les sHsps accomplissent cette fonction reste limitée due en grande partie à la limitation des méthodes structurales biophysiques et biochimiques classiques utilisées pour caractériser la structure des protéines et les interactions protéine-protéine. Le développement récent de la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire, la microscopie électronique, la spectrométrie de masse native, diffusion des rayons X sous petit angle et d'autres techniques donne une vue de plus en plus détaillée de la structure des sHsps et leurs interactions possibles entre elles (Jehle et al., 2009, Aquilina et al., 2003, Baldwin et al., 2011a, Braun et al., 2011, Baldwin et al., 2011b).

Les sHsps sont connues pour s'assembler en larges oligomères polydisperses allant de 12 à plus de 36 sous-unités. Ces formes oligomériques sont construites à partir d'une structure dimérique et constitue le bloc de base et le premier niveau de l'ordre structurel (Delbecq and Klevit, 2013, Garrido et al., 2012, Basha et al., 2012). L'ACD, pour lequel il existe un nombre croissant de structures, forme un β sandwich semblable à l'immunoglobuline (Figure 1.2). Le β -sandwich est composé de deux feuilles antiparallèles de trois et quatre brins β , reliés par une courte boucle interdomaine. Les

structures tridimensionnelles des ACD isolés démontrent qu'ils forment habituellement des dimères stables (Bagneris et al., 2009, Baranova et al., 2011, Clark et al., 2011, Laganowsky et al., 2010). La dimérisation des sHsps de plante, de levure et des bactéries se fait par échange réciproque des brins $\beta 6$ dans la structure β -sandwich de monomère voisin (Figure 1.2 a) (Bepperling et al., 2012, Kim et al., 1998, Hanazono et al., 2013). Un deuxième type de structure dimère a été observé chez la plupart des métazoaires ; dans ce type de dimère, les brins $\beta 6$ et $\beta 7$ sont soudés en un seul brin allongé ($\beta 6+\beta 7$). Ce brin forme l'interface du dimère avec son homologue du monomère voisin dans une orientation antiparallèle (Figure 1.2 b) (Jehle et al., 2009)

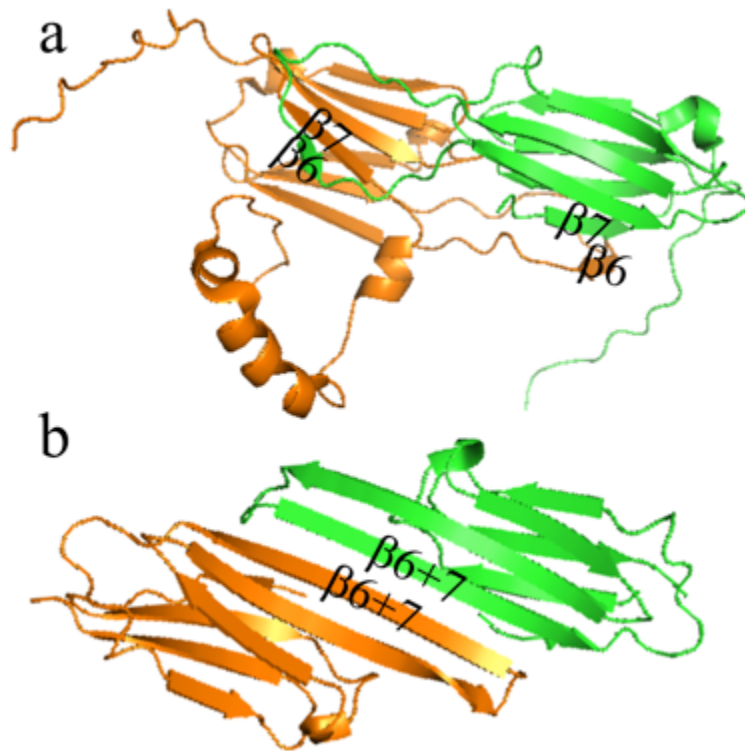


Figure 1.2 : Dimérisation des sHsps.

a- Structure de dimère du blé ACD-Hsp16.9 (PDB : 1GME) (van Montfort et al., 2001b). Chaque monomère est coloré en vert et orange. b- Structure de dimère de l'humain ACD-HspB1 (PDB : 4MJH) (Hochberg et al., 2014). Chaque monomère est coloré en vert et orange.

Le domaine ACD ne suffit pas pour la formation d'oligomères. Les deux régions NTR et CTE sont essentielles pour l'assemblage des oligomères d'ordre supérieur (Bagneris et al., 2009, Baranova et al., 2011, Clark et al., 2011, Laganowsky et al., 2010, Haslbeck and Vierling, 2015). En raison du nombre limité de structures oligomérique des sHsps à haute résolution, il est encore énigmatique de prédire quelles interactions inter-sous-unités sont responsables de la formation des oligomères. Toutefois les trois régions des sHsps sont établies comme étant nécessaires pour l'oligomérisation (Delbecq and Klevit, 2013, Basha et al., 2012, Chen et al., 2010a). Alors que l'ACD forme le bloc de construction de base par formation de dimère, les deux régions adjacentes contribuent au processus d'assemblage. L'extension CTE contient un motif conservé IxI/V appelé CAM (C-terminal Anchoring Module) qui est impliqué dans l'association des dimères en oligomères (Saji et al., 2008, Zhou et al., 2016, Kim et al., 1998, van Montfort et al., 2001b, Hanazono et al., 2013). Ce motif se lie à la pochette hydrophobe formée par les deux brins $\beta 4$ et $\beta 8$ du dimère voisin pour former des tétramères ou hexamères qui peuvent former des plus gros oligomères par des contacts via la région NTR libre (van Montfort et al., 2001b, Hanazono et al., 2013, Jehle et al., 2011, Braun et al., 2011).

A date, trois structures complètes (Figure 1.3) et un modèle pseudo-atomique dérivé d'une structure de cryomicroscopie électronique sont disponibles (Hanazono et al., 2013, Kim et al., 1998, van Montfort et al., 2001b, Braun et al., 2011).

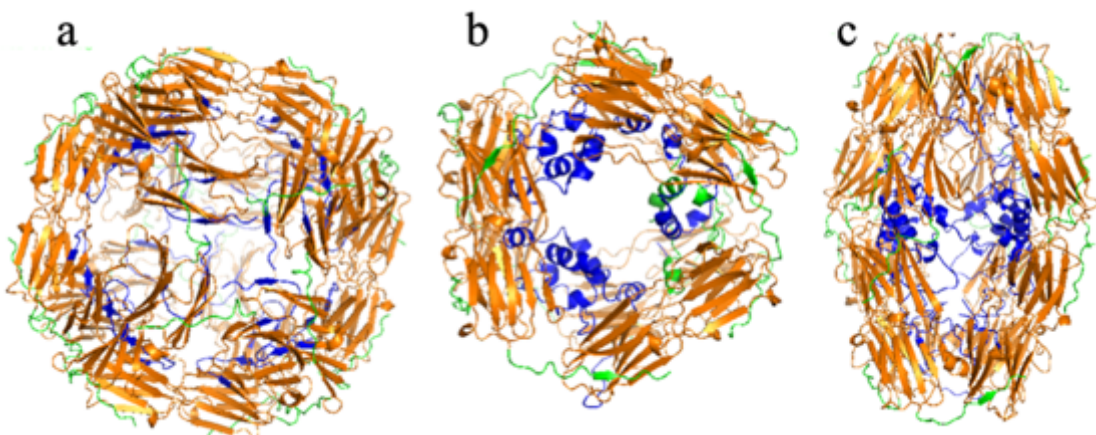


Figure 1.3 : Oligomérisation des sHsps.

Présentation en modèle cartoon des structures cristallographiques de sHsps. a- *M.jannaschii* Hsp16.5 (PDB 1SHS (Kim et al., 1998)). b- *T.aestivum* Hsp16.9 (PDB 1GME (van Montfort et al., 2001b)) et c *S. pombe* Hsp16.0 (PDB 3W1Z (Hanazono et al., 2013)). La NTR est colorée en bleu, le domaine ACD en orange et l'extension CTE en vert.

Toutes les autres structures tridimensionnelles représentent seulement l'ACD ou des parties d'oligomères isolées. En outre, toutes les structures disponibles manquent d'informations complètes sur la structure de la région NTR non résolue dans les structures cristallines, conduisant à la suggestion que le NTR pourrait être, au moins en partie, désordonné ou peut inclure des éléments structuraux très dynamiques qui fluctuent entre les différents contacts et les positions au sein de l'oligomère (Uversky and Dunker, 2010, Patel et al., 2014). L'importance de la région NTR a été mise en évidence par une étude sur Hsp16.5 de *Methanocaldococcus jannaschii* où l'insertion d'une séquence de 14 acides aminés (de la région NTR de HspB1 humain) adjacente à l'ACD de Hsp16.5 a donné lieu à une augmentation du nombre de sous-unités dans l'oligomère de 24 à 48 sous-unités (McHaourab et al., 2012). Une simulation de la dynamique moléculaire de Hsp16.9 du blé et Hsp18.1 du petit pois montre que la région NTR présente deux conformations : une conformation fermée (inactive) lors du repos et une conformation ouverte (active) suite au stress. Le rôle de la région NTR est impliqué dans l'activité chaperon et l'assemblage ; la grande majorité des analyses a révélé que les mutations ou troncations dans la région NTR s'accompagnent d'un changement d'activité et d'assemblage (Haslbeck et al., 2004b, Leroux et al., 1997, Stromer et al., 2004, Fu et al., 2005, Kundu et al., 2007, Lelj-Garolla and Mauk, 2012, McDonald et al., 2012, Derham et al., 2003, Ghosh et al., 2006). Les grandes troncations favorisent la formation de petits assemblages, généralement sans activité chaperon, en préconisant clairement son rôle crucial (Heirbaut et al., 2015).

Une autre caractéristique des sHsps est leur tendance à former plusieurs états d'oligomériques en équilibre (Stengel et al., 2010, Braun et al., 2011, Basha et al., 2012). Les oligomères échangent constamment des sous-unités et sont donc des ensembles polydisperses et dynamiques. La capacité à exister dans un équilibre entre des

populations d'oligomères différentes est corrélée avec la régulation de l'activité chaperon de sHsps (Basha et al., 2012). Dans ce contexte, une combinaison de différentes techniques, y compris la cristallographie, la cryomicroscopie électronique et RMN, ainsi que la spectrométrie de masse native, est nécessaire pour comprendre la dynamique des oligomères.

1.2.3 Reconnaissance des substrats et modèle d'activité des sHsps

Les sHsps peuvent agir en tant que chaperons moléculaires par liaison à des protéines mal repliées et les empêcher de former des agrégats de manière ATP-indépendante (Ingolia and Craig, 1982, Jakob et al., 1993, Horwitz, 1992, Studer and Narberhaus, 2000, Lee et al., 1995, Basha et al., 2004b, McHaourab et al., 2002, Morrow et al., 2006). Les sHsps remplissent leur tâche comme chaperons moléculaires en stabilisant précocement les intermédiaires mal repliées avant l'agrégation, suite à un stress. Aucune liaison entre sHsps et agrégats n'a été détectée suite à des études par pontage des sites de liaison des sHsps avec des substrats. Seulement les régions hydrophobes exposées au début du processus du mauvais repliement se lient aux sHsps (Ahrman et al., 2007b, Cheng et al., 2008, Ahrman et al., 2007a, McHaourab et al., 2002, McHaourab et al., 2009, Shashidharamurthy et al., 2005). Cependant, l'identité des substrats, le degré de mauvais repliement et les propriétés spécifiques des sHsps déterminent la stabilité des interactions sHsps-substrats (Stengel et al., 2010, Horwitz, 1992, McHaourab et al., 2009). Des analyses par la microscopie électronique (Basha et al., 2004b, Haslbeck et al., 1999, Stromer et al., 2003) et la spectrométrie de masse (Stengel et al., 2010) ont révélé que les complexes sHsps-substrats sont solubles et plus grands que les oligomères de sHsps seuls sans substrat. Bien qu'il n'y ait pas de structures résolues d'un complexe sHsps-substrat, des observations donnent l'impression que ces complexes sont formés à partir d'une forme dissociée des sHsps, probablement des dimères, qui se réassocient en une nouvelle forme oligomérique liant le substrat (Haslbeck and Vierling, 2015). D'un point de vue général, les sHsps peuvent fonctionner comme un système de tampon qui lie des protéines au début du processus de mal-repliement, pour les protéger contre l'agrégation ce qui en fait de véritables éponges moléculaires naturelles (Eyles and Gierasch, 2010) (Figure 1.4).

Des expériences *in vitro* ont révélé que les protéines mal repliées et piégées dans des complexes sHsps-substrats peuvent être libérées et repliées en présence de la machinerie des chaperons ATP-dépendants chez les procaryotes (système DnaK-DnaJ-GrpE) et chez les eucaryotes (le système Hsp70/Hsp40) (Figure 1.4) (Lee et al., 1997, Ehrnsperger et al., 1997, Stege et al., 1994, Lee and Vierling, 2000, Bepperling et al., 2012, Mogk et al., 2003a, Veinger et al., 1998, Ratajczak et al., 2009). De plus, le repliement des substrats des grands complexes contenant les sHsps nécessite un mécanisme impliquant non seulement DnaK-DnaJ-GrpE, mais aussi la protéine désagrégase ClpB dans *E. coli* (Bepperling et al., 2012, Mogk et al., 2003a, Ratajczak et al., 2009, Haslbeck et al., 2005b, Cashikar et al., 2005). Ce mécanisme est conservé des bactéries aux eucaryotes inférieurs et se retrouve également chez les plantes supérieures et les ammifaires, impliquant la famille de Hsp100 (ClpB chez les bactéries, Hsp104 chez *Saccharomyces cerevisiae*, Hsp101 chez les plantes et Hsp110 chez les ammifaires) (Mogk et al., 2003a, Haslbeck et al., 2005b, Cashikar et al., 2005, Lee et al., 2005, Shorter, 2011).

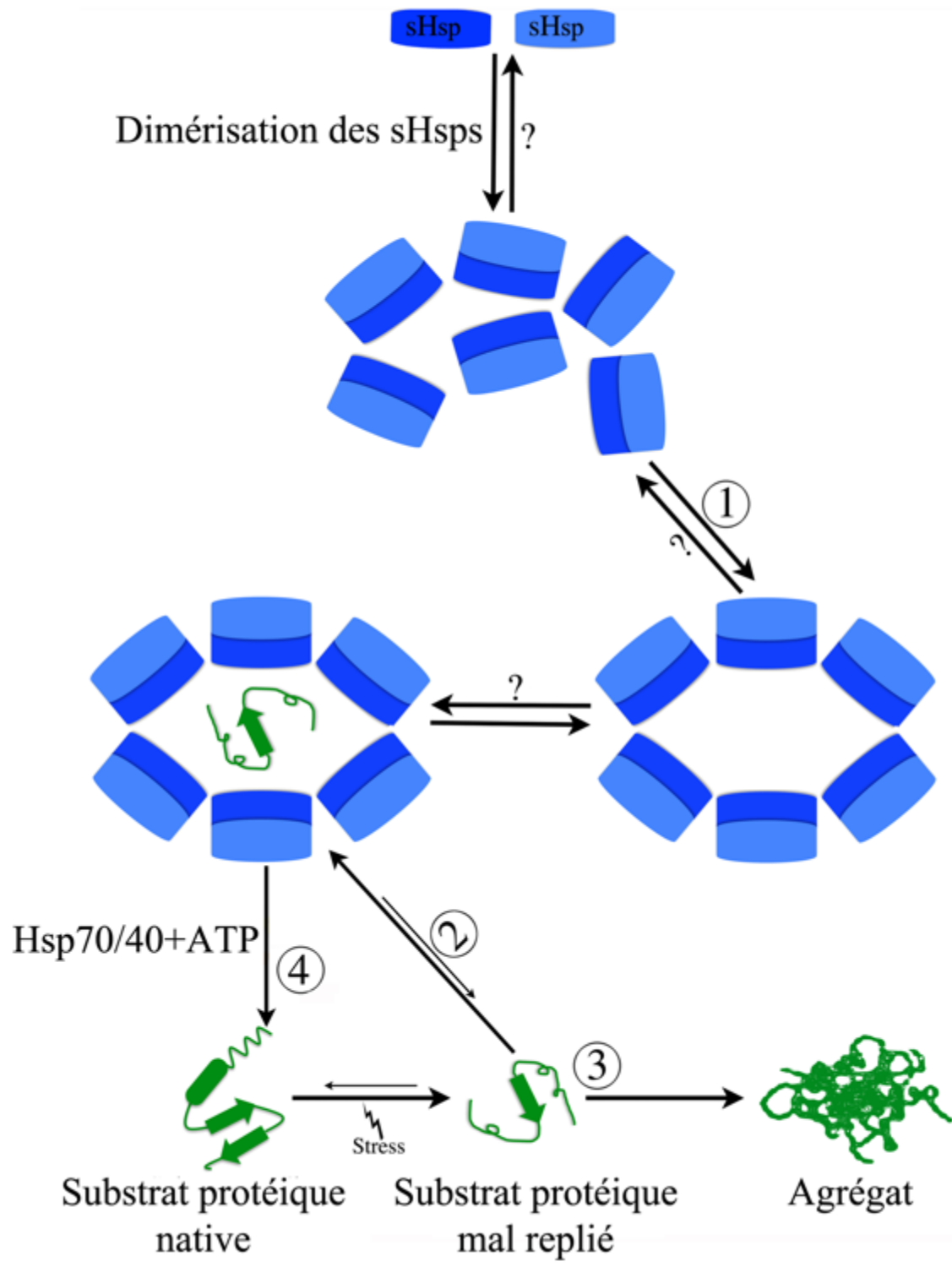


Figure 1.4 : Mécanisme de fonctionnement des sHsps.

En réponse au stress, les sHsps s'activent par des mécanismes non encore déterminés. Cependant, l'activation conduit à une association ou dissociation des oligomères (1). Les espèces activées lient les protéines de substrat non natives (2) et les empêche de subir une agrégation irréversible (3) par la formation de complexes sHsps-substrat (2). Les substrats liés peuvent être libérés à partir des complexes et repliés par le système de chaperon Hsp70/40 dépendant de l'ATP (4). Les points d'interrogation indiquent les caractéristiques qui ne sont pas encore résolues en détail.

La reconnaissance du substrat par les sHsps reste encore énigmatique. Des études utilisant des approches protéomiques chez différents organismes ont identifié un nombre important de protéines cytosoliques associées aux sHsps dans des conditions de choc thermique (Bepperling et al., 2012, Haslbeck et al., 2004a, Basha et al., 2004a, Fu et al., 2013, Peschek et al., 2013). *In vivo*, les sHsps ont montré une préférence pour les protéines liées à la machinerie de traduction dont les protéines ribosomales, des facteurs de traduction et les aminoacyl-ARNt synthétases et des enzymes métaboliques chez les bactéries (Fu, 2014, Fu et al., 2013, Bepperling et al., 2012). Néanmoins, il est difficile de savoir s'il existe des motifs de reconnaissance de substrats par les sHsps. Bien que le mécanisme précis de la reconnaissance du substrat reste mal connu, l'image qu'on a aujourd'hui propose l'implication de multiples sites dans ce processus. Les premières études par incorporation de colorants hydrophobiques ont suggéré que les substrats se lient à de courts segments dans la région NTR des sHsps (Lee et al., 1997, Sharma et al., 1998). Des preuves à partir d'expériences de pontage chimique et analyse par spectrométrie de masse supportent cette suggestion (Ghosh et al., 2007b, Ahrman et al., 2007b, Jaya et al., 2009, Cheng et al., 2008, Lambert et al., 2013). Les simulations de la dynamique moléculaire de la région NTR du dimère de Hsp16.9 de blé (1GME) et son homologue de petit pois Hsp18.1, montrent une surface hydrophobique exposée au solvant dans la région NTR de 800 à 1700 Å qui pourrait interagir avec les régions hydrophobes des substrats (Patel et al., 2014). Ces données dans leur ensemble soutiennent le rôle majeur de la région NTR dans la reconnaissance et la liaison du substrat. D'autres travaux cependant proposent que l'ACD et CTE puissent également être impliqués dans l'interaction des sHsps avec le substrat. Particulièrement des études ont

révélé que le domaine ACD seul a une activité chaperon (Jaya et al., 2009, Feil et al., 2001, Laganowsky et al., 2010, Jehle et al., 2009, Hochberg et al., 2014). En plus, une mutation *in vitro* de la glycine (G) hautement conservée dans le motif de AxxxGVL HspH de *Bradyrhizobium japonicum* affecte spécifiquement l'activité chaperon sans atteindre les autres propriétés de la protéine (Lentze et al., 2003). L'analyse des mutants dans le domaine ACD des sHsps avec des rendements différents de protection de substrat a également soutenu un rôle pour l'ACD dans la protection des substrats (Basha et al., 2006, Lentze et al., 2004, Lentze and Narberhaus, 2004, Hochberg et al., 2014, Nefedova et al., 2013). En plus, des mutations de résidus dans l'extension CTE affectent l'activité chaperon et indiquent que la flexibilité de l'extrémité C-terminale de ces protéines est nécessaire pour la reconnaissance ou la protection du substrat (Treweek et al., 2007, Treweek et al., 2010). Le motif conservé CAM du CTE se lie à une poche hydrophobe entre les brins $\beta 4$ et $\beta 8$ au sein de l'ACD pour former des tetramères ou hexamères. Lors du stress, les sHsps se dissocient en dimères, par conséquent la poche hydrophobe est libre, ce qui conduit à une potentielle liaison avec les substrats mal repliés (van Montfort et al., 2001b, Laganowsky et al., 2010, Treweek et al., 2010, Delbecq et al., 2012). Cependant, peu d'interactions entre le domaine ACD et les substrats sont détectées dans des expériences de pontage chimique, alors que la poche hydrophobique $\beta 4$ - $\beta 8$ présente une surface moins accessible ($<300 \text{ \AA}$) pour la liaison de substrat que la région NTR (Patel et al., 2014, Ahrman et al., 2007b, Jaya et al., 2009).

Globalement la liaison au substrat semble être accomplie principalement par des séquences variables, non conservées à l'extérieur du domaine ACD, ce qui peut expliquer les variations de la spécificité des substrats entre les différentes sHsps. En plus, l'évolution indépendante de la région NTR et de l'extension CTE suppose qu'il existe des variations dans le profil des substrats reconnus par des sHsps d'espèces lointaines, et des sHsps de différents compartiments cellulaires. De ces observations découle la question de la reconnaissance des substrats compartiment cellulaire-dépendant. Est-ce que les sHsps nucléaires reconnaissent des substrats différents de ceux qui sont reconnus par les sHsps cytoplasmiques et/ou mitochondriales et par quel mécanisme?

1.2.4 Régulation de l'activité des sHsps

Pour une reconnaissance et une liaison efficace de substrat, la majorité des sHsps nécessite un changement dans l'équilibre oligomérique d'un "état inactif" composé de gros oligomères à un "état actif" constitué des espèces plus petites (Delbecq and Klevit, 2013, Basha et al., 2012, Garrido et al., 2012, McHaourab et al., 2009). L'interaction avec le substrat dépend largement de la région NTR, qui est principalement cachée dans les gros oligomères (van Montfort et al., 2001b, Hanazono et al., 2013, Kim et al., 1998). L'oligomérisation est considérée essentiellement comme une forme de stockage qui doit être régulée pour exposer les sites de liaison aux substrats. L'existence chez certaines sHsps (exemple HspB6 humain) d'une seule forme en dimère actif fonctionnellement supporte ce modèle (Weeks et al., 2014). Un autre dimère de Hsp18.5 chez *Arabidopsis thaliana*, est actif en tant que chaperon, lie des substrats et forme de grands complexes (Basha et al., 2013). Un autre exemple chez *Deinococcus radiodurans* est Hsp17.7 dimère, qui protège efficacement des substrats *in vitro*, mais interagit de façon transitoire avec ses substrats sans former des complexes stables (Bepperling et al., 2012). Quatre différents mécanismes de régulation sont connus pour déplacer l'équilibre oligomérique à l'état actif consistant en petits oligomères pour la majorité des sHsps; d'abord, la présence de substrats partiellement mal repliés, deuxièmement, le stress, troisièmement, la phosphorylation ou d'autres modifications post-traductionnelles et quatrièmement, la formation d'hétéro-oligomères (Haslbeck et al., 2015).

Les sHsps assurent la stabilité du protéome dans des conditions physiologiques normales et de stress. La régulation des sHsps par assemblage/désassemblage des oligomères permet aux sites de liaison de substrat qui sont cachés dans les oligomères d'être exposés (McHaourab et al., 2009, Shashidharamurthy et al., 2005, Yang et al., 1999, Giese and Vierling, 2002, Lindner et al., 1998). Comme il y aura toujours une certaine population de sous-unités de sHsps dissociées, un petit nombre de sites pour la liaison de substrat est toujours disponible, ce qui peut expliquer comment les sHsps lient des protéines dans les conditions normales de non-stress. Lors du stress, la présence de substrats mal repliés (intermédiaires précoces) qui interagissent avec les sous-unités dissociées des sHsps conduirait alors à un changement dans l'équilibre oligomérique vers

des petites espèces, plus actives (McHaourab et al., 2009, Benesch et al., 2008, Shi et al., 2013).

De nombreuses études ont démontré que le stress thermique est un déclencheur de l'activation générale des sHsps (Stromer et al., 2004, Haslbeck et al., 1999, Haslbeck et al., 2008, White et al., 2006, Fu, 2014, Basha et al., 2010). La température d'activation reflète la température physiologique de l'organisme respectif. Par exemple, chez la levure, Hsp26 est activée dans une plage de température allant de 20 °C à 43 °C, Hsp16.5 de *M. jannaschii* est activée à partir de 60 °C à 95 °C, HspB1 humain est activée à partir de 37 °C à 42 °C, et en fin chez les poissons vivants à des températures inférieures à 15 °C les sHsps sont activées à partir de ~ 10 °C à 25°C (Haslbeck et al., 1999, Haslbeck et al., 2008, Ehrnsperger et al., 1999, Posner et al., 2012). Le passage de la température physiologique au stress nécessite généralement une augmentation de seulement quelques degrés et fournit une énergie d'activation suffisante pour déplacer l'équilibre des sHsps vers la dissociation. La température de stress elle-même comme un mécanisme d'activation est importante au niveau de l'activation de la traduction des sHsps. Les ARNm codants pour les sHsps de cyanobactéries mésophiles et thermophiles, ainsi que chez *Pseudomonas putida*, contiennent des "ARN thermomètres" (ARNTs), qui sont des épingles à cheveux internes dans la région 5'-non traduite qui inhibent la traduction à des températures physiologiques (Cimdins et al., 2014, Krajewski et al., 2014). A des températures de stress, les ARNTs s'ouvrent, permettant la traduction des ARNm codants pour les sHsps. Semblable à la présence de substrats, la température représente un déclenchement rapide et efficace pour l'activation des sHsps lorsque le niveau de protéines mal repliées augmente dans une cellule.

La régulation de l'activité des sHsps par phosphorylation ou plus généralement par des modifications post-traductionnelles est plus étudiée chez les mammifères. La phosphorylation des sHsps humaines cause le même effet que l'augmentation de la température ou la présence de protéines mal dépliées, avec la distribution de l'équilibre vers des espèces plus petites par dissociation des oligomères, bien que des exceptions sont également observées (Arrigo, 2013, Ahmad et al., 2008, Lambert et al., 1999, Theriault et al., 2004). Les espèces les plus petites sont enrichies en tétramères et hexamères qui reflètent le fait que le processus d'assemblage comprend des équilibres

multiples qui sont affectés par phosphorylation (Peschek et al., 2013, Rogalla et al., 1999, Ahmad et al., 2008). Par exemple, la phosphorylation par MAPKAP2/3-kinase de HspB1 humain conduit à un enrichissement de tétramères qui se dissocient en dimères supplémentaires (Rogalla et al., 1999, Kato et al., 1994, Hayes et al., 2009). De même, des études utilisant des variantes de phosphorylation imitant de HspB5 révèlent un ensemble d'oligomères consistant principalement en 12mers, hexamères, et dimères (Peschek et al., 2013, Ito et al., 2001). La prédominance de ces espèces indique que la phosphorylation affecte principalement les contacts au niveau de la région N-terminale dans l'oligomère, ce qui est également en accord avec l'emplacement des sites de phosphorylation dans cette région. Précisément, les charges négatives incorporées lors de la phosphorylation sont prévues pour déstabiliser les interfaces de sous-unités. Dans un modèle pseudo-atomique de HspB5, les trois sites de phosphorylation se trouvent dans la même région, ce qui indique que les interactions de sous-unités pourraient être déstabilisées par l'augmentation du degré de charge négative suite à la phosphorylation (Braun et al., 2011, Peschek et al., 2013). La découverte de modification post-traductionnelle par phosphorylation des sHsps chez les non-mammifères (Lund et al., 2001, Bentley et al., 1992, Bodenmiller et al., 2010, Ficarro et al., 2002, Marin et al., 1996b, Bodenmiller et al., 2007, Zhai et al., 2008) nous ouvre les perspectives de tester si cette modification a un impact similaire sur leurs structures et activités comme le cas pour les sHsps de mammifères (Voir chapitre 4 pour l'effet de la phosphorylation sur la structure et la fonction de DmHsp27). En outre, d'autres modifications post-traductionnelles, y compris la désamination, l'oxydation, la glycation ou la fixation de méthylglyoxal ont été décrites pour avoir un effet sur l'activité de chaperon de sHsps, principalement pour les α -cristallins chez les vertébrés (Gupta and Srivastava, 2004, Chen et al., 2001, Chalova et al., 2014, Satish Kumar et al., 2004).

La structure dynamique des oligomères de sHsps, qui échangent en permanence des sous-unités, offre la possibilité de former des hétéro-oligomères avec d'autres sHsps présents dans le même compartiment cellulaire et représente un mécanisme par lequel l'activité peut être régulée. Le potentiel pour former des hétéro-oligomères varie considérablement entre les organismes en fonction de la compatibilité des sHsps pour co-assembler. Cette variation dans le potentiel de régulation de formation d'hétéro-oligomère

est manifestée chez les bactéries. Par exemple chez *E. coli*, il existe deux chaperons de type sHsps, dont l'un (IbpA) avec une faible activité de chaperon seul, mais dont l'activité de chaperon augmente en formant un hétéro-oligomère avec la seconde sHsps (IbpB) ce qui suggère qu'une sHsp peut moduler l'activité d'une autre (Ratajczak et al., 2009). Cependant, on ne sait pas si ce système de collaboration des sHsps chez *E. coli* peut être généralisé. Chez les bactéries ayant deux sHsps, elles sont soit proches (situés dans les mêmes branches de l'arbre phylogénétique, par exemple, *E. coli*) ou plus éloignées (situé dans les différentes branches) (Kriehuber et al., 2010, Bepperling et al., 2012). Dans ce dernier cas, un système étudié dans *D. radiodurans in vitro*, où les deux sHsps agissent de manière indépendante, mais en parallèle, sans formation d'un hétéro-oligomère, et elles diffèrent sensiblement par leur fonction et structure quaternaire au sein du réseau de chaperon. Une des sHsps, Hsp17.7, est sous forme de dimère et chaperon actif qui semble garder les substrats dans un état de repliement compétent par des interactions transitoires, tandis que l'autre, Hsp20.2, est principalement oligomérique et coopère avec des chaperons ATP-dépendant (Bepperling et al., 2012). Une étude récente par (Heirbaut et al., 2016), montre que l'hétérodimérisation de HspB1 et HspB6 humaines est réglée par le domaine N-terminal.

Il est important de signaler que pas toutes les sHsps qui se trouvent dans le même compartiment cellulaire ne forment pas nécessairement des hétéro-oligomères. *B. japonicum* présente deux classes de sHsps, où la hétéro-oligomérisation est limitée au membre de la même classe (Studer and Narberhaus, 2000). De même *P. putida* possède un opéron tricistronique de trois sHsps (HspX, HspY et HspZ) et un gène IbpA codé séparément qui coopèrent, mais ne semblent pas former des hétéro-oligomères (Krajewski et al., 2014). De même, chez les eucaryotes inférieurs tels que la levure, deux sHsps, Hsp26 et Hsp42, agissent de façon indépendante et ne forment pas des hétéro-oligomères (Duennwald et al., 2012, Specht et al., 2011). Chez les eucaryotes supérieurs, le potentiel de régulation par hétéro-oligomérisation est évident. Chez les êtres humains (et d'autres vertébrés), des sHsps spécifiques forment des hétéro-oligomères *in vivo* et *in vitro*. Par exemple, HspB4 et HspB5 dans le cristallin de l'œil forment des hétéro-oligomères et peuvent également agir en parallèle en tant que homo-oligomère

(Mymrikov et al., 2012). La mesure dans laquelle l'hétéro-oligomérisation peut réguler la fonction sHsp chez les eucaryotes supérieurs reste à explorer.

1.2.5 Activités des sHsps dans les fonctions biologiques et pathologiques.

En plus de la fonction chaperon, les sHsps sont impliquées dans plusieurs fonctions cellulaires. En effet, plusieurs mutations dans les sHsps chez l'homme sont associées à des pathologies, principalement les neuropathies et les myopathies (Tableau 1.2) (Datskevich et al., 2012, Benndorf et al., 2014). Les pathologies dues à des mutations ou des modifications dans les chaperons sont généralement appelées «chaperonopathies» (Macario and Conway de Macario, 2005). Les mécanismes exacts, par lesquels chaque mutation est responsable de la maladie pourraient être différents, mais convergents vers les voies qui sont critiques pour la survie. La plupart des mutations sont dominantes négatives, ce qui implique que le gain toxique de fonction pourrait être un facteur contributoire dominant dans la pathogenèse.

Les sHsps peuvent interagir et affecter l'organisation spatio-temporelle des composants du cytosquelette. HspB1 et HspB5 interagissent avec des filaments intermédiaires, les stabilisent et empêchent leur réorganisation (Perng et al., 1999, Huot et al., 1996, Lavoie et al., 1995, Lavoie et al., 1993b). Cette capacité des sHsps à interagir avec des éléments du cytosquelette peut également empêcher la cascade d'événements conduisant à la mort cellulaire. HspB1 interfère avec les signaux apoptotiques en amont de la voie apoptotique mitochondriale. La F-actine et la cytochalasin D, induisent la libération de cytochrome c par les mitochondries et l'activation subséquente de la caspase. La surexpression de HspB1 conduit à la re-localisation intracellulaire de Bid, ce qui retarde la libération de cytochrome c par les mitochondries lors du traitement avec la cytochalasin D (Paul et al., 2002). Certains sHsps sont impliqués à différents niveaux dans l'inhibition de l'apoptose par la voie mitochondriale. HspB1, HspB4 et HspB5 lient Bax et Bcl-X, molécules pro-apoptotiques et préviennent l'apoptose par inhibition de leur translocation à la mitochondrie (Mao et al., 2004, Havasi et al., 2008). Similairement, HspB1 et HspB5 empêchent la mort cellulaire induite par TNF α . Une surexpression de

ces protéines conduit à une augmentation du taux de glutathion et la diminution des ROS (Mehlen et al., 1996a). HspB1 joue également un rôle dans la régulation de la sénescence cellulaire en modulant la voie du suppresseur de tumeur p53. HspB1 inhibe l'induction médiée par p53 de p21/Waf1, un inhibiteur de kinases dépendantes des cyclines et le principal régulateur du programme de sénescence (O'Callaghan-Sunol et al., 2007). Une surexpression d'un mutant phospho-mimétique de HspB1 augmente l'importation de p53 dans le noyau et l'expression de gènes cibles de p53, p21 et MDM2 (Xu et al., 2013). Il est important de noter que l'état de phosphorylation de HspB1, joue un rôle important dans la régulation de la voie p53 et la survie cellulaire. HspB8 semble jouer un rôle dans l'autophagie, par liaison à Bag3 (Carra et al., 2008). HspB1 et HspB5 pourraient aussi jouer le rôle d'adaptateur pour le recrutement des complexes par le protéasome (Bachetti et al., 2010).

Enfin, des niveaux élevés de HspB1 et HspB5 sont trouvés dans le sérum et fluide cérébral des patients atteints de sclérose multiple (Ce et al., 2011, Li and Zhang, 2012, Stoevring et al., 2005). Cela laisse supposer que les sHsps peuvent jouer un rôle dans la réponse immunitaire.

Protéine	Mutations	région	Maladie	référence
HspB1	P7S	NTR	DHMN (AD)	(Echaniz-Laguna et al., 2017)
	G34R	NTR	DHMN	(Capponi et al., 2011)
	P39L	NTR	DHMN/CMT2 (AD)	(Houlden et al., 2008)
	E41K	NTR	DHMN (AD)	(Capponi et al., 2011)
	G53D	NTR	DHMN (AR)	(Echaniz-Laguna et al., 2017)
	G84R	NTR	DHMN/CMT2	(Houlden et al., 2008,

			(AD)	(James et al., 2008)
	L99M	ACD	DHMN/CMT2 (AR)	(Houlden et al., 2008)
	R127W	ACD	DHMN (AD)	(Evgrafov et al., 2004)
	Q128R	ACD	DHMN (AD)	(Echaniz-Laguna et al., 2017)
	D129E	ACD	DM/MN	(Lewis-Smith et al., 2016)
	S135F/S135M	ACD	DHMN/CMT2 (AD)	(Evgrafov et al., 2004)
	R136W/R136L	ACD	CMT2 (AD)	(Evgrafov et al., 2004, Kostenko and Moens, 2009)
	R140G	ACD	DHMN/CMT2 (AD)	(Gentil and Cooper, 2012)
	K141Q	ACD	DHMN (AD)	(Ikeda et al., 2009)
	T151I	ACD	DHMN (AD)	(Evgrafov et al., 2004)
	S156Y	ACD	Non pathogénique	(Almeida-Souza et al., 2010)
	T164A	ACD	CTM2 (AD)	(Lin et al., 2011)
	T180I	CTE	DHMN/CMT2 (AD)	(Luigetti et al., 2010)

	P182L/P182S	CTE	DHMN (AD)	(Evgrafov et al., 2004) 62
	S187L	CTE	DHMN	(Echaniz-Laguna et al., 2017)
	R188W	CTE	CTM2	(Kostenko and Moens, 2009)
	476_477delCT	CTE	PN (AD)	(Mandich et al., 2010)
	pGln175X	CTE	CTM2	(Rossor et al., 2012)
HspB3	R7S	NTR	MN	(Kolb et al., 2010)
HspB4	W9X	NTR	Cataracte (AR)	(Pras et al., 2000)
	R12C	NTR	Cataracte (AD)	(Hansen et al., 2007, Devi et al., 2008)
	R21L/R21W	NTR	Cataracte (AD)	(Hansen et al., 2007, Graw et al., 2006)
	R49C	NTR	Cataracte (AD)	(Mackay et al., 2003)
	R54C	NTR	Cataracte (AD, AR)	(Devi et al., 2008)
	F71L	ACD	Cataracte liée à l'âge	(Bhagyalaxmi et al., 2009)
	G98R	ACD	Cataracte (AD)	(Santhiya et al., 2006)
	R116C/R116H	ACD	Cataracte (AD)	(Hansen et al., 2007, Litt et al., 1998, Gu et

				al., 2008)
	R117H	ACD	Cataracte	(Sun et al., 2011)
HspB5	R11H	NTR	Cataracte (AD)	(Chen et al., 2009)
	P20S	NTR	Cataracte (AD)	(Li et al., 2008)
	Ser21Alafsx24	NTR	MFM (AR)	(Del Bigio et al., 2011)
	R56W	NTR	Cataracte (AR)	(Khan et al., 2010)
	R69C	ACD	Cataracte (AD)	(Sun et al., 2011)
	D109H/D109A	ACD	Cataracte, MFM (AD)	(Sacconi et al., 2012, Fichna et al., 2017)
	Ser11Profsx14	ACD	MFM (AR)	(Forrest et al., 2011)
	R120G	ACD	DRM, Cataracte (AD)	(Vicart et al., 1998, Inagaki et al., 2006)
	D140N	ACD	Cataracte (AD)	(Liu et al., 2006)
	Q151X	CTE	MFM (AD)	(Selcen, 2011)
	G154S	CTE	DM	(Pilotto et al., 2006)
	R157H	CTE	DCM (AD)	(Inagaki et al., 2006)
	A171T	CTE	Cataracte (AD)	(Devi et al., 2008)
	K150ds_184X	CTE	Cataracte (AD)	(Berry et al., 2001)
	Délétion C25	CTE	MFM (AD)	(Selcen and Engel, 2003)

HspB6	P20L	NTR	Diminue l'activité cardioprotective	(Nicolaou et al., 2008)
HspB8	P90L	NTR	DHMN	(Echaniz-Laguna et al., 2017)
	N138T	ACD	DHMN (AD)	(Echaniz-Laguna et al., 2017)
	K141N/K141E/K141M	ACD	DHMN/CMT2 (AD)	(Irobi et al., 2004, Tang et al., 2005, Echaniz-Laguna et al., 2017, Ghaoui et al., 2016)
	P173SfsX43	CTE	DHMN	(Ghaoui et al., 2016)

Tableau 1-2: Les mutations au niveau des sHsps et les maladies associées chez l'humain.

Neuropathie motrice héréditaire distale (DHMN), myopathie avec surcharge en désmine (DRM), cardiomyopathie dilatée (DCM), myopathie distale (DM), myopathie myofibrillaire (MFM), neuropathie motrice (MN), neuropathie périphérique (PN), maladie de Charcot-Marie-Tooth type 2 (CMT2). Type de transmission : autosomique dominante (AD) ou autosomique récessive (AR).

1.3 La réponse au stress chez *Drosophila melanogaster*

1.3.1 Les sHsps chez *Drosophila melanogaster*

L'étude de l'expression et la fonction des sHsps en utilisant pour organisme modèle *Drosophila melanogaster* est l'un des principaux axes de recherche du laboratoire Robert M Tanguay. Le génome de cet organisme code pour 12 protéines contenant le domaine ACD (pfam family: PF00011, (Finn et al., 2014)) (Tableau 1.3). Parmi ces 12 sHsps, 7 sont localisées à la position 67B dans le bras gauche du chromosome 3. DmHsp22, DmHsp23, DmHsp26 et DmHsp27 étaient les premières *D.melanogaster* sHsps (DmsHsps) découvertes suivi par Hsp67Ba et Hsp67Bc (Ayme and Tissieres, 1985, Craig and McCarthy, 1980). CG4385, la dernière DmsHsps rapportée (FlyBase annotation : FBrf0217539), localisée au niveau du bras gauche du chromosome 2 comme CG13133, mais dans un locus différent. Un transcrit et un polypeptide sont associés avec CG43851, mais peu d'informations sont disponibles. Une analyse indique la divergence de CG43851 par rapport aux autres sHsps (Morrow and Tanguay, 2015). Il faut noter que CG43851 est plus proche des sHsps de plantes qu'aux sHsps de drosophile. Une analyse de la séquence de CG43851 révèle qu'il manque la boucle contenant le brin $\beta 6$ (Figure 1.5) tout comme *Arabidopsis thaliana* Hsp18.5, ce qui suggère qu'elle existe sous forme de dimère et qu'elle forme des gros oligomères seulement lorsqu'elle est liée au substrat (Morrow and Tanguay, 2015, Basha et al., 2013). Pour la plupart des DmsHsps, il n'existe pas d'orthologue humain. DmHsp67Bc est l'équivalent fonctionnel de HspB8 (Carra et al., 2010) et l(2)efl et serait l'équivalent de HspB5 (Wang et al., 2011).

NTR

```
Q41560_Hap16.9_WHEAT .....MSIVRRIN.....VFDFFA.....DLWADPFD
P02518_DmHap27 .....MSIIPLL..HLA...RELDHRYRTDGHLLLEDDFGFVHA.....HDLFHPRR
P02515_DmHap22 .....MRSILVFM..RMA...EMARMFR.....LSSFF.....HAFFHEFP
P02516_DmHap23 .....MANIPLLL.SLA...DDLGRMSM.....VPFYEPY...CQRQNPY
P02517_DmHap26 .....MSLSTLL..SLV...DELQEPS.....PIYELGL.....GLHPHRY
P82147_Dm12ef1 .....MSVPLMFRDWM...DELDFPMR...TSRLLDQHFGQLKRDLLMSSVNSRPT
P05812_DmHap67Ba .....MSLIPFIL.DLA...EELHDFNR.SLAMIDDSAGFGLYPLEATSQPLSRGVA
P22979_DmHap67Bc .....MPDIPFV.....LNLDSFDSMYGHDMPFNRMRYRLH.....SRQHSOLD
Q81QW5_DmCG14207 MAEANRNI...FKLGDFFVIDTEFSNIRERFDSEMRKMEEMAKFR.....HELMNREA
Q9VL41_DmCG13133 .....MFINM.DWD...WEHDHENG.....H.....HHQPRRR
Q9VSA9_DmCG7409 .....MALVPAATNNTD...WEHDHENG.....H.....DYMQRRL
Q9VSK2_DmCG4461 .....MSLVPITTYRDL...REFDRLP...LYHPYDFQLYP.....LYWDDRR
M9PCC9_DmCG43851 .....MSGQKYKVF.....DSQDFRIM.....QSECEKRV.....KQLEKDVY
```

```
Q41560_Hap16.9_WHEAT TFR.....SIVPAISGGGSETAAAFANRMDW.....
P02518_DmHap27 LLL.....PNTLGLGRRRYSFYERSHGHHNQMSRR.....
P02515_DmHap22 VWS.....VALPRNQQTARWGEQ.....
P02516_DmHap23 LAL.....VGPMEQQLRQLEKQVGA.....
P02517_DmHap26 VLFLOTQRRSINQCFASPICPSSPAGQVLAIKRREMANRNDHW.....
P82147_Dm12ef1 VLR.....SGYLRPW.HTNSLQKQ.....
P05812_DmHap67Ba AWE..CNDVGAHQSGVGGHRSIAIIRIIVNPEPRLAAISRWSMKNRNNAIIRARPGQAR
P22979_DmHap67Bc LHT.....LGLIARMGANAHHLVAN.....
Q81QW5_DmCG14207 NFF.....ESTSSTKTTTTSTINSALPFRIPKQ.....
Q9VL41_DmCG13133 HWSTGESKCRQRHYLSHDLQVCAIDFHLRMDSDSANCWCHGSLVGR.....
Q9VSA9_DmCG7409 LWR.....DMDLNDWDLPYKRSLSRVGS.....
Q9VSK2_DmCG4461 MWFSFHTSRSDLLRPLDELVSRVRNQLIQSTPYEWAHPMRWDNY.....
M9PCC9_DmCG43851 DCC.....RMMNNAEEVEDISTTWIKA.....
```

ACD

Diagram showing domain structure for ACD with beta-strands (β3, β4, β5) and turns (TT, η1, η2, η3, η4). The sequence alignment below shows conserved residues across species.

```
P02518_DmHap27 .....KETPEANV.....FKA..DLPGVKKSEVKEVEEDGNVLYVSGERTREKEDK
Q41560_Hap16.9_WHEAT .....ASGGPNALLFAVKGDG...FQVCHDVSQFKNPELITVYVVDNT.VVVEGKH.DEMEDG
P02518_DmHap27 .....EFAPPATVKGDG...FKLITLDVKDY...SELKVVLDSENVVCKGK.DQQAEE
P02516_DmHap23 .....SSGSGAVKIKGKG...FQVCHDVSQFKNPELITVYVVDNT.VVVEGKH.DEMEDG
P02517_DmHap26 .....PATAHVKGKG...FQVCHDVAQFKNPELITVYVVDNT.VVVEGKH.DEMEDG
P82147_Dm12ef1 .....EGGSTLNDSEK...FVILLDVQQFSPSEITVYVVDKPF.VVEGKH.DEMEDG
P05812_DmHap67Ba PVANGASKSAYSVNRNG...FQVSNVQVFAANELITVYVVDNC.IVVEGKH.DEMEDG
P22979_DmHap67Bc ..KRNGLAALSNGGASNKQGNFVHLDVGLFQFQELITVYVVDNC.IVVEGKH.DEMEDG
Q81QW5_DmCG14207 ..QNYVSDISSFLQDEGDNKLKLRFDVQYAPKELITVYVVDKQ.LVVEGKH.DEMEDG
Q9VL41_DmCG13133 ..VVIEGTGTEPDSLGRGT...FKVYLDVHEFQISELITVYVVDKQ.LVVEGKH.DEMEDG
Q9VSA9_DmCG7409 .....APDLSRVVKGKG...FEANVDVHLFQYELISVYVVDKQ.LVVEGKH.DEMEDG
Q9VSK2_DmCG4461 .....YSGERVHDEKG...FRIDLDVRFQFQELITVYVVDKQ.LVVEGKH.DEMEDG
M9PCC9_DmCG43851 .....MRTKGEKEN...VSMETDMRDFPIENICLQLKQSH.IVYVVDKQ.LVVEGKH.DEMEDG
```

Diagram showing domain structure for CTE with beta-strands (β6, β7, β8, β9) and turns (TT, η2, η3, η5). The sequence alignment below shows conserved residues across species.

```
P02518_DmHap27 .....NDKWRHVERSSGKTVLRRL.LLEDAKVEEVVAGL..EESCRLLEVTIDK...AEVKK...PE
Q41560_Hap16.9_WHEAT H.GM....IQNVVRRKYLKGFDPNVEVQTVGSSVGLKLP...PPSKEQ...AKS
P02518_DmHap27 QGGY....SSNFFLRRFVLEGEADKVTSTLSSGGLTISVFN...PPGQEQ...TLK
P02516_DmHap23 H.GF....ITRNVVRRYALPFGYEAADKVAISTLSSGGLTISVFN...PPAIED...KGN
P02517_DmHap26 H.GH....IMRNVVRRYKVPDGYKAEQVVSQSLSSGGLTISVFN...PQAVED...KSK
P82147_Dm12ef1 H.GY....VSNVRRYKYLKSDVNPDTVTSLSGGLTISVFN...MKALPFPQTE...
P05812_DmHap67Ba H.GV....ISRNVIRKYILPKGYDPNVEVQTVGSSVGLTISVFN...PLPVVKGSLERQ
P22979_DmHap67Bc H.GH....VSNVRRYKYLKGFDPNVEVQTVGSSVGLTISVFN...LVSKEE...LK
Q81QW5_DmCG14207 KSVY....NEVNRKYLKGFDPNVEVQTVGSSVGLTISVFN...PALTA...G
Q9VL41_DmCG13133 GQLC....ITRNVRSYKYLPRHYDATQARATFSADGCMITVPA...PPKLOD...V
Q9VSA9_DmCG7409 D.IF....VGNVIRKYILPRGYDPNVEVQTVGSSVGLTISVFN...YLTN
Q9VSK2_DmCG4461 SNGL....VSNVRRYKYLPRGYNANEVQTVGSSVGLTISVFN...PPFARY...YTPG
M9PCC9_DmCG43851 .....KNVIRKYLKGFDPNVEVQTVGSSVGLTISVFN...VSPISD...NQK
```

CTE

```
Q41560_Hap16.9_WHEAT VKAIDTSG.....APEAGDGKAENGSGEKMETSK
P02518_DmHap27 ERIVQIQQTGPANLSVKAP.....AKKSAEFPNDKAAASQ.....
P02515_DmHap22 ERIVQIQVGPANLNKVEN.....PKEAVEQDNGNDK.....
P02516_DmHap23 ERIVQIQVGPANLNKVEN.....PKEAVEQDNGNDK.....
P82147_Dm12ef1 ERIVQIQVGPANLNKVEN.....PKEAVEQDNGNDK.....
P05812_DmHap67Ba ERIVQIQVGPANLNKVEN.....PKEAVEQDNGNDK.....
P22979_DmHap67Bc ERIVQIQVGPANLNKVEN.....PKEAVEQDNGNDK.....
Q81QW5_DmCG14207 ERIVQIQVGPANLNKVEN.....PKEAVEQDNGNDK.....
Q9VL41_DmCG13133 ERIVQIQVGPANLNKVEN.....PKEAVEQDNGNDK.....
Q9VSA9_DmCG7409 ERIVQIQVGPANLNKVEN.....PKEAVEQDNGNDK.....
Q9VSK2_DmCG4461 ERIVQIQVGPANLNKVEN.....PKEAVEQDNGNDK.....
M9PCC9_DmCG43851 ERIVQIQVGPANLNKVEN.....PKEAVEQDNGNDK.....
```

Figure 1.5 : Alignement des séquences des petites protéines de stress chez *Drosophila melanogaster*.

L'alignement est généré en utilisant MUSCLE. Les numéros d'accèsion UniProt des séquences utilisées dans les alignements sont indiqués. La structure secondaire du domaine ACD prédit de DmHsp27 (Moutaoufik et al., 2016) et de Hsp16.9 du blé (PDB: 1GME (van Montfort et al., 2001b) est indiquée en haut. Tête de flèche noire indique la position de la boucle contenant le brin β 6 manquante.

1.3.2 Localisation intracellulaire de DmsHsps

De façon similaire aux sHsps chez les plantes, les DmsHsps ont différentes localisations intracellulaires. DmHsp22 est située dans la matrice mitochondriale (Morrow et al., 2000b), DmHsp27 est nucléaire (Beaulieu et al., 1989b, Michaud et al., 2008) et les autres sHsps étudiées sont cytoplasmiques (Vos, 2009, Zhang et al., 2011b, Michaud et al., 2002, Zhang et al., 2011a) (Tableau 1.3). L'analyse de la séquence de CG43851 prédit une localisation nucléaire ou cytoplasmique en fonction de l'outil de prédiction utilisé (Morrow and Tanguay, 2015). Le fait que chez la drosophile, les sHsps sont localisées dans différents compartiments fait penser que leur navette à d'autres compartiments cellulaires n'est pas nécessaire. Récemment, DmHsp26 a été trouvée dans la matrice nucléaire des cellules S2 (*Drosophila Schneider* 2) et des embryons avec l'expression de DmHsp27 (Kallappagoudar et al., 2010). Ceci est le premier rapport montrant une localisation nucléaire pour cette protéine décrite comme cytoplasmique. Cependant, deux explications possibles : 1) vu que DmHsp26 a été trouvée avec DmHsp27 nucléaire ouvre la possibilité de la formation d'un hétérodimère, 2) possibilité d'une modification post-traductionnelle, par phosphorylation par exemple qui permettrait une double localisation cytoplasmique/nucléaire comme ce qui a été signalé pour HspB5 dans certains types de cellules non stressées (den Engelsman et al., 2013, Morrow and Tanguay, 2015). Cependant, DmHsp27 se trouve dans le noyau grâce à la présence d'un signal de localisation nucléaire (NLS) (Michaud et al., 2008).

Numéro CG	Nom	Taille en kDa	Modifications post-traductionnelles	Localisation intracellulaire
CG14207	-	4 transcrits (21.8/20.8/17.2/17.1)	1 phosphoserine (Bodenmiller et al., 2007)	Cytoplasmique (Zhang et al., 2011a, Vos, 2009)
CG43851	-	16.9	ND	Cytoplasmique (Morrow and Tanguay, 2015)
CG13133	-	24.5	ND	Cytoplasmique (Vos, 2009, Zhang et al., 2011a)
CG4533	l(2)efl	2 transcrits (21.3/17.2)	ND	Cytoplasmique (Vos, 2009, Zhang et al., 2011a)
CG7409	-	18.0	ND	Cytoplasmique (Vos, 2009, Zhang et al.,

				2011a)
CG4461	-	23.8	ND	Cytoplasmique (Vos, 2009, Zhang et al., 2011a)
CG4167	Hsp67Ba	26.6	ND	Cytoplasmique (Vos, 2009, Zhang et al., 2011a)
CG4183	Hsp26	23.0	5 formes (Marin et al., 1993)/3phospho- serines (Bodenmiller et al., 2007)	Cytoplasmique (Vos, 2009, Zhang et al., 2011a, Michaud et al., 2002)
CG4190	Hsp67Bc	22.2	ND	Cytoplasmique (Vos, 2009, Zhang et al., 2011a)
CG4460	Hsp22	19.8	1 phospho- threonine (Zhai et al., 2008)	Mitochondriale (Morrow et al., 2000a)

CG4463	Hsp23	20.6	2 formes (Marin et al., 1996b)	Cytoplasmique (Vos, 2009, Zhang et al., 2011a, Michaud et al., 2002)
CG4466	Hsp27	23.6	4 formes (Marin et al., 1996a)/3 phospho-serines (Bodenmiller et al., 2007)	Nucléaire (Beaulieu et al., 1989b, Michaud et al., 2008)

Tableau 1-3: Les sHsps chez *Drosophila melanogaster*.

1.3.3 Expression des sHsps au cours du développement de la drosophile

L'expression des DmsHsps durant le développement en absence de stress se fait de façon non coordonnée. DmHsp22, DmHsp23, DmHsp26, DmHsp27, DmHsp67Ba, DmHsp67Bc et l(2)efl présentent des niveaux d'expression variables selon le tissu et le stade de développement (Michaud et al., 2002). Elles sont surtout présentes dans la lignée germinale, le système nerveux et les cellules musculaires et sont induites par l'hormone ecdysone. L'expression de CG14207 est limitée à des cellules musculaires fondatrices et au myoblastes somatiques dans l'embryogenèse (Artero et al., 2003, Estrada et al., 2006, Tomancak et al., 2007). Il faut noter qu'aucune expression au cours du développement de la drosophile n'a été reportée pour CG13133, CG7409, CG4461 et CG43851. Le seul indice dont on dispose est le niveau d'expression d'ARNm (Celniker et al., 2009, Chintapalli et al., 2007, Morrow and Tanguay, 2015). Au niveau fonctionnel les DmsHsps peuvent être impliquées dans plusieurs processus cellulaires. DmHsp23, DmHsp26 et DmHsp27 semblent être impliquées dans la morphogenèse de l'embryon

(Fisher et al., 2008, Goldstein and Gunawardena, 2000, Gong et al., 2004, Hughes et al., 2008). DmHsp23 est associée avec des lignées neurales et gliales (Michaud and Tanguay, 2003) et a été identifiée dans un criblage protéomique visant à identifier les protéines impliquées dans la formation du sillon ventral (Gong et al., 2004). En outre, Hsp26 interagit avec la myosine 10A, une protéine impliquée dans le maintien d'équilibre entre l'actine et microtubule (Liu et al., 2008). Ceci place DmHsp26 dans la même catégorie que HspB1, HspB5 et HspB6 qui sont impliquées dans l'organisation et la régulation de l'actine (Morrow and Tanguay, 2015). Une interaction au niveau des ovaires entre DmHsp27 et *vreteno* (Handler et al., 2011, Zamparini et al., 2011), un des quatre facteurs requis pour l'interaction de l'ARN-Piwi (piRNA) dans les ovaires permet de penser à la possibilité que DmHsp27 joue un rôle dans l'inactivation des ARN (RNA silencing) dans les ovaires, d'autant que cela concorde avec la spécificité d'expression de DmHsp27 lors de l'ovogenèse (Marin and Tanguay, 1996). Il est intéressant de noter que DmHsp27 montre une localisation intracellulaire différente durant l'ovogenèse : du stade germarium jusqu'au stade 6, DmHsp27 est localisée dans le noyau de cellules nourricières alors qu'elle présente une localisation périnucléaire et cytoplasmique à partir du stade 8 jusqu'au stade 12 (Marin and Tanguay, 1996). Le mécanisme responsable de cette localisation cytoplasmique n'est pas connu. Par contre, cette localisation pourrait être requise pour le transport de DmHsp27 des cellules nourricières vers l'oocyte au stade 10 lorsque les cytoplasmes des cellules nourricières se déversent dans l'oocyte (Marin and Tanguay, 1996).

DmHsp27 est impliquée aussi dans le développement de l'œil et l'abolition de son expression donnant un phénotype d'œil rugueux avec des ommatidies fusionnées et élargies (Chen et al., 2012). Le mécanisme par lequel DmHsp27 régule le développement de l'œil reste inconnu.

Bien que l'expression de sHsps soit étroitement régulée au cours du développement, la délétion de l'une ou l'autre n'a pas d'effets délétères. Ceci est testé pour CG14207, DmHsp22, DmHsp23 et DmHsp27, ce qui suggère un rôle non essentiel de ces DmsHsps au cours du développement de la mouche (Hao et al., 2007, Michaud and Tanguay, 2003, Morrow et al., 2004, Zimmermann et al., 2006). La perte de 7 DmsHsps par suppression du locus 67B n'a pas d'effet délétère au cours du développement (Geiger-

Thornsberry and Mackay, 2004). DmHsp22, DmHsp67Ba et DmHsp67Bc jouent un rôle dans la stabilité phénotypique à différentes conditions environnementales (Takahashi et al., 2010).

Chez les mouches adultes, lors du développement les DmsHsps montrent aussi une expression tissu-spécifique. La plupart de DmsHsps sont exprimées au niveau des gonades, système nerveux et muscles (Kapelnikov et al., 2008, McGraw et al., 2008, Michaud et al., 2002). Si la délétion de l'expression de DmsHsps n'a pas d'effets délétères sur le développement de l'embryon, elle affecte la durée de vie des mouches adultes (Morrow et al., 2004, Landis et al., 2012, Zou et al., 2000, Hao et al., 2007, Liao et al., 2008). En effet, l'élimination de l'expression de DmHsp22, DmHsp23 ou DmHsp27 conduit à une diminution de la durée de vie. Les mouches qui n'expriment pas DmHsp27 sont plus sensibles à la famine et aux infections (Chen et al., 2010b, Hao et al., 2007). Lors du vieillissement l'expression de DmsHsps augmente sauf pour CG7409 et CG4461 (Morrow and Tanguay, 2015). En conséquence, la surexpression de l(2)efl, DmHsp22, DmHsp23, DmHsp26 et DmHsp27 montrent une augmentation de la durée de vie (Morrow and Tanguay, 2015). Toutes les DmsHsps sont régulées lors du vieillissement. On observe une augmentation de CG14207, L(2)EFL, DmHsp67Bc, DmHsp22, DmHsp23, DmHsp26 et DmHsp27 alors que CG7409 et CG4461 diminuent lors du vieillissement (Landis et al., 2012, Morrow and Tanguay, 2015). Une expression précoce de DmHsp22 et DmHsp23 est observée chez des mouches sélectionnées génétiquement pour augmenter la longévité (Kurapati et al., 2000, Zhao et al., 2005). L'inhibition de DmHsp22, DmHsp23 et DmHsp27 diminue la longévité ce qui suggère un rôle important de DmsHsps lors du vieillissement (Morrow et al., 2004).

Pour conclure sur ces différents points, l'expression âge et tissu-dépendante des sHsps reflète l'existence d'une fonction spécifique pour chaque DmsHsps selon sa localisation, le tissu d'expression et le stade de développement. Bien que DmHsp22, DmHsp23, DmHsp26 et DmHsp27 restent les plus étudiées chez la drosophile, les recherches sur les autres membres vont aider à la compréhension de la diversité des DmsHsps. Leurs profils d'expression lors du développement, la localisation intracellulaire et la spécificité des substrats, suggèrent que la variation de séquence d'acides aminés (surtout NTR et CTE) puisse être importante pour la détermination de la structure et la

fonction. Étant donné la diversification des fonctions de DmsHsps, beaucoup de travail reste à faire pour comprendre les mécanismes de ses fonctions.

1.3.4 Induction des DmsHsps lors du stress

Les quatre DmsHsps les plus étudiées (DmHsp22, DmHsp23, DmHsp26 et DmHsp27) sont fortement inductibles suite à un choc thermique (Marin et al., 1996a, Michaud et al., 1997a). Une étude récente a montré que seulement CG14207 et CG13133 ne sont pas inductibles par la chaleur (Vos et al., 2016) en utilisant des cellules S2. S'il est admis que toutes les cellules sont capables d'induire les sHsps suite à un stress thermique, le préblastoderme du jeune embryon de *D.melanogaster* présente une exception à cette règle suite au choc thermique (Dura, 1981). En plus, l'induction des DmsHsps suite au stress dépend du type cellulaire et du stade de développement. Par exemple dans l'œil de drosophile DmHsp23 est induite seulement dans les cônes, alors que DmHsp27 et DmHsp26 sont exprimées dans tous les types cellulaires de l'ommatidium (Marin et al., 1996a). Aussi dans les testicules DmHsp23 et DmHsp27 ne sont pas induites par le choc thermique (Michaud et al., 1997b), alors que suite au choc thermique l'embryon exprime DmHsp22, DmHsp26, DmHsp27 et DmHsp67Bc (Leemans et al., 2000), les mouches de 10 jours expriment en plus DmHsp76Ba, CG7409 et Dml(2)efl (Landis et al., 2012).

Il est important de signaler que DmHsp22, DmHsp23, DmHsp26 et DmHsp27 sont induites par le froid (Colinet et al., 2010a, Colinet et al., 2010b, Colinet et al., 2013, Zhang et al., 2011b) et cela semble suggérer que ces DmsHsps peuvent avoir un rôle dans l'adaptation climatique. Des études sur des drosophiles subsahariennes et européennes montrent une surexpression de CG7409 dans les drosophiles africaines et DmHsp23 dans les drosophiles européennes (Catalan et al., 2012, Muller et al., 2011). Ces variations de l'expression génique peuvent être utilisées comme marqueur de sélection/adaptation aux conditions de l'environnement.

1.3.5 Modification post-traductionnelles des sHsps de drosophile

Cinq des 12 DmsHsps sont reconnues pour être sujettes à des modifications post-traductionnelles. DmHsp22 présente deux isoformes avec une phospho-threonine (Zhai et al., 2008). Il existe 2 isoformes pour DmHsp23 nommées isoforme a et b (Marin et al., 1996b). Pour DmHsp26 Marin et al. 1993, ont rapporté l'existence de 5 isoformes avec 3 sérines qui peuvent être phosphorylées (Bodenmiller et al., 2007). DmHsp27 est présente sous quatre isoformes (Marin et al., 1996b) dont 3 phosphoserines ont été identifiées (Bodenmiller et al., 2007, Zhai et al., 2008). CG14207 présente une seule forme avec une phosphoserine (Bodenmiller et al., 2007). Toutes ces isoformes montrent une expression différentielle selon le stade de développement. Pour DmHsp23 les deux isoformes sont présentes de façon constitutive dans la tête et les testicules des drosophiles de 0 à 6 jours, alors que seule l'isoforme « a » est présente en faible quantité dans les ovaires (Marin et al., 1996b). Cependant, suite à un choc thermique, on note l'apparition de l'isoforme « b » dans les ovaires et de l'isoforme « a » dans les muscles thoraciques. Pour DmHsp27 on retrouve de façon constitutive les quatre isoformes dans la tête et les testicules alors que l'on observe seulement les formes non et di-phosphorylées dans les ovaires des mouches adultes (Marin et al., 1996b). Le choc thermique mène à l'apparition de formes supplémentaires absentes en conditions normales, comme dans les ovaires où l'isoforme mono-phosphorylée fait son apparition suite au stress. On ignore l'effet de la phosphorylation sur la structure et la fonction chaperon des DmsHsps. Dans le chapitre 4 j'ai étudié l'effet de la phosphorylation sur DmHsp27.

1.3.6 Activités biologiques des DmsHsps

Les fonctions des DmsHsps sont mal connues, mais il est probable que ces fonctions soient liées à l'activité de chaperon moléculaire que possèdent ces protéines. *In vitro*, DmHsp22, DmHsp23, DmHsp26 et DmHsp27 peuvent prévenir l'agrégation induite par la chaleur du citrate synthase et de la luciférase et les maintenir dans un état natif (Morrow et al., 2006). La capacité chaperon a été testée *in vivo* en utilisant luciférase et EGFP-Htt-Q119 comme substrats (Vos et al., 2016). CG14207 et CG7409

ont une forte capacité pour faciliter le repliement de la luciférase dénaturée par la chaleur, DmHsp23, DmHsp26 et DmHsp27 ont une capacité moyenne, DmL(2)EFL est moins efficace alors que DmHsp67Ba, DmHsp67Bc, CG4461 et CG13133 n'ont aucun effet sur la renaturation de la luciférase (Vos et al., 2016). DmHsp27 et CG14207 ont la capacité de prévenir l'agrégation de la luciférase qui est partiellement dépendante de la machinerie de Hsp70 (Vos et al., 2016).

DmHsp67Bc active l'autophagie pour éliminer les agrégats de haut poids moléculaire (Carra et al., 2010). Cette activation se produit via la liaison de la starvine (d'une façon similaire à la liaison HspB8 et Bag3) (Carra et al., 2010, Carra et al., 2009). Un rôle des DmsHsps dans la réponse immunitaire a été suggéré. La défense de drosophile contre les agents pathogènes implique la voie de signalisation p38 MAPK (Eleftherianos and Castillo, 2012, Kingsolver et al., 2013), ce qui se traduit par l'activation du facteur de transcription HSF et une expression de DmHsp26, DmHsp27, DmHsp60D et DmHsp70Bc pour activer la défense de l'hôte (Chen et al., 2010b). En accord avec cela, les mouches sans DmHsp27 sont plus susceptibles à l'infection pathogène (Chen et al., 2010b, Hao et al., 2007). De même, DmHsp27 réduit la létalité induite par le facteur pro-apoptotique Hid (Head involution defective) (Liao et al., 2008). Alors que DmHSP26 interagit avec ack (activated Cdc42 kinase), une protéine anti-apoptotique (Schoenherr et al., 2012).

En résumé, l'augmentation du nombre de structures 3D des sHsps disponibles a permis une meilleure compréhension de la corrélation entre l'activité chaperon de sHsps et leur dynamique. Néanmoins, nous sommes encore loin de comprendre les détails mécanistiques et les différences entre les divers membres de la famille sHsps. Il n'est pas clair comment différents types d'assemblages peuvent être réalisés par des variations de séquences au niveau de la région N-terminale. En outre, il est énigmatique pourquoi il existe des différences dans le nombre de sous-unités par oligomères, ce que pourrait être les conséquences fonctionnelles et quels sont les limitations des paramètres structurelles. Finalement, les principaux aspects importants de reconnaissance et liaison du substrat et comment le réassemblage sHsps-substrats est organisé, sont encore un mystère. Toutes ces questions ouvertes laissent des perspectives intéressantes pour les années à venir.

Problématique et objectifs

L'un des objectifs à long terme du laboratoire est de comprendre la relation entre la structure et les fonctions des sHsps en utilisant comme modèle *Drosophila melanogaster*, afin de déterminer si la fonction de chaperon peut expliquer les effets dans de nombreux processus biologiques et de dévoiler les raisons de la spécificité d'expression.

Le cas particulier de DmHsp27 est intéressant en raison de sa localisation nucléaire dans le sens où peu de sHsps présentent à ce jour une localisation nucléaire en conditions physiologique. Cette localisation nucléaire est intéressante d'autant plus qu'aucune fonction spécifique n'a encore été identifiée. Le rôle de chaperon moléculaire joué par DmHsp27 et son induction durant le développement embryonnaire laissent cependant présumer que cette protéine remplit des fonctions cellulaires importantes qui pourraient être distinctes de son activité chaperon induite par le stress.

Cependant, peu de données biochimiques ont été publiées sur DmHsp27. L'objectif de cette thèse de doctorat est l'élucidation structural et fonctionnelle de DmHsp27 à travers l'étude de :

- 1- L'oligomérisation de DmHsp27.
- 2- La fonction chaperon des différents assemblages de DmHsp27 et l'identification des résidus et domaines protéiques essentiels dans la structure et la fonction chaperon de la protéine.
- 3- Lien entre la structure et la fonction de chaperon de DmHsp27 suite au stress thermique.

Chapitre 2 : Analyses des sHsps nucléaires chez les insectes

2.1 Introduction

Le noyau est l'organelle cellulaire qui distingue les eucaryotes des procaryotes. Il est séparé du cytoplasme par une double membrane, la membrane extérieure étant en continuité avec le réticulum endoplasmique. Une grande partie des activités biologiques se passe au noyau, entre autres la réplication et la réparation des dommages de l'ADN, la biogenèse des ribosomes, la transcription, l'épissage alternatif, les modifications de l'ARN et de l'ADN. La translocation des protéines en continu entre le noyau et le cytoplasme est connue. Ce transport nucléocytoplasmique se fait via une famille de facteurs bien conservés à travers les espèces : les karyophérines β . Celles-ci peuvent participer à l'import nucléaire via les importines, ou à l'export nucléaire par les exportines.

Les petites protéines de stress/Small heat shock proteins (sHsps) sont des chaperons moléculaires ATP-indépendants ubiquitaires retrouvées chez tous les règnes du vivant (Maaroufi and Tanguay, 2013, Kriehuber et al., 2010). Pour les sHsps cytosoliques, la relocalisation dans le noyau est observée dans certaines conditions de stress chez pratiquement tous les mammifères (Arrigo and Ahmad-Zadeh, 1981, Borrelli et al., 2002, van de Klundert and de Jong, 1999), mais ce comportement est distinct des sHsps nucléaires qui sont présentes tout le temps dans le noyau chez les plantes et *Drosophila melanogaster*, grâce à un signal de ciblage nucléaire (NLS : Nuclear Localization Signal) (Siddique et al., 2008, Siddique et al., 2003, Scharf et al., 2001, Michaud et al., 2008). La différence entre la localisation nucléaire des sHsps chez les mammifères, plantes et *D.melanogaster* suggère qu'elles s'adaptent à leurs environnements et à leurs besoins cellulaires spécifiques. Alors qu'on connaît l'existence de plusieurs membres de sHsps avec un NLS chez les plantes, le seul membre décrit chez les insectes jusqu'à aujourd'hui reste DmHsp27. Le but de ce chapitre est de répondre à la question s'il existe d'autres membres de sHsps avec une localisation nucléaire chez les insectes et d'étudier par la suite la particularité de cette classe de sHsps.

2.2 Matériel et méthodes

2.2.1 Extraction des séquences de petites protéines de choc thermique nucléaire chez les insectes

Toutes les séquences de protéines d'insectes contenant le domaine alpha-cristallin (ACD numéro d'accession PF00011) sont extraites avec les outils HMMER (<http://hmmer.org/>) et pfam (<http://pfam.xfam.org/family/HSP20#tabview=tab1>) (Finn et al., 2011, Finn et al., 2014). Les protéines contenant le terme "fragment" dans leur description sont enlevées. Par la suite les séquences potentiellement nucléaires sont extraites suite à un alignement avec DmHsp27 pour déterminer la présence ou non du NLS.

2.2.2 Alignement et LOGOS

Les séquences sont alignées avec les paramètres par défaut MUSCLE (McWilliam et al., 2013). Les structures secondaires de l'alignement généré par ESPript (Robert and Gouet, 2014), selon la structure prédite du domaine ACD de DmHsp27 (Moutaoufik et al., 2016). Les numéros d'accession UniProt des séquences utilisées dans les alignements sont indiqués. Pour identifier les régions conservées, j'ai utilisé le programme WebLogo 3 (Crooks et al., 2004) pour créer des blocs (LOGOS) de résidus conservés à partir de l'alignement des séquences multiples de protéines .

2.2.3 Phylogénétique moléculaire

Les arbres phylogénétiques ont été construits avec MEGA7 (Tamura et al., 2013) en utilisant des alignements multiples de séquences. Les relations phylogénétiques sont obtenues par maximum de vraisemblance en utilisant le modèle de substitution WAG (Whelan and Goldman, 2001) et 1000 répliques bootstrap.

2.3 Résultats et discussion

La détermination de la localisation cellulaire des protéines est importante pour la compréhension des fonctions biologiques. Dans cette étude, je me suis intéressé à la localisation nucléaire des petites protéines de choc thermique chez les insectes. DmHsp27 de *D.melanogaster* a été le premier sHsp nucléaire étudiée (Beaulieu et al., 1989b). Depuis cette découverte d'autres sHsps en particulier chez les plantes montrent une localisation nucléaire tels que *Solanum peruvianum* LpHsp16.1, *Arabidopsis thaliana* AtHsp17.4, *Gossypium arboreum* GaHsp17.3, *Medicago truncatula* MtHsp17.1, *Lactuca sativa* LsHsp17.8, *Triticum aestivum* TaHsp19.0, *Hordeum vulgare* HvHsp19.1, et *Oryza sativa* OsHsp18.6 (Siddique et al., 2008, Siddique et al., 2003, Scharf et al., 2001).

L'importation de protéines dans le noyau dépend d'un signal de ciblage nucléaire (NLS) et les membres de la superfamille du récepteur de transport nucléaire (importine). Chez les plantes la localisation nucléaire dépend de la voie classique appelée (NLS riche en lysine) grâce à une courte séquence (N(G)KRKR) entre les brins β 5 et 6 dans le domaine ACD conservée (Siddique et al., 2003). Ce mode nécessite l'importine α , pour servir de pont entre le NLS et le récepteur d'importine β (Gorlich, 1997, Nigg, 1997, Ohno et al., 1998, Palmeri and Malim, 1999). Chez DmHsp27, le motif NLS (appelée riche en arginine) est composé de trois arginines (54-55-56) dans la région N-terminale non conservée (Michaud et al., 2008). Le comportement différent des simples, doubles et triples mutants suggère que ces arginines forment deux groupes fonctionnels. Un groupe contient les arginines 54 et 55 alors que l'autre groupe est formé par l'arginine 56. Si au moins un groupe est actif (pas de mutation d'arginine) la localisation est nucléaire. L'inactivation des deux groupes par mutation conduit à une localisation cytoplasmique de DmHsp27. Le NLS riche en arginine utilise l'importine β directement pour l'importation par un mécanisme indépendant de l'importine α (Palmeri and Malim, 1999).

L'intérêt d'étudier la localisation nucléaire de sHsps chez les insectes et particulièrement la drosophile, se base sur le fait que la région NTR a été rapportée comme une région désordonnée non conservée chez les sHsps (Poulain et al., 2010, McHaourab et al., 2009). Par conséquent, la localisation d'un NLS dans cette région est surprenante. Dans ce travail, j'ai identifié et caractérisé les sHsps nucléaires chez les

insectes afin de définir la particularité de ces protéines.

2.3.1 Les sHsps nucléaires chez les insectes

Il est admis que la présence du domaine ACD conservée est un critère suffisant pour l'attribution d'une séquence à la famille de sHsp (Caspers et al., 1995). J'ai obtenu 628 séquences contenant ACD chez les insectes. Seulement 28 séquences montrent un NLS riche en arginine dans la partie NTR (Tableau 2.1). La potentielle localisation nucléaire des séquences obtenues est confirmée par deux outils : ProtComp v. 9.0 (<http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=protcomppl&group=help&subgroup=proloc>) basée sur une comparaison directe avec une base de protéines homologues ayant une localisation connue et Euk-mPLOC (Chou and Shen, 2007, Chou and Shen, 2008) un outil puissant développé en hybridant les informations des domaines fonctionnels, et de l'information de l'évolution séquentielle.

Nom	Uniprot ID	Espèce	Poids moléculaire théorique	Localisation de NLS
Hsp 27	P02518	<i>Drosophila melanogaster</i>	23616.6	Arg 54,55,56
l(2)efl	A0A0J7K2I6	<i>Lasius niger</i>	3398.42	Arg 53-54
l(2)efl	A0A0N0BG57	<i>Melipona quadrifasciata</i>	26244.03	Arg 52-53
ND	K7IXH9	<i>Nasonia vitripennis</i>	22277.49	Arg 50-52
Hsp27	B3GK93	<i>Ceratitis capitata</i>	23944.24	Arg 54-55-56
Hsp27	A0A0K8UP97	<i>Bactrocera latifrons</i>	24037.31	Arg 53-54-55
Hsp20	I1T1H1	<i>Bactrocera dorsalis</i>	23831.06	Arg 51-52-53
Hsp27	A0A0A1XCZ4	<i>Bactrocera cucurbitae</i>	23920.18	Arg 53-54-55
Hsp20	T1PAE8	<i>Musca domestica</i>	24364.49	Arg 52-53
ND	Q16S79	<i>Aedes aegypti</i>	21912.46	Arg 57-58
Hsp25	A1E385	<i>Sarcophaga crassipalpis</i>	24982.00	Arg 60-61
Hsp27	A0A0L0CSL4	<i>Lucilia cuprina</i>	23330.55	Arg 57-58-58
Hsp27	F5B962	<i>Drosophila repletoides</i>	24503.6	Arg 48,49,50
Hsp27	A0A0M4EGE5	<i>Drosophila busckii</i>	24444.62	Arg 51-52-52
GI13087	B4L112	<i>Drosophila mojavensis</i>	23459.5	Arg 51,52,53
GJ13835	B4LGS9	<i>Drosophila virilis</i>	23791.9	Arg 51,52,53
Hsp27	A9UEZ2	<i>Drosophila buzzatii</i>	23694.7	Arg 51,52,53
Hsp27	F5B960	<i>Drosophila albomicans</i>	24770	Arg 52,53,54

Hsp27	F5B961	<i>Drosophila sulfurigaster albostrigata</i>	24674.9	Arg 52,53,54
GE20833	B4PEX9	<i>Drosophila yakuba</i>	23593.6	Arg 54,55,56
GM25143	B4HKP4	<i>Drosophila sechellia</i>	23624.6	Arg 54,55,56
GG15371	B3NCF2	<i>Drosophila erecta</i>	23649.6	Arg 54,55,56
GD14177	B4QN53	<i>Drosophila simulans</i>	23565.5	Arg 54,55,56
GH17009	B4IYY1	<i>Drosophila grimshawi</i>	24441.5	Arg 54,55,56
GF10692	B3M6F4	<i>Drosophila ananassae</i>	24489.6	Arg 57,58,59
GA18205	Q29F98	<i>Drosophila pseudoobscura pseudoobscura</i>	25041.1	Arg 58,59,60
GK17637	B4MN48	<i>Drosophila willistoni</i>	25284.5	Arg 58,59,60
GL22445	B4H1L8	<i>Drosophila persimilis</i>	25041.1	Arg 58,59,60

Tableau 2-1 : Les sHsps nucléaires chez les insectes.

2.3.2 Analyse des sHsps nucléaires chez les insectes

L'analyse par alignement des séquences a révélé que les motifs caractéristiques de sHsps sont conservés. Tel est le cas de l'arginine associée à des pathologies humaines dans le brin β 6+7 (figure 2.1 : étoile noire) (Vicart et al., 1998, Wang et al., 2001) et le motif conservé CAM (C-terminal anchoring motif), impliqué dans l'inter-dimère (de Jong et al., 1998, van Montfort et al., 2001b, Stamler et al., 2005).

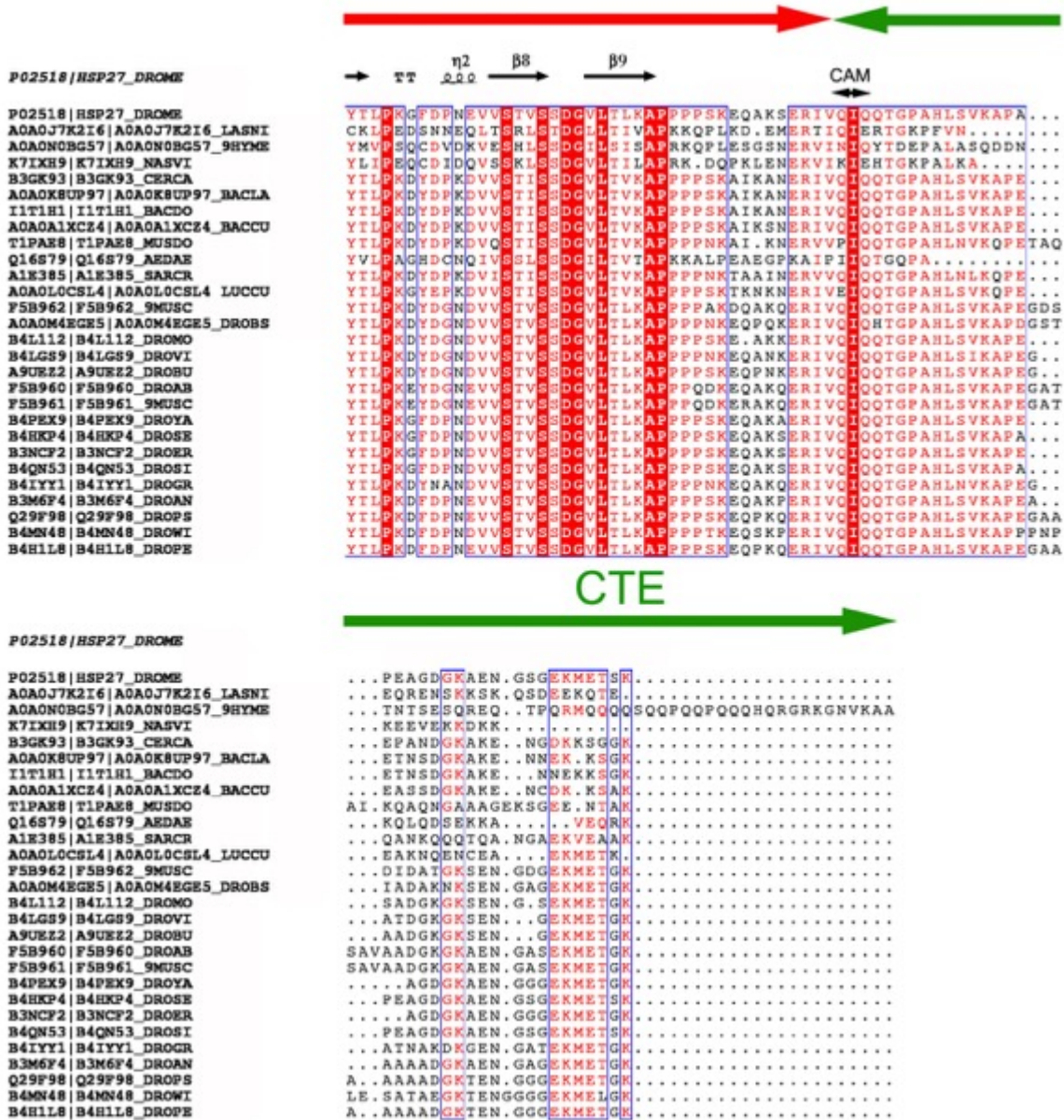


Figure 2.1 : Alignement de séquence des petites protéines de stress chez les insectes.

L'alignement est généré en utilisant MUSCLE. Les numéros d'accèsion UniProt des séquences utilisées dans les alignements sont indiqués. La structure secondaire du domaine ACD prédit de DmHsp27 (Moutaoufik et al., 2016) est indiquée en haut. La région N-terminale montre la conservation des arginines composant le NLS. Le CAM I/V-X-I/L/V dans l'extension C -terminale et l'arginine conservée dans le brin Beta 6+7 est indiquée par une étoile noire.

En général les sHsps se caractérisent par la présence d'un domaine central alpha-cristallin ACD conservé entouré d'une région N-terminale (NTR) et d'une extension C-terminale (CTE) (Figure 2.2 a). L'analyse de la région NTR montre une longueur moyenne de 88.5 (± 3.4) avec surreprésentation de phénylalanine, leucine, histidine et arginine et absence de cystéine et lysine dans la majorité des séquences (Figure 2.2 b). Il est important de souligner que les régions riches en phénylalanine dans la région N-terminale, ont été proposées pour être impliquées dans la liaison de substrat (Haslbeck et al., 2004b, Van Montfort et al., 2001a).

Le domaine ACD présente une longueur moyenne de 91.9 (± 0.25), tel que rapporté dans la littérature ; la longueur de l'ACD est plus constante que les deux autres régions. En revanche, dans le domaine ACD un enrichissement significatif des résidus chargés positivement et négativement est observé, alors que les résidus polaires et aromatiques sont sous-représentés et il y a absence de tryptophane dans la majorité des séquences (Figure 2.2 c). Toutes les sHsps nucléaires étudiées présentent une cystéine dans le domaine ACD suggérant que dans des conditions oxydantes des ponts disulfures entre deux ACD peuvent être impliqués dans l'interface du dimère (Baranova et al., 2011). L'extension CTE, la région la plus courte montre une longueur moyenne de 37.5 (± 2.9) avec une sous-représentation des acides aminés aromatiques et de cystéine (Figure 4.2d). Ces données sont en accord avec une étude précédente par (Kriehuber et al., 2010) et cela montre une conservation des caractéristiques générales des sHsps.

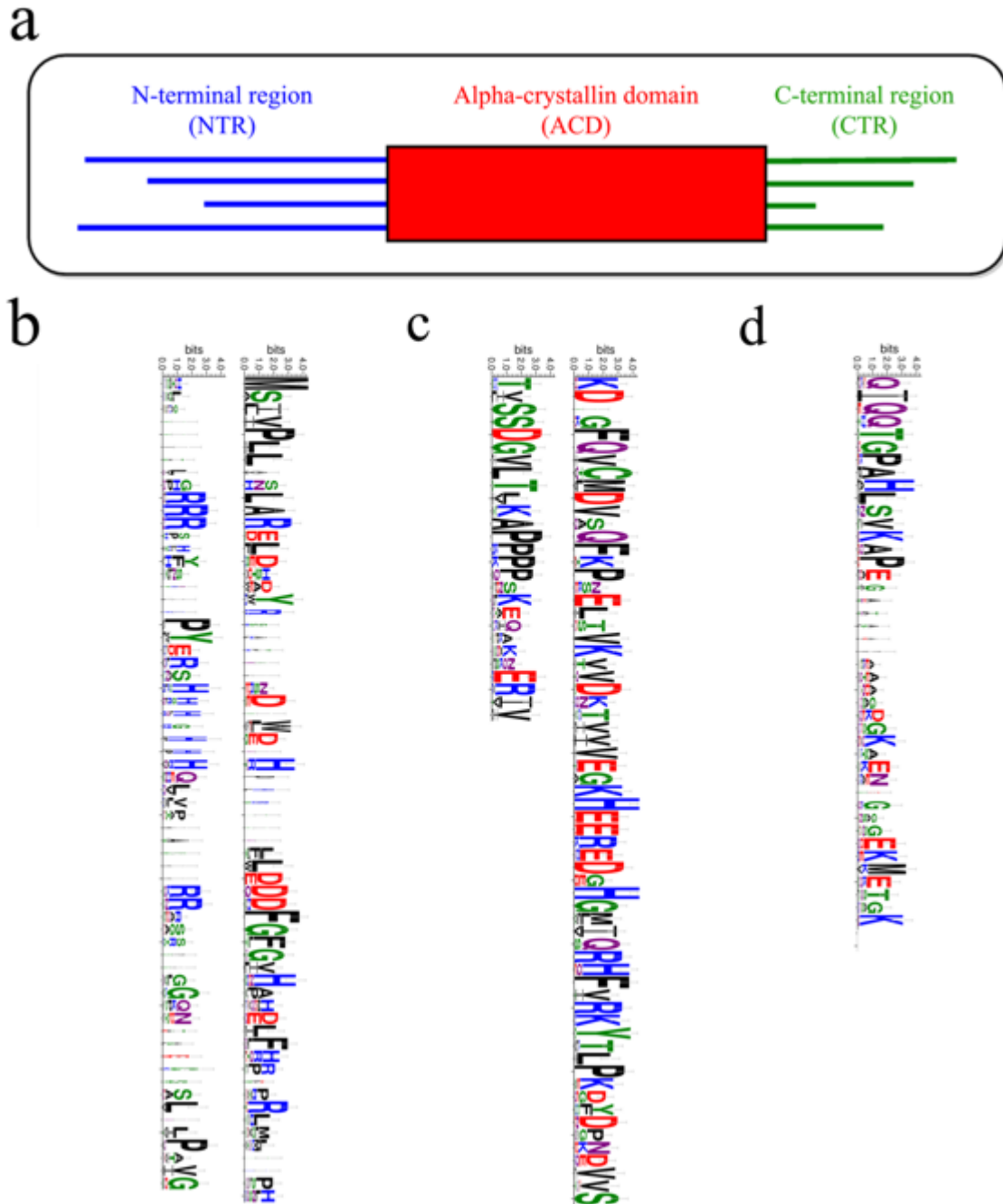


Figure 2.2 : Analyses des petites protéines de stress nucléaires chez les insectes.

a- Architecture des petites protéines de stress (sHsps). En général les sHsps contiennent un domaine alpha-cristallin (ACD, en rouge) entouré d'une région N-terminale non conservée (NTR, en bleu) et une extension C-terminale (CTE, en vert). Présentation logo de la composition en amino-acide de NTR (b), ACD (c) et CTE (d). La hauteur de chaque lettre est proportionnelle à sa fréquence. Les acides aminés sont colorés en fonction de

leurs propriétés chimiques : acidiques (D et E) en rouge, basique (K, R , H) en bleu, polaire (G, S, T, Y, C) en vert et (N , Q) en violet, hydrophobiques (A , V , L , I, P , W , F , M) en noir.

2.3.3 Evolution des sHsps nucléaires chez les insectes

Les séquences obtenues appartiennent à trois groupes :

- Le premier groupe contient les espèces : *Lasius niger*, *Melipona quadrifasciata*, et *Nasonia vitripennis*. Toutes ces espèces ont en commun le même ordre Hymenoptera et sous ordre Apocrita.
- Le deuxième groupe regroupe : *Ceratitis capitata*, *Bactrocera latifrons*, *Bactrocera dorsalis*, *Bactrocera cucurbitae*, *Musca domestica*, *Sarcophaga crassipalpis*, *Lucilia cuprina*, *Drosophila melanogaster*, *Drosophila mojavensis*, *Drosophila repletoides*, *Drosophila buzzatii*, *Drosophila albomicans*, *Drosophila sulfurigaster albostrigata*, *Drosophila yakuba*, *Drosophila sechellia*, *Drosophila virilis* et *Drosophila erecta*. Ces espèces partagent le même ordre Diptera et le sous-ordre Brachycera.
- Le dernier groupe contient seulement *Aedes aegypti* qui appartient à l'ordre Hymenoptera et sous-ordre Nematocera.

L'arbre phylogénétique obtenu (Figure 2.3) montre qu'avec les sHsps nucléaires, on est capable d'avoir une séparation des différents groupes et même à l'intérieur du même genre comme le cas du genre *drosophila*, ce qui signifie que les sHsps sont des bons marqueurs pour suivre l'histoire évolutive.

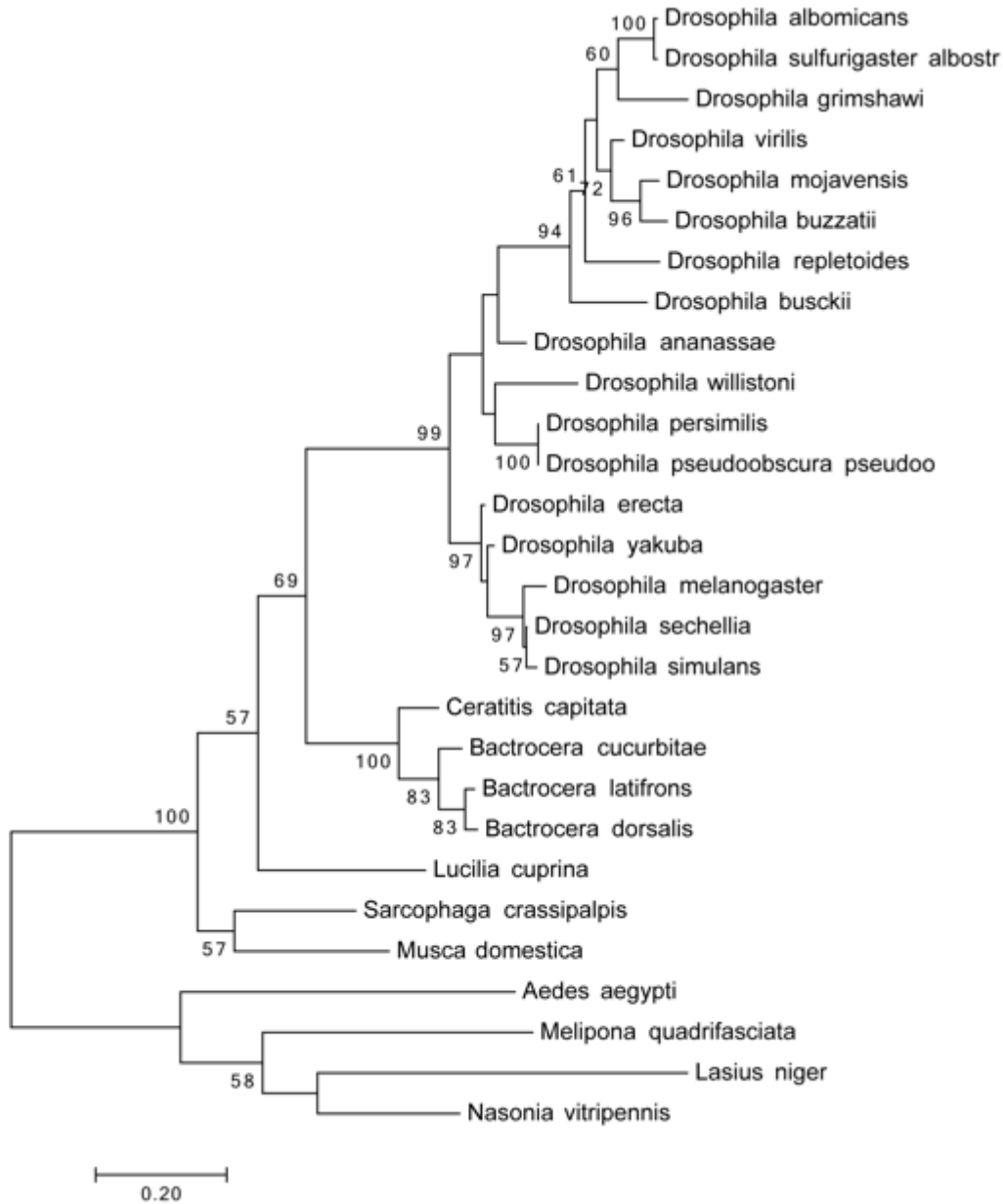


Figure 2.3 : Analyse phylogénétique des sHsps nucléaires d’insectes par la méthode de maximum de vraisemblance.

L'histoire évolutive est déduite en utilisant la méthode du maximum de vraisemblance sur la base du modèle Whelan et Goldman (Whelan and Goldman, 2001) avec le logiciel MEGA7 (Tamura et al., 2013).

2.3.4 Les fonctions de DmHsp27 dans le noyau

Les fonctions de DmHsp27 dans le noyau restent inconnues. Une étude avait rapporté une association de DmHsp22, DmHsp23, DmHsp26 et DmHsp27 aux hnRNP (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein) (Kloetzel and Bautz, 1983). En plus, des sHsps cytoplasmiques et DmHsp27 de drosophile sont co-purifiées avec le prosome lors de choc thermique et quatre petits ARN ont été séquencés de ces complexes prosomes-sHsps (Arrigo et al., 1985). L'alpha-cristallin de souris est capable de lier les gènes D/E/F-cristallin (Pietrowski et al., 1994) et l'alpha-cristallin bovin reconnaît le simple et double brin d'ADN (Bloemendal et al., 1999, Singh et al., 1998). Les sHsps peuvent aussi protéger les ARN messenger (ARNm) lors du stress en induisant l'arrêt de la traduction (Kedersha et al., 1999, Scharf et al., 1998). Il n'est pas encore clair si cette interaction se fait directement ou via des intermédiaires.

La recherche d'interactions de DmHsp27 met en lumière certaines corrélations potentiellement intéressantes pour sa fonction. L'ensemble des données disponibles dans les bases de données DroID (Drosophila Interaction Database, (Yu et al., 2008), BioGRID3.4 (Chatr-Aryamontri et al., 2017) et FlyBase (Marygold et al., 2016) sont groupées dans le tableau 2.2. Outre l'interaction attendue de DmHsp27 avec les facteurs de maturation et de liaison à l'ARN (TH1 et thoc7), DroID met en évidence l'interaction potentielle entre DmHsp27 et une protéine de liaison à d'ADN (Alh) (Giot et al., 2003), en plus d'une protéine impliquée dans l'initiation de la réplication d'ADN Mcm3 (Guruharsha et al., 2011). De façon intéressante, DmHsp27 pourrait interagir avec des kinases, phosphatases, facteurs de transcription ou régulation des histones (Tableau 2.2). Ces interactions nous orientent vers un rôle de DmHsp27 dans les processus nucléaires de base tels que la réplication d'ADN, transcription et maturation de l'ARN en plus de sa fonction de chaperon moléculaire.

Protéine partenaire de DmHSP27WT	Fonctions	Références
Transcriptional Adaptor 2b (Ada2b)	Régulation de l'acétylation/méthylation des histones	(Giot et al., 2003)
Alhambra (Alh)	Liaison d'ADN.	(Giot et al., 2003)
Arginine methyltransferase 2 (Art2)	Régulation de l'acétylation/méthylation des histones	(Guruharsha et al., 2011)
Burgundy (bur)	Activité GMP synthase	(Giot et al., 2003)
Beadex (Bx)	Protéine à doigt de zinc	(Guruharsha et al., 2011)
Cyclin-dependent kinase 1 (Cdk1)	Protéine kinase	(Guruharsha et al., 2011)
CG18004	ND	(Guruharsha et al., 2011)
CG10984	ND	(Guruharsha et al., 2011)
E(Z)	Régulation de méthylation des histones	(Kang et al., 2015)
Xport-A	ND	(Rosenbaum et al., 2011)
Histone deacetylase 3 (HDAC3)	Régulation de l'acétylation/méthylation des histones	(Guruharsha et al., 2011)
Kayak (kay)	Facteur de transcription	(Guruharsha et al., 2011)
Lisencephaly-1 (Lis-1)	Activité ATPase	(Giot et al., 2003)
Lk6 kinase (Lk6)	Protéine kinase	(Giot et al., 2003)
LWR	Enzyme de conjugaison SUMO	(Joanisse et al., 1998)
MED19	Régulation transcription	(Giot et al., 2003)
Minichromosome maintenance 3 (Mcm3)	Réplication d'ADN	(Guruharsha et al., 2011)
Mediator complex subunit 19 (MED19)	Facteur de transcription	(Giot et al., 2003)
microtubule star (mts)	phosphatase	(Guruharsha et al., 2011)
Nemo (nmo)	Protéine kinase	(Guruharsha et al., 2011)
ovo	Facteur de transcription	(Guruharsha et al., 2011)
P53	Facteur de transcription	(Guruharsha et al., 2011)
RPT1	Activité ATPase	(Guruharsha et al., 2011)
Slbo	Activation de la transcription	(Rorth et al., 1998)

Spt7	Régulation de l'acétylation/méthylation des histones	(Guruharsha et al., 2011)
Su(var)3-9	Régulation de la méthylation des histones	(Giot et al., 2003)
TH1	Liaison d'ARNm	(Guruharsha et al., 2011)
thoc7	Maturation d'ARNm	(Guruharsha et al., 2011)

Tableau 2-2 : Interactions de DmHsp27.

2.4 Conclusion

Dans ce chapitre j'ai montré que le signal NLS riche en arginine n'est pas une particularité de *D.melanogaster*. La progression des projets de séquençage de génomes chez d'autres insectes pourra confirmer la présence d'autres NLS (du même type ou non) dans d'autres espèces. Le rôle exact de la localisation des sHsps dans le noyau reste inconnu. Le réseau d'interaction de DmHsp27 nous laisse croire que cette protéine ne joue pas seulement le rôle de chaperon moléculaire, mais qu'elle est probablement impliquée dans différents processus nucléaires. Cette étude nous ouvre les perspectives d'étudier l'oligomérisation de DmHsp27WT et les mutants au niveau du domaine ACD conservé (chapitre 3). En plus, une analyse plus approfondie des séquences obtenues dans ce chapitre a permis de choisir les sites de mutations et d'étudier l'importance et la flexibilité de la région N-terminale (chapitre 4).

Références

- ARRIGO, A. P. & AHMAD-ZADEH, C. 1981. Immunofluorescence localization of a small heat shock protein (hsp 23) in salivary gland cells of *Drosophila melanogaster*. *Mol Gen Genet*, 184, 73-9.
- ARRIGO, A. P., DARLIX, J. L., KHANDJIAN, E. W., SIMON, M. & SPAHR, P. F. 1985. Characterization of the prosome from *Drosophila* and its similarity to the cytoplasmic structures formed by the low molecular weight heat-shock proteins. *EMBO J*, 4, 399-406.
- BARANOVA, E. V., WEEKS, S. D., BEELEN, S., BUKACH, O. V., GUSEV, N. B. & STRELKOV, S. V. 2011. Three-dimensional structure of alpha-crystallin domain dimers of human small heat shock proteins HSPB1 and HSPB6. *J Mol Biol*, 411, 110-22.
- BEAULIEU, J. F., ARRIGO, A. P. & TANGUAY, R. M. 1989. Interaction of *Drosophila* 27000 Mr Heat-Shock Protein with the Nucleus of Heat-Shocked and Ecdysone-Stimulated Culture Cells. *Journal of Cell Science*, 92, 29-36.
- BLOEMENDAL, M., TOUMADJE, A. & JOHNSON, W. C., JR. 1999. Bovine lens crystallins do contain helical structure: a circular dichroism study. *Biochim Biophys Acta*, 1432, 234-8.
- BORRELLI, M. J., BERNOCK, L. J., LANDRY, J., SPITZ, D. R., WEBER, L. A., HICKEY, E., FREEMAN, M. L. & CORRY, P. M. 2002. Stress protection by a fluorescent Hsp27 chimera that is independent of nuclear translocation or multimeric dissociation. *Cell Stress Chaperones*, 7, 281-96.
- CASPERS, G. J., LEUNISSEN, J. A. & DE JONG, W. W. 1995. The expanding small heat-shock protein family, and structure predictions of the conserved "alpha-crystallin domain". *J Mol Evol*, 40, 238-48.
- CHOU, K. C. & SHEN, H. B. 2007. Euk-mPLOC: a fusion classifier for large-scale eukaryotic protein subcellular location prediction by incorporating multiple sites. *J Proteome Res*, 6, 1728-34.
- CHOU, K. C. & SHEN, H. B. 2008. Cell-PLOC: a package of Web servers for predicting subcellular localization of proteins in various organisms. *Nat Protoc*, 3, 153-62.
- CROOKS, G. E., HON, G., CHANDONIA, J. M. & BRENNER, S. E. 2004. WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res*, 14, 1188-90.
- DE JONG, W. W., CASPERS, G. J. & LEUNISSEN, J. A. 1998. Genealogy of the alpha-crystallin--small heat-shock protein superfamily. *Int J Biol Macromol*, 22, 151-62.
- FINN, R. D., BATEMAN, A., CLEMENTS, J., COGGILL, P., EBERHARDT, R. Y., EDDY, S. R., HEGER, A., HETHERINGTON, K., HOLM, L., MISTRY, J., SONNHAMMER, E. L., TATE, J. & PUNTA, M. 2014. Pfam: the protein families database. *Nucleic Acids Res*, 42, D222-30.
- FINN, R. D., CLEMENTS, J. & EDDY, S. R. 2011. HMMER web server: interactive sequence similarity searching. *Nucleic Acids Res*, 39, W29-37.

- GIOT, L., BADER, J. S., BROUWER, C., CHAUDHURI, A., KUANG, B., LI, Y., HAO, Y. L., OOI, C. E., GODWIN, B., VITOLS, E., VIJAYADAMODAR, G., POCHART, P., MACHINENI, H., WELSH, M., KONG, Y., ZERHUSEN, B., MALCOLM, R., VARRONE, Z., COLLIS, A., MINTO, M., BURGESS, S., MCDANIEL, L., STIMPSON, E., SPRIGGS, F., WILLIAMS, J., NEURATH, K., IOIME, N., AGEE, M., VOSS, E., FURTAK, K., RENZULLI, R., AANENSEN, N., CARROLLA, S., BICKELHAUPT, E., LAZOVATSKY, Y., DASILVA, A., ZHONG, J., STANYON, C. A., FINLEY, R. L., JR., WHITE, K. P., BRAVERMAN, M., JARVIE, T., GOLD, S., LEACH, M., KNIGHT, J., SHIMKETS, R. A., MCKENNA, M. P., CHANT, J. & ROTHBERG, J. M. 2003. A protein interaction map of *Drosophila melanogaster*. *Science*, 302, 1727-36.
- GORLICH, D. 1997. Nuclear protein import. *Curr Opin Cell Biol*, 9, 412-9.
- GURUHARSHA, K. G., RUAL, J. F., ZHAI, B., MINTSERIS, J., VAIDYA, P., VAIDYA, N., BEEKMAN, C., WONG, C., RHEE, D. Y., CENAJ, O., MCKILLIP, E., SHAH, S., STAPLETON, M., WAN, K. H., YU, C., PARSAR, B., CARLSON, J. W., CHEN, X., KAPADIA, B., VIJAYRAGHAVAN, K., GYGI, S. P., CELNIKER, S. E., OBAR, R. A. & ARTAVANIS-TSAKONAS, S. 2011. A protein complex network of *Drosophila melanogaster*. *Cell*, 147, 690-703.
- HASLBECK, M., IGNATIOU, A., SAIBIL, H., HELMICH, S., FRENZL, E., STROMER, T. & BUCHNER, J. 2004. A domain in the N-terminal part of Hsp26 is essential for chaperone function and oligomerization. *J Mol Biol*, 343, 445-55.
- KEDERSHA, N. L., GUPTA, M., LI, W., MILLER, I. & ANDERSON, P. 1999. RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 alpha to the assembly of mammalian stress granules. *J Cell Biol*, 147, 1431-42.
- KLOETZEL, P. M. & BAUTZ, E. K. 1983. Heat-shock proteins are associated with hnRNA in *Drosophila melanogaster* tissue culture cells. *EMBO J*, 2, 705-10.
- KRIEHLER, T., RATTEI, T., WEINMAIER, T., BEPPERLING, A., HASLBECK, M. & BUCHNER, J. 2010. Independent evolution of the core domain and its flanking sequences in small heat shock proteins. *FASEB J*, 24, 3633-42.
- MAAROUFI, H. & TANGUAY, R. M. 2013. Analysis and phylogeny of small heat shock proteins from marine viruses and their cyanobacteria host. *PLoS One*, 8, e81207.
- MCHAOURAB, H. S., GODAR, J. A. & STEWART, P. L. 2009. Structure and mechanism of protein stability sensors: chaperone activity of small heat shock proteins. *Biochemistry*, 48, 3828-37.
- MCWILLIAM, H., LI, W., ULUDAG, M., SQUIZZATO, S., PARK, Y. M., BUSO, N., COWLEY, A. P. & LOPEZ, R. 2013. Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI. *Nucleic Acids Res*, 41, W597-600.
- MICHAUD, S., LAVOIE, S., GUIMOND, M. O. & TANGUAY, R. M. 2008. The nuclear localization of *Drosophila* Hsp27 is dependent on a monopartite arginine-rich NLS and is uncoupled from its association to nuclear speckles. *Biochim Biophys Acta*, 1783, 1200-10.
- MOUTAOUFIK, M. T., MORROW, G., MAAROUFI, H., FÉRARD, C., FINET, S. & TANGUAY, R. M. 2016. Oligomerization and chaperone-like activity of *Drosophila melanogaster* small heat shock protein DmHsp27 and three arginine mutants in the alpha-crystallin domain. *Cell Stress and Chaperones*, 1-12.

- NIGG, E. A. 1997. Nucleocytoplasmic transport: signals, mechanisms and regulation. *Nature*, 386, 779-87.
- OHNO, M., FORNEROD, M. & MATTAJ, I. W. 1998. Nucleocytoplasmic transport: the last 200 nanometers. *Cell*, 92, 327-36.
- PALMERI, D. & MALIM, M. H. 1999. Importin beta can mediate the nuclear import of an arginine-rich nuclear localization signal in the absence of importin alpha. *Mol Cell Biol*, 19, 1218-25.
- PIETROWSKI, D., DURANTE, M. J., LIEBSTEIN, A., SCHMITT-JOHN, T., WERNER, T. & GRAW, J. 1994. Alpha-crystallins are involved in specific interactions with the murine gamma D/E/F-crystallin-encoding gene. *Gene*, 144, 171-8.
- POULAIN, P., GELLY, J. C. & FLATTERS, D. 2010. Detection and architecture of small heat shock protein monomers. *PLoS One*, 5, e9990.
- ROBERT, X. & GOUET, P. 2014. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic Acids Res*, 42, W320-4.
- SCHARF, K. D., HEIDER, H., HOHFELD, I., LYCK, R., SCHMIDT, E. & NOVER, L. 1998. The tomato Hsf system: HsfA2 needs interaction with HsfA1 for efficient nuclear import and may be localized in cytoplasmic heat stress granules. *Mol Cell Biol*, 18, 2240-51.
- SCHARF, K. D., SIDDIQUE, M. & VIERLING, E. 2001. The expanding family of Arabidopsis thaliana small heat stress proteins and a new family of proteins containing alpha-crystallin domains (Acid proteins). *Cell Stress Chaperones*, 6, 225-37.
- SIDDIQUE, M., GERNHARD, S., VON KOSKULL-DORING, P., VIERLING, E. & SCHARF, K. D. 2008. The plant sHSP superfamily: five new members in Arabidopsis thaliana with unexpected properties. *Cell Stress Chaperones*, 13, 183-97.
- SIDDIQUE, M., PORT, M., TRIPP, J., WEBER, C., ZIELINSKI, D., CALLIGARIS, R., WINKELHAUS, S. & SCHARF, K. D. 2003. Tomato heat stress protein Hsp16.1-CIII represents a member of a new class of nucleocytoplasmic small heat stress proteins in plants. *Cell Stress Chaperones*, 8, 381-94.
- SINGH, K., GROTH-VASSELLI, B. & FARNSWORTH, P. N. 1998. Interaction of DNA with bovine lens alpha-crystallin: its functional implications. *Int J Biol Macromol*, 22, 315-20.
- STAMLER, R., KAPPE, G., BOELEN, W. & SLINGSBY, C. 2005. Wrapping the alpha-crystallin domain fold in a chaperone assembly. *J Mol Biol*, 353, 68-79.
- TAMURA, K., STECHER, G., PETERSON, D., FILIPSKI, A. & KUMAR, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol*, 30, 2725-9.
- VAN DE KLUNDERT, F. A. & DE JONG, W. W. 1999. The small heat shock proteins Hsp20 and alphaB-crystallin in cultured cardiac myocytes: differences in cellular localization and solubilization after heat stress. *Eur J Cell Biol*, 78, 567-72.
- VAN MONTFORT, R., SLINGSBY, C. & VIERLING, E. 2001a. Structure and function of the small heat shock protein/alpha-crystallin family of molecular chaperones. *Adv Protein Chem*, 59, 105-56.

- VAN MONTFORT, R. L., BASHA, E., FRIEDRICH, K. L., SLINGSBY, C. & VIERLING, E. 2001b. Crystal structure and assembly of a eukaryotic small heat shock protein. *Nat Struct Biol*, 8, 1025-30.
- VICART, P., CARON, A., GUICHENEY, P., LI, Z., PREVOST, M. C., FAURE, A., CHATEAU, D., CHAPON, F., TOME, F., DUPRET, J. M., PAULIN, D. & FARDEAU, M. 1998. A missense mutation in the alphaB-crystallin chaperone gene causes a desmin-related myopathy. *Nat Genet*, 20, 92-5.
- WANG, X., OSINSKA, H., KLEVITSKY, R., GERDES, A. M., NIEMAN, M., LORENZ, J., HEWETT, T. & ROBBINS, J. 2001. Expression of R120G-alphaB-crystallin causes aberrant desmin and alphaB-crystallin aggregation and cardiomyopathy in mice. *Circ Res*, 89, 84-91.
- WHELAN, S. & GOLDMAN, N. 2001. A general empirical model of protein evolution derived from multiple protein families using a maximum-likelihood approach. *Mol Biol Evol*, 18, 691-9.
- YU, J., PACIFICO, S., LIU, G. & FINLEY, R. L., JR. 2008. DroID: the Drosophila Interactions Database, a comprehensive resource for annotated gene and protein interactions. *BMC Genomics*, 9, 461.

**Chapitre 3 : Oligomérisation et
activité chaperon de la petite
protéine de choc thermique
DmHsp27 chez Drosophila
melanogaster et de trois mutants
arginine dans le domaine alpha-
cristallin**

Avant-Propos

Cet article a été publié dans le journal “Cell Stress and Chaperones” (<http://link.springer.com/article/10.1007/s12192-016-0748-7>), (Moutaoufik et al., 2016). J’ai réalisé toutes les expériences présentées dans cet article, du clonage, mutagenèse, production, purification, aux analyses biochimiques, bioinformatiques et biophysiques. J’ai également rédigé l’article sous sa forme publiée. Dr. Halim Maaroufi m’a aidé pour la réalisation de la figure 9, Céline Férard m’a aidé pour les expériences de la DLS figure 2 A, B et C sous la supervision du Dre. Stéphanie Finet. Dre. Geneviève Morrow et Pr. Robert M Tanguay ont supervisé les travaux et ont fait une révision critique du manuscrit.

Oligomerization and chaperone-like activity of *Drosophila melanogaster* small heat shock protein DmHsp27 and three arginine mutants in the alpha-crystallin domain.

Mohamed Taha Moutaoufik ¹, Geneviève Morrow¹, Halim Maaroufi³, Céline Férard ²,
Stéphanie Finet ², Robert M Tanguay ^{1*}

1- Laboratoire de génétique cellulaire et développementale, Département de biologie moléculaire, de biochimie médicale et de pathologie, Institut de biologie intégrative et des systèmes (IBIS) and PROTEO, Université Laval, Québec, Canada G1V 0A6

2- IMPMC UMR7590, CNRS, UPMC Paris 6, 4 place Jussieu, Paris, France.

3- Plate-forme de bio-informatique, Institut de biologie intégrative et des systèmes (IBIS), Université Laval, Québec, Canada G1V 0A6

* Corresponding author

Email: Robert.tanguay@fmed.ulaval.ca (RMT)

Phone : 418-656-3339

Résumé

La petite protéine de choc thermique (DmHsp27) est l'une des rares sHsps nucléaires. Nous signalons que la dimérisation de DmHsp27 est indépendante des ponts de disulfures et semble s'appuyer sur des ponts ioniques. Contrairement aux sHsps chez les métazoaires, DmHsp27 chez la drosophile forme deux populations d'oligomères. Cependant, la substitution de l'une des trois arginines hautement conservées (R122, R131 et R135) au niveau de l'ACD par une glycine résulte en formation d'une seule population avec un gros poids moléculaire. *In vitro*, l'activité de chaperon de type sauvage DmHsp27 était comparable à celle de ces deux populations isolées et à la seule population du R122G, R131G et R135G utilisant la luciférase comme substrat. Étonnamment, l'activité de chaperon du DmHsp27WT était beaucoup plus faible que celle des mutants R122G et R131G utilisant l'insuline comme substrat.

Au final, ces résultats caractérisant DmHsp27WT et ses mutants d'arginine au niveau de l'ACD peuvent donner un aperçu sur le mécanisme de protection des sHsps.

Mots clés

Petite protéine de choc thermique (sHsps); DmHsp27; chaperon; domaine alpha-cristallin (ACD); *Drosophila melanogaster*.

Abstract

The small Hsp DmHsp27 from *Drosophila melanogaster* is one of the few sHsps found within the nucleus. We report that its dimerization is independent of disulfide bond formation and seems to rely on salt bridges. Unlike metazoan sHsps, DmHsp27 forms two populations of oligomers not in equilibrium. Mutations at a highly conserved arginine residues in mammalian sHsps has been reported to be associated with protein conformational defects and intracellular aggregation. Independent mutation of three highly conserved arginines (R122, R131 and R135) to glycine in DmHsp27 results in only one population of higher molecular weight form. *In vitro*, the chaperone-like activity of wild type DmHsp27 was comparable with that of its two isolated populations and to the single population of the R122G, R131G and R135G using luciferase as substrate. However, using insulin, the chaperone-like activity of wild type DmHsp27 was lower than that of R122G and R131G mutants. Altogether the results characterize wild type DmHsp27 and its ACD arginine mutants and may give insight into protection mechanism of sHsps.

Keywords

Small heat shock protein (sHsp); DmHsp27; chaperone; alpha-crystallin domain (ACD); *Drosophila melanogaster*.

3.1 Introduction

The small heat shock proteins (sHsps) are a ubiquitous family of ATP-independent stress proteins found in all domains of life (Maaroufi and Tanguay, 2013, Caspers et al., 1995, de Jong et al., 1998, Fu et al., 2006). These proteins are up-regulated in response to a variety of stresses that negatively impact protein homeostasis.

Small Hsps are characterized by the presence of a conserved α -crystallin domain (ACD), which is flanked by a variable N-terminal region (NTR) and a C-terminal extension (CTE). The ACD represents the conserved signature motif of sHsps. Structurally it forms a compact β -sandwich, consisting of two anti-parallel sheets made of three and four β -strands respectively, connected by a short inter-domain loop (Delbecq and Klevit, 2013, Van Montfort et al., 2001a). 3D structures of isolated ACDs demonstrate that they usually form stable dimers, but the ACD alone is not sufficient for oligomer formation (Bagneris et al., 2009, Clark et al., 2011, Laganowsky et al., 2010). Mutation of conserved arginines within the ACD may cause neurological disease and cataract (Evgrafov et al., 2004, Gentil and Cooper, 2012, Treweek et al., 2005, Inagaki et al., 2006, Vicart et al., 1998, Datskevich et al., 2012, Boncoraglio et al., 2012, Benndorf et al., 2014).

The genome of *D. melanogaster* encodes for 12 proteins containing an ACD (Morrow and Tanguay, 2015). Here we investigate *Drosophila melanogaster* Hsp27 (DmHsp27) a nuclear-localized sHsps (Beaulieu et al., 1989a, Michaud et al., 2008). In addition to its up-regulation in response to stress, DmHsp27 also shows tissue- and stage-specific expression patterns during development (Michaud et al., 2002).

The structure of DmHsp27 has not yet been reported. Here we show that, DmHsp27 forms dimer independently of disulfide bond formation and rather seems dependent on salt bridges. Surprisingly, DmHsp27 forms two populations of oligomers. We have studied the structure and chaperone-like activity of DmHsp27^{WT} and three mutants of arginine within the ACD domain. Although the three different arginine mutants form high molecular weight oligomers distinct from the ones of the wild-type protein, they display either a similar chaperone-like activity as the wild-type protein or even a better one.

3.2 Materials and methods

3.2.1 Cloning and expression of recombinant DmHsp27.

The cDNA of wild type DmHsp27 (DmHsp27WT) (Morrow et al., 2006) was cloned into the small ubiquitin-related modifier (SUMO) fusion vector pETHSUK (a gift from Dr. S.Weeks, (Heirbaut et al., 2014, Weeks et al., 2007)) using GIBSON ASSEMBLY (NEB). The expression of the recombinant proteins as fusions with SUMO protein increased significantly protein expression. This is enhanced by the availability of SUMO-hydrolase, which removes specifically SUMO from the fusion protein (Amerik and Hochstrasser, 2004, Weeks et al., 2007). Point mutations were introduced by PCR, using GIBSON ASSEMBLY (NEB).

The *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS strain (NEB) was used for expression of DmHsp27WT and mutants. Briefly, transformed bacteria were grown in 10 ml of Luria-Bertani (LB) broth miller (EMD Millipore) containing 100 µg/ml ampicillin (Biobasic Canada) at 37 °C overnight. After a 1:50 dilution, the bacteria were grown 3 h at 37 °C until an OD₆₀₀ around 0.6. Protein expression was then induced by 0.1 mM isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) (Roche) 5 h at 30 °C. Bacterial cells were collected by centrifugation, washed twice with binding buffer (5 mM Imidazole, 500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8) and stored at -80 °C until purification.

3.2.2 Purification of recombinant DmHsp27.

The cell pellet was suspended in 10 ml of binding buffer supplemented with 0.01 mg/ml of DNase (Sigma, Aldrich) and 4 mM of phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) (Sigma, Aldrich). The cells were lysed in a cold room (+7 °C) using French press (SLM AMINCO). Cell debris were removed by centrifugation at 10,000 g at 4 °C for 30 min. The soluble fraction was incubated with 1 ml bed volume of Ni-NTA agarose (Qiagen) to separate recombinant protein from contaminating proteins by chelate affinity chromatography. The column was washed with 30 volumes of washing buffer (60 mM Imidazole, 500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8). Bound protein was eluted with elution

buffer (500 mM Imidazole, 500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8). The eluate was collected in 1 ml fractions. The fractions containing the pure protein were dialyzed against storage buffer (20 mM Tris-HCl pH8, 150 mM NaCl, 1 mM dithiothreitol (DTT)), concentrated and pooled. Pooled fractions were digested with SUMO-Hydrolase and additionally purified by size exclusion chromatography (SEC) using a Superose 6 10/300 column (GE Lifesciences) equilibrated with 20 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1mM DTT to remove SUMO-Hydrolase, HIS-SUMO-tag and undigested protein. Protein fractions were verified by SDS-PAGE, pure samples were pooled together and concentrated using centrifugal filters (Amicon, EMD Millipore).

3.2.3 Fluorescence spectroscopy

Intrinsic tryptophan fluorescence was measured in fluorescence buffer (150 mM NaCl, 20 mM HEPES-KOH pH 8) at 20 °C. Fluorescence of protein samples (0.1 mg/ml) was excited at 295 nm and recorded in the range 300–400 nm (both slits width 5 nm).

Temperature-induced conformational changes of DmHsp27WT were followed by recording intrinsic tryptophan fluorescence. The pure protein samples (0.1 mg/ml) in fluorescence buffer were heated with the constant rate 1 °C/min from 20 up to 90 °C and cooled back at the same rate using Varian Cary Eclipse spectrofluorometer. Tryptophan was excited at 297 nm and fluorescence recorded at 332 nm (slits 5 nm).

3.2.4 Analytical SEC

The quaternary structure of DmHsp27WT was analyzed by SEC. Different concentrations of samples were loaded on Superose 6 10/300 column (GE Lifesciences) equilibrated with 20 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl and eluted at 0.5 ml/min. Fractions of 500 µl were collected and their protein composition was analyzed by SDS–gel electrophoresis. For estimating the molecular weight, the column was calibrated with protein markers immunoglobulin M (IGM) from bovine serum (900 kDa) (Sigma), (thyroglobulin (669 kDa), Ferritin (440 kDa), Aldolase (158 kDa), Conalbumin (75 kDa), Ovalbumin (43 kDa) and Blue Dextran 2000 to determine the void volume) (GE Lifesciences).

3.2.5 Native Gel Electrophoresis

The quaternary structure was also resolved by non-denaturing native gel electrophoresis. DmHsp27 was run on pre-cast 4-12% gradient native Tris-Glycine gels (Thermo Fisher Scientific) in Mini-Cell electrophoresis system (XCell SureLock, Life Technology). Gels were run at 150 V for 90 min. After electrophoresis, the protein complexes were stained with Coomassie blue.

3.2.6 Luciferase heat-induced aggregation assay

The heat-induced aggregation assay was conducted essentially as described in (Morrow et al., 2006). Luciferase (0.1 μ M, Promega) was heat-denatured at 42 °C in the absence or presence of DmHsp27WT or its arginine mutants for 30 minutes (0.4 μ M). Aggregation was determined by light-scattering at 320 nm on a spectrophotometer with thermostated cells (Varian Cary 100, Montreal, Quebec, Canada). Data are representative of 3 different assays and expressed as the mean \pm standard deviation.

3.2.7 Insulin DTT-induced aggregation assay

Chaperone-like activity was also determined by aggregation of insulin as a result of the reduction of disulfide bonds (Holmgren, 1979). Insulin (52 μ M, Sigma) in 10 mM potassium phosphate, 100 mM NaCl (pH 8) was pre-incubated alone or in the presence of (13 μ M) DmHsp27WT or mutants for 30 minutes. The reaction was started by addition of DTT up to the final concentration of 20 mM and aggregation of insulin was followed by an increase in the optical density at 320 nm on a spectrophotometer with thermostated cells. Data are representative of 3 different assays and expressed as the mean \pm standard deviation.

3.2.8 Molecular modeling

The 3D models of ACD of DmHsp27WT and its mutants were built with SWISS-MODEL (Biasini et al., 2014) using as template the ACD of HspB1 (PDB: 4MJH). The obtained models were energy minimized by KoBaMIN (Rodrigues et al., 2012) and their

quality were assessed by Ramachandran plot analysis through PROCHECK (Laskowski et al., 1993). Ramachandran plot revealed that 96% and 4% of residues are in favoured and allowed region, respectively. Visualization of 3D models was realized with PyMOL software (<http://pymol.org/>).

3.2.10 Dynamic light scattering

For complex characterization, dynamic light scattering (DLS) experiments were performed with 800 nm radiation on a DynaPro instrument (Wyatt Technology Corp., Santa Barbara, CA) as described previously (Michiel et al., 2009, Skouri-Panet et al., 2012). All samples were filtered through 0.22 µm filters. The protein concentration was adjusted to 0.2 to 2 mg/ml. The sample volume was 80 µl and the acquisition time was 10 s for a total measurement of up to 1 h. The sample temperature was controlled with a Peltier cell with a precision of 0.1 °C. The hydrodynamic radius (Rh) and the polydispersity (% Pd) were obtained using regularization methods (Dynamics software, version 6).

3.2.11 Cell culture and transfection conditions

Hela cells were maintained in MEM Alpha (Gibco) supplemented with 5% FBS penicillin, and streptomycin. For transfections, cells were plated 24 h in advance at a confluence of 175 000 cells/well (6 well plate) containing glass coverslip. Then, cells were washed three times in OptiMEM (Gibco) and incubated for 4 h in OptiMEM containing the plasmid (pcDNA-DmHsp27):Lipofectamine (Invitrogen) complex (1.5 µl Lipofectamine/1.5 µg DNA) prepared according to the manufacturer's protocol. After the incubation, cells were washed 3 times with complete medium and without antibiotics and left to express for 24 to 72 h before being processed for immunofluorescence.

3.2.12 Immunofluorescence analyses

Cells were washed 3 times in PBS and fixed by incubation in pre-chilled methanol at – 20 C for 20 min. They were washed 3 times with PBS containing 0.1% Tween20-X (PBST) and blocked for 1 h in PBST containing 5% BSA (PBST-BSA), for 1 h at room

temperature. After blocking, cells were incubated in primary antibody (monoclonal anti-DmHsp27 (2C8E11)(Michaud et al., 2008)) diluted (1/20) in PBST-BSA for 1 h at room temperature. After washing with PBST, cells were incubated with secondary antibody (goat anti-mouse Alexa 488 (Invitrogen)) for 45 min. Coverslips were mounted in Vectashield mounting medium (Vector Laboratories). Samples were visualized using an Axio Observer Z1 microscope equipped with an AxioCam camera (Carl Zeiss, Canada).

3.3 Results

3.3.1 Dimerization of DmHsp27

sHsps show a significant underrepresentation of cysteines. The reduction of the number of cysteines in these sequences may be important to prevent unwanted cross-linking under oxidative conditions, which would prevent subunit exchange and thus hinder the dynamics of sHsps (Kriehuber et al., 2010). The sequence of DmHsp27 has a single cysteine residue at position 93, located in the β 3 strand (Fig 3.1 A). Human HspB1 and murine Hsp25 can form dimers by an intermolecular disulfide bond between cysteine residues at position 137 and 141 respectively located in the β 6+7 strand (Zavialov et al., 1998, Baranova et al., 2011) (Fig 3.1 A).

To assess if the disulfide bond is involved in dimeric interface between cysteines residues in the β 3 strand of DmHsp27, we examined its migration on a native gel under reductive and non-reductive conditions compared to human HspB1 and DmHsp22. Human HspB1 was used as a positive control (Baranova et al., 2011) and DmHsp22 that does not have cysteine was used as a negative control. As seen in Fig 3.1 B, DmHsp27 behaves like DmHsp22 suggesting that the dimeric interface does not involve disulfide bond.

A 3D structure model of ACD-DmHsp27WT was generated based on the defined structure of ACD-HspB1 (PDB 4MJH, (Hochberg et al., 2014)), sharing 70% similarity and 53% identity (Fig 3.1 A). According to the resulting model of DmHsp27, ACD monomer is folded into a compact, six-stranded β -sandwich composed of two β -sheets. The first contains β 3, β 8 and β 9 strands and, therefore, both termini of ACD, and the second β -sheet contains β 4, β 5 and β 6+7 strands (Fig 3.1 C). The β -strands are interconnected by 3- to 10-residue-long loops. The largest loop, L4 (residues 119–128), connects the β 5 and β 7strands. DmHsp27 has the metazoan dimer structure, in which the β 6- and β 7-strands are fused into an elongated strand that forms the dimer interface with its counterpart from the neighbouring monomer in an anti-parallel orientation.

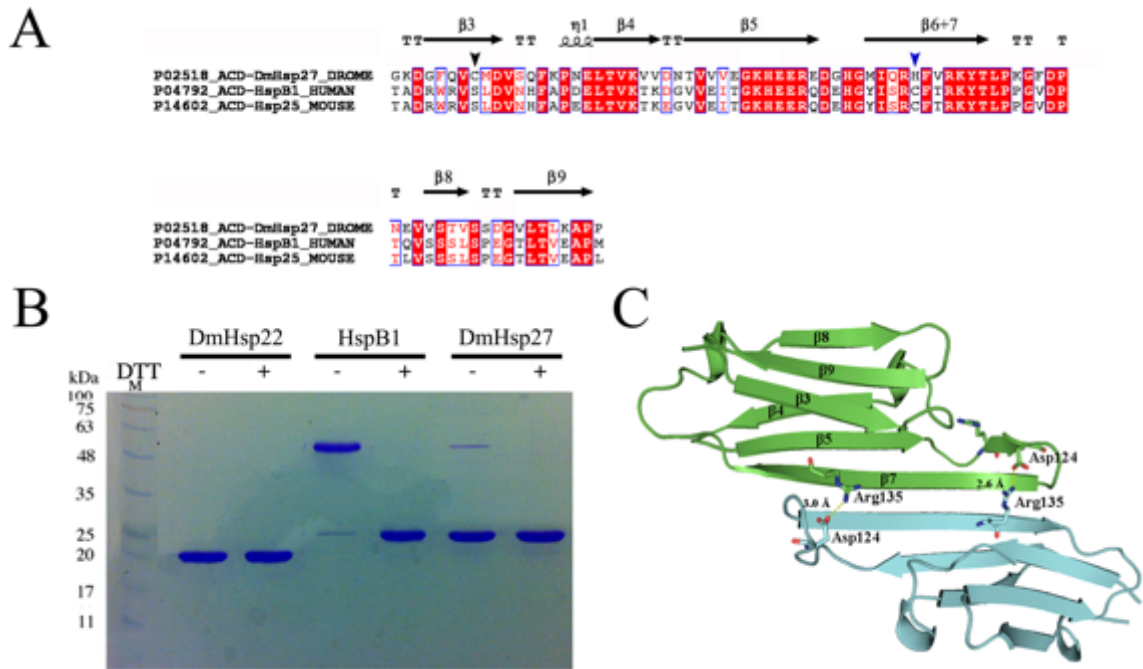


Figure 3.1: Dimeric interface of DmHsp27.

A- Amino acid sequence alignment of ACD of DmHsp27, human HspB1 and mouse Hsp25. Alignment was generated using multiple sequence comparison by log-expectation (MUSCLE). Secondary structures indicated in the alignment were assigned according to the determined crystal structure of ACD HspB1 (PDB: 4MJH). Black and blue arrowheads indicate cysteine positions.

B- Non-reducing SDS-PAGE, showing disulfide cross-linking of full length DmHsp22, DmHsp27 and human HspB1. The proteins were incubated at 20 °C for 21 h with 5 mM DTT (+) or without any reducing agent (-) loaded on non-reducing SDS-PAGE and detected by Coomassie blue staining C- Predicted 3D structure of ACD of DmHsp27 generated with SWISS-MODEL (Biasini et al., 2014) based on defined structure of HspB1 ACD (PDB 4MJH). Visualization of 3D models was realized with PyMOL software. Monomers represented as blue and green. The salt bridge between conserved arginine 135 and aspartic acid 124 are shown.

3.3.2 Thermal transition of DmHsp27.

The rate of exchange of sHsps subunits is strongly dependent on temperature (Bova et al., 1997, Bova et al., 2002). We used DLS to analyze the thermal stability of DmHsp27WT by separating soluble populations of different hydrodynamic radius (Rh). At 8 °C DmHsp27WT has a Rh about 7.2 nm and percentage of polydispersity of 51.5% (Fig 3.2 A). The heat-induced changes in DmHsp27WT oligomeric size were followed from 8 °C up to 45 °C. At each temperature, the scattered intensity was recorded up to one hour, and the corresponding Rh is shown on Fig 2 B. At 8°C, the Rh is equal to 7.2 nm, with a high polydispersity, more than 50%. At 25°C and 35°C, the Rh slightly decreases to 6.4 and 6.5 nm but increases to 8.0 nm at 45°C. Cooling back the temperature from 45 °C to 8 °C resulted in a decrease of the oligomeric size to values similar to the one observed prior to heating (Fig 3.2 B and Fig 3.2 C). This behavior is compatible with sHsps assemblies composed by an averaged number of subunits that could correspond to different populations present in solution.

DmHsp27WT contains one tryptophan residue located in the NTR at position 21. We took advantage of the fluorescence of this amino acid to follow heat-induced changes in the oligomeric size. Heating sample from 20 °C up to 90 °C and cooling it back to 20 °C was accompanied by reversible changes of intrinsic fluorescence of tryptophan (Fig 3.2 D), suggesting that thermal transitions of the DmHsp27 structure are reversible even at extreme temperature.

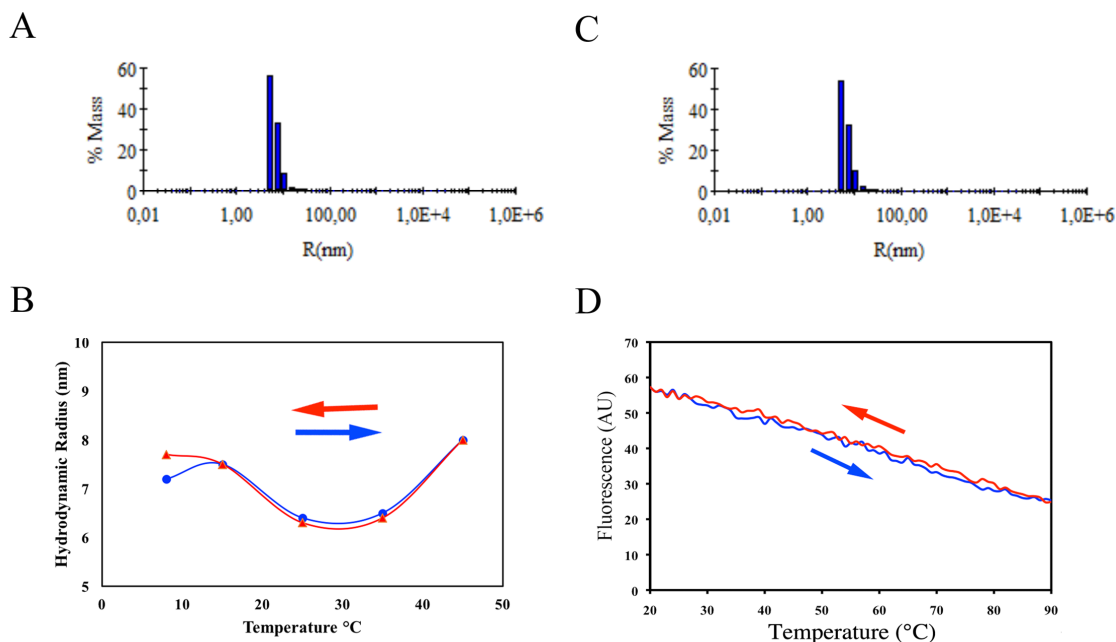


Figure 3.2: Thermal transition of DmHsp27 wild type.

Histogram of hydrodynamic radius (Rh) for DmHsp27 WT at 8 °C (A) and return from 45 °C to 8 °C (C), given an average Rh (in nm) and the corresponding percentage of polydispersity (%Pd). B- Hydrodynamic radius for DmHsp27 WT as a function of temperature. The arrows indicate directions of heating or cooling. D- Changes of Tryptophan fluorescence of DmHsp27 induced by temperature. The arrows indicate directions of heating or cooling.

3.3.3 Dissection of DmHsp27 wild type.

While DLS gives a general idea of the oligomeric size, SEC is recognized as a more sensitive method to determine the oligomeric structure. The profile of DmHsp27WT elution on a Superose 6 10/300 GL gives two peaks. The first one elutes at 13.4 ml (peak#1) and corresponds to a molecular masses of 725 kDa while the second one (peak#2) was eluted at 14.6 ml and has a molecular masses of 540 kDa (Fig 3.3). The position of the two peaks was independent of the quantity of protein loaded on the column (Fig 3.3). As shown on the Coomassie blue stained gels of the collected fractions, peak#2 is 1.8 times more abundant than peak#1.

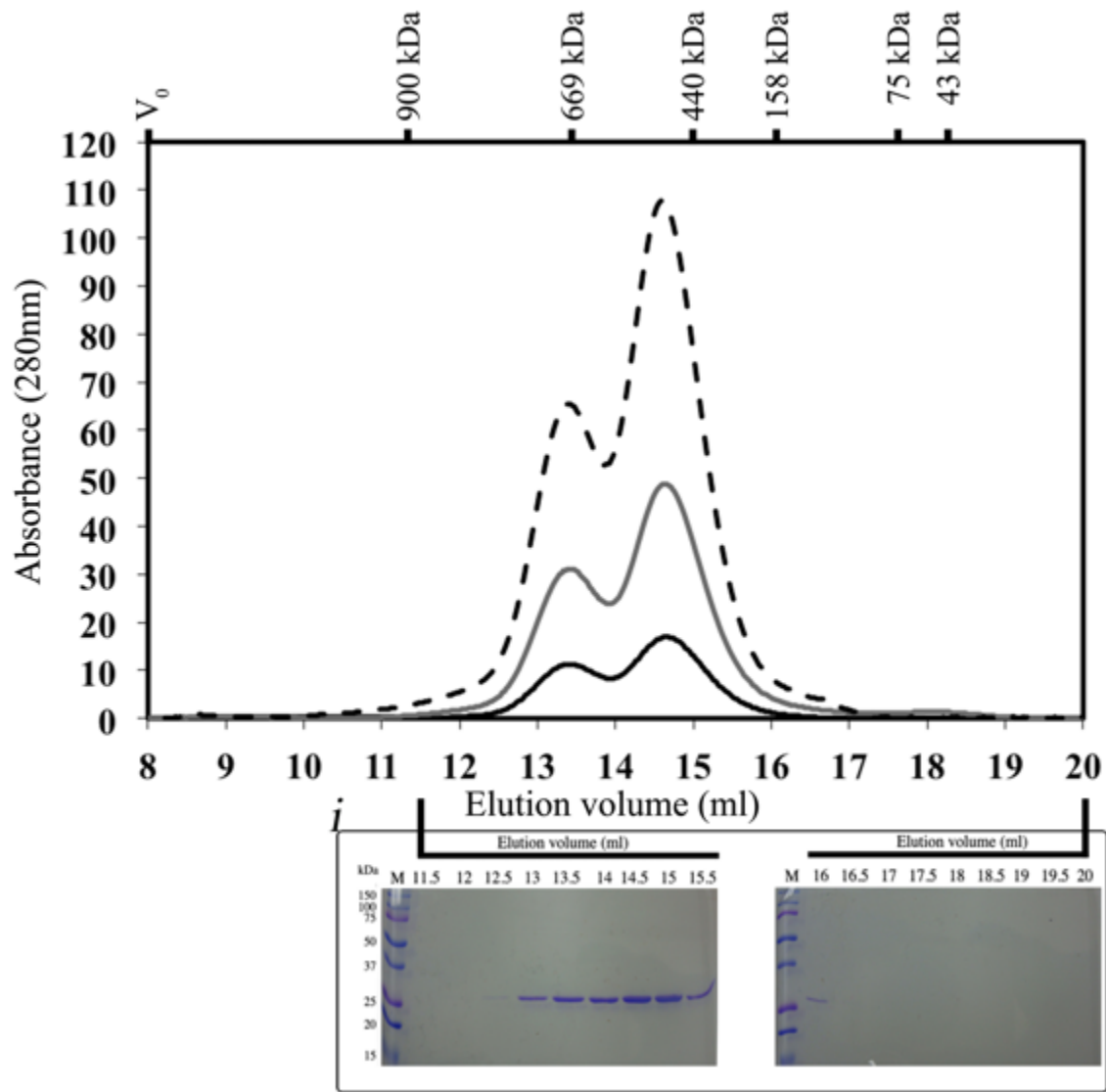
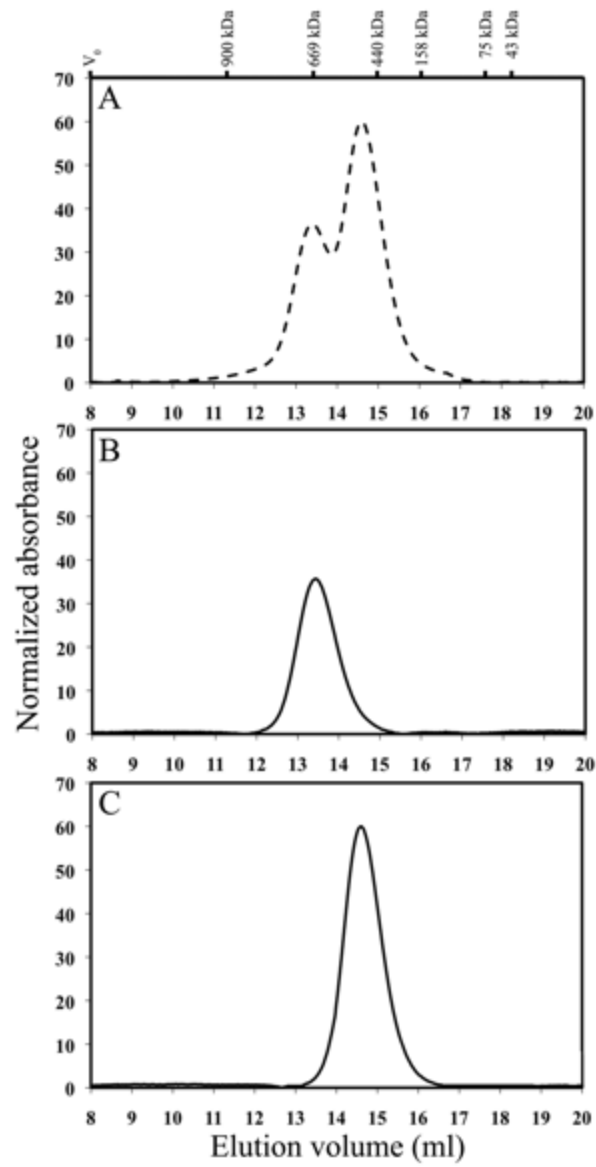


Figure 3.3: SEC analysis of DmHsp27 WT.

Size exclusion chromatography (SEC) analysis using a superose 6 10/300 GL (GE Life Sciences) column, which was calibrated by using IGM (900 kDa), thyroglobulin (669 kDa), ferritin (440 kDa), aldolase (158 kDa), conalbumin (75 kDa) and ovalbumin (43 kDa) to generate a calibration curve. Blue dextran (2000 kDa) was used to determine the void volume of the column V_0 . A- Profile on column of 600 μ g (dashed line), 300 μ g (gray line) and 100 μ g (black line) of pure DmHsp27W. Insert (i) present SDS electrophoresis of samples collected (500 μ l for each fraction) after size-exclusion

chromatography. The proteins were detected by Coomassie blue staining. The elution volume is indicated above the gel.

To determine if the populations of the two DmHsp27 peaks were in equilibrium, each was isolated and loaded separately on the Superose 6 column. When peak#1 was reloaded on the column, a single peak with the same volume of elution was obtained (Fig 3.4 B). Similarly, peak#2 also gave a single peak eluting at the same position of 14.6 ml (Fig 3.4 C). This result was confirmed by the profile of migration of DmHsp27WT on a native gel. Indeed, as seen Fig 3.4 D the migration of DmHSP27WT results in two bands and each of the isolated population migrates to its original position.



D

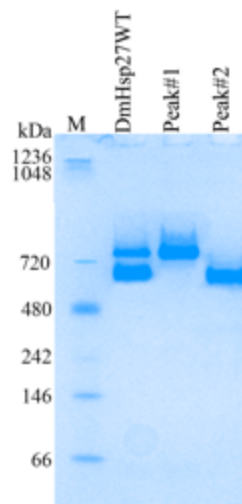


Figure 3.4: Complexes of DmHsp27 WT.

Size exclusion chromatography of DmHsp27WT (A), peak#1 (B) and peak#2 (C). Normalized elution profiles obtained after loading 600 µg of pure protein on the superose 6 column and re-injection of peak#1 and peak#2 obtained after this injection. Elution volumes of markers are shown above and include blue dextran to indicate the void volume V_0 . D- Native gradient (4-12%) polyacrylamide gel electrophoresis of 25 µg of different species of DmHsp27WT and isolated peak#1 and peak#2. Positions of standard protein markers with known molecular weights are shown on the left.

3.3.4 Study of three arginines in ACD:

As mentioned in the introduction, the ACD is the hallmark of the sHsps family. Arginine mutants from the ACD of HspB1, HspB4, HspB5 and HspB8 have been reported to be involved in different diseases such as distal hereditary motor neuropathy, Charcot-Marie-Tooth disease, desmin-related myopathy and cataracts (Gentil and Cooper, 2012, Treweek et al., 2005, Inagaki et al., 2006, Litt et al., 1998, Irobi et al., 2004, Vicart et al., 1998, Evgrafov et al., 2004, Datskevich et al., 2012, Boncoraglio et al., 2012, Benndorf et al., 2014).

Based on the importance and conservation of arginine residues for other sHsps (Fig 3.5 A), arginine at position 122, 131 and 135 of DmHSP27 were substituted with glycine and purified. Their amplitude of intrinsic tryptophan fluorescence was recorded by spectrofluorometer. As mentioned earlier DmHsp27 contains one tryptophan residue located in the NTR at position 21. The fluorescence spectrum of DmHsp27WT is characterized by a maximum in the range of 330–350 nm (Fig 3.5 B). The intensity of fluorescence of DmHsp27WT was a 1.5 times smaller than that of ACD mutants without significant change in position of maximum of fluorescence (Fig 3.5 B). This might indicate that the tryptophan residue of DmHsp27 wild type is more accessible to quenching than the corresponding residue in ACD mutants.

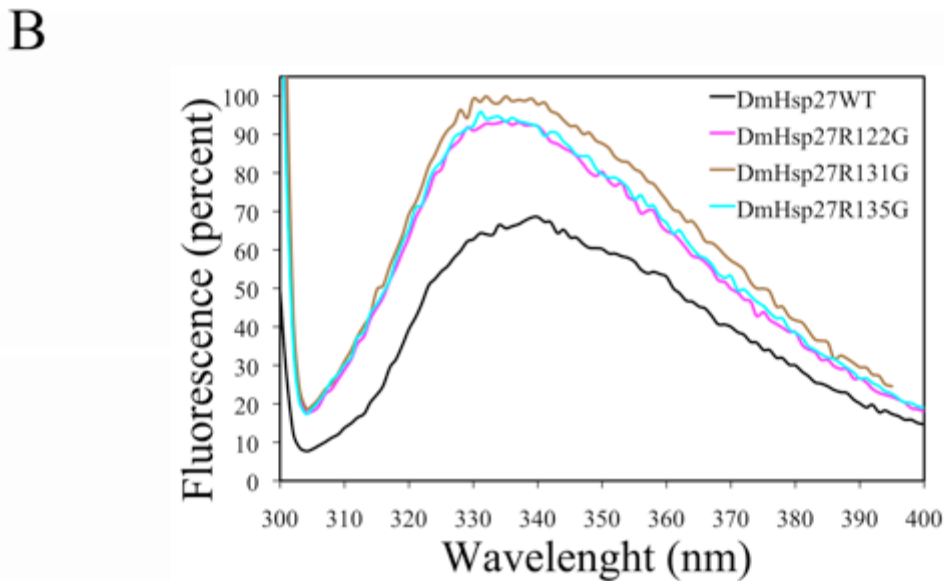
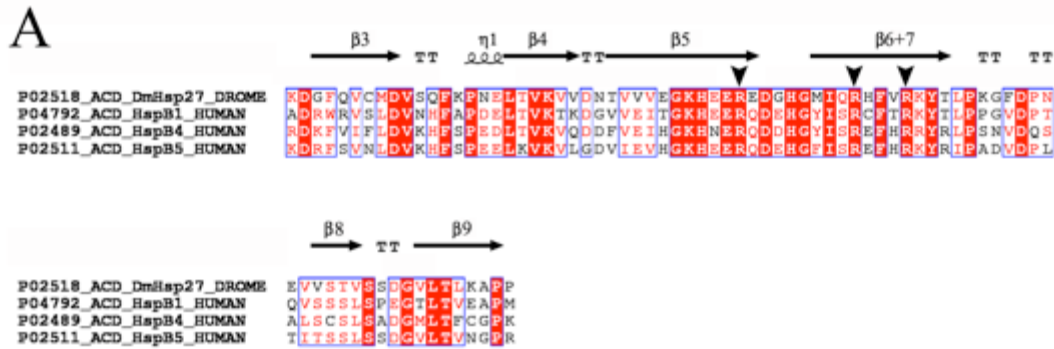


Figure 3.5: Analysis of three-conserved arginine in ACD.

A- Amino acid sequence alignment of ACD of DmHsp27 and humans HspB1, HspB4 and HspB5. Alignment was generated using multiple sequence comparison by log-expectation (MUSCLE). Secondary structures indicated in the alignment were assigned according to the determined crystal structure of ACD HspB1 (PDB: 4MJH). Black arrowheads indicate the conserved arginines. B- Fluorescence spectra of the DmHsp27WT and its ACD mutants. Intrinsic tryptophan fluorescence was excited at 295 nm and recorded in the range of 300-400 nm (both slits width 5 nm).

The oligomeric structure was analyzed by SEC and polyacrylamide native gel electrophoresis. In contrast to DmHsp27WT, the profile of elution of each arginine mutant resulted in one single peak eluting at 11ml and corresponding to a molecular mass

of 1100 kDa (Fig 3.6 A-D). Similar to the SEC analysis, the mutants also migrate as single band on a native gel. This band migrated at a higher molecular weight than the two bands observed for DmHsp27WT (Fig 3.6 E). Since ACD mutants had increased oligomeric size we tested the ability to aggregate *in vivo* in cultured cells as shown for mutant R148G in Hsp27 of chinese hamster and R120G, R120C and R120D in HspB5 by (Chavez Zobel et al. 2005 and Simon et al. 2007). Localization of DmHSP27WT and ACD mutants was determined 24, 48 and 72 h after transfection HeLa cells. The DmHsp27 mutants presented the same type of type of nuclear localization in the transfected cell line, as expected from previous work (Beaulieu et al. 1989b; Michaud et al. 2008) (Data not shown).

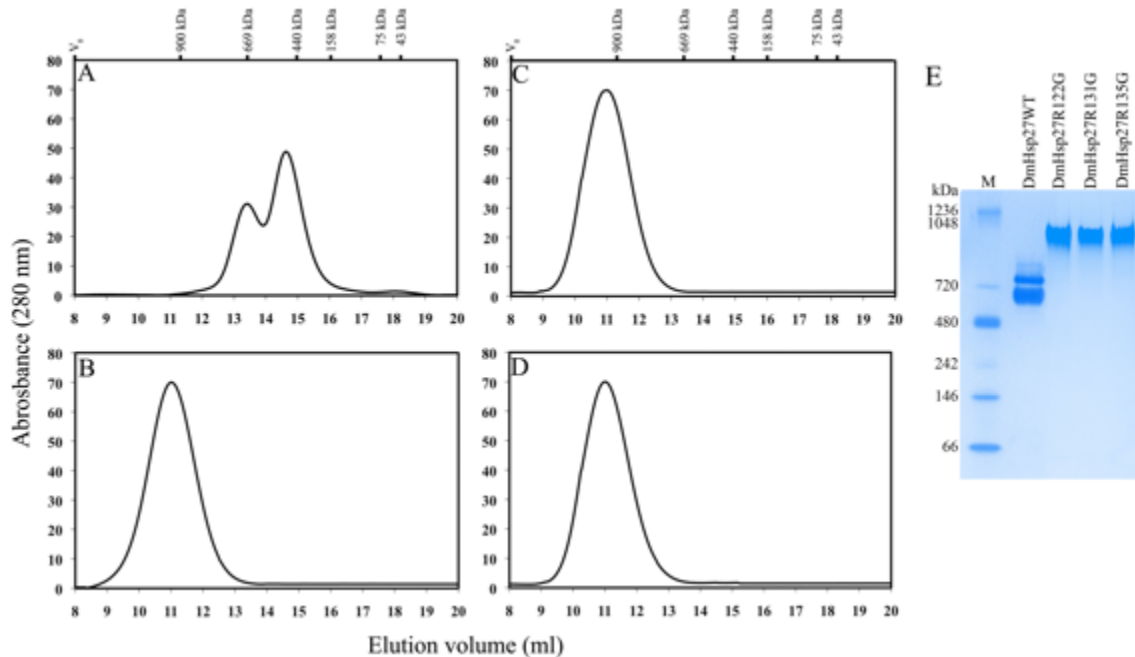


Figure 3.6: SEC analysis of DmHsp27 ACD mutants.

Size exclusion chromatography of wild type DmHsp27 and ACD mutants. 300 μ g of different mutants DmHsp27WT (A), mutants R122G (B), R131G (C) and R135G (D) were loaded on a superose 6 column. Elution volumes of markers are shown above and include blue dextran to indicate the void volume V_0 . E- Native gradient (4-12%) polyacrylamide gel electrophoresis of 25 μ g of different species of DmHsp27WT, R122G, R131G and R135G. Positions of standard protein markers with known molecular weights are shown on the left.

3.3.5 Chaperon-like activity:

Several sHsps can maintain substrates in a folding-competent state (Mogk et al., 2003b, Morrow et al., 2006). To determine if the different forms of DmHsp27WT and the arginine residues mutants within the ACD influence chaperone function, their ability to prevent aggregation on two distinct substrates, luciferase and insulin was investigated. As shown in Fig 3.7, heating of luciferase at 42 °C is accompanied by its aggregation which can be measured by an increase in the optical density at 320 nm. The presence of DmHsp27WT or its two isolated populations (peak#1 and #2) resulted in a similar prevention of aggregation (Fig 3.7 A). The R122G, R131G and R135G mutants were as efficient as the wild-type protein to prevent luciferase heat-induced aggregation (Fig 3.7 B and C).

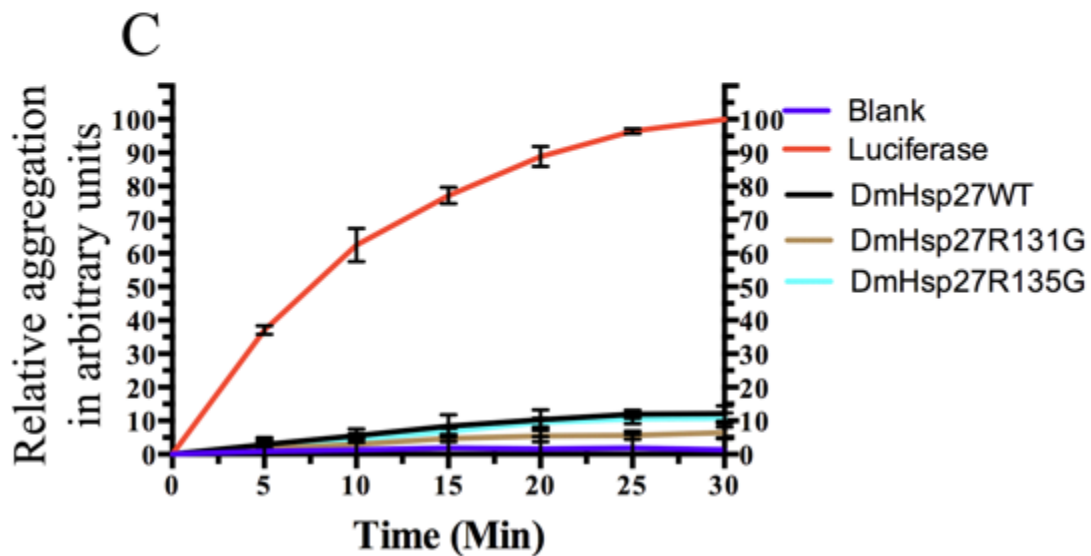
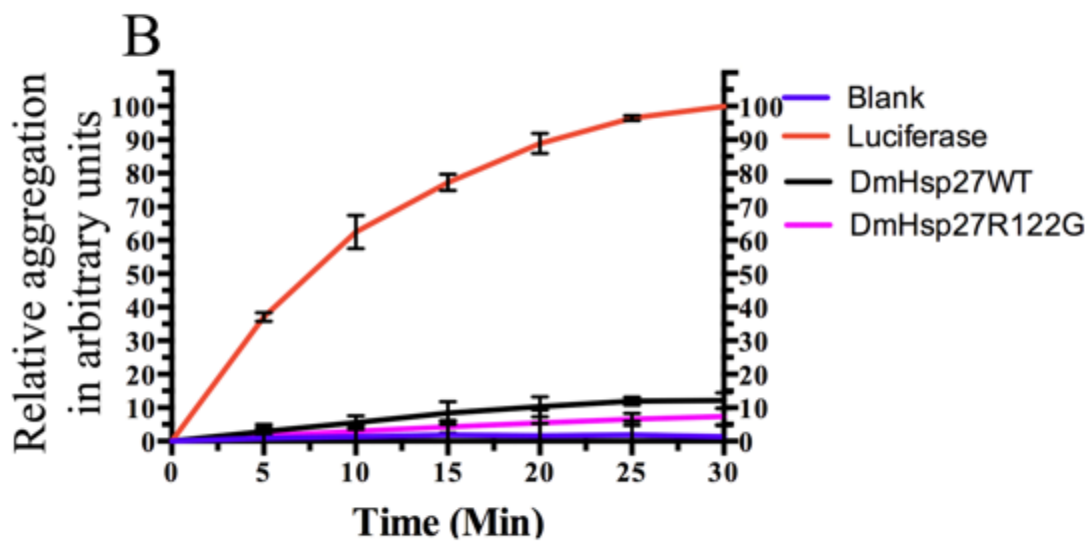
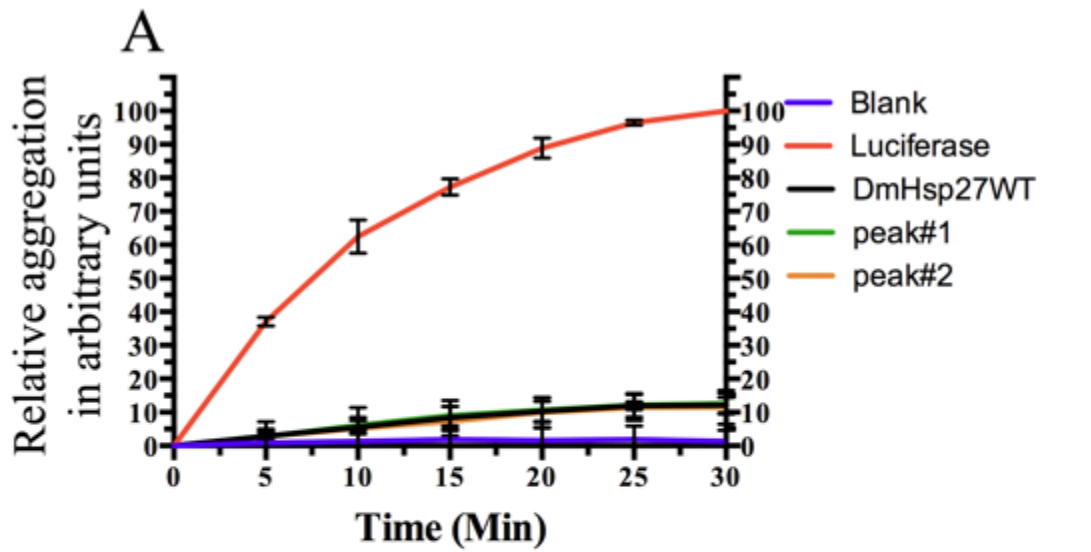


Figure 3.7: Effect of DmHsp27, its two peaks and ACD mutants on the heat-induced aggregation of luciferase.

The heat-induced aggregation of luciferase was observed by recording the optical density at 320 nm. The curve labeled luciferase correspond to aggregation of (0.1 μ M) of isolated protein substrates in the absence of DmHsp27, whereas the curves labeled DmHsp27WT or by peak#1 or #2 or DmHsp27R122G, DmHsp27R131G, DmHsp27R135G correspond to aggregation in the presence of (0.4 μ M) of the DmHsp27WT or its peak fractions (A) or different mutants (B and C). Data are representative of three independent experiments with error bars corresponding to the standard error of the mean.

The ability of DmHsp27WT and its arginine mutants to prevent aggregation of insulin under reductive conditions was also measured (Fig 3.8). Similar to the heat-induced aggregation assay, DmHsp27WT, from either of the two isolated populations (peaks #1 and #2) and DmHsp27R135G gave similar results. All these preparations were able to prevent the aggregation of half on the insulin present (Fig 3.8A and C). Interestingly, DmHsp27R122G and DmHsp27R131G mutants were more efficient and completely prevented aggregation of insulin (Fig 3.8 B and C).

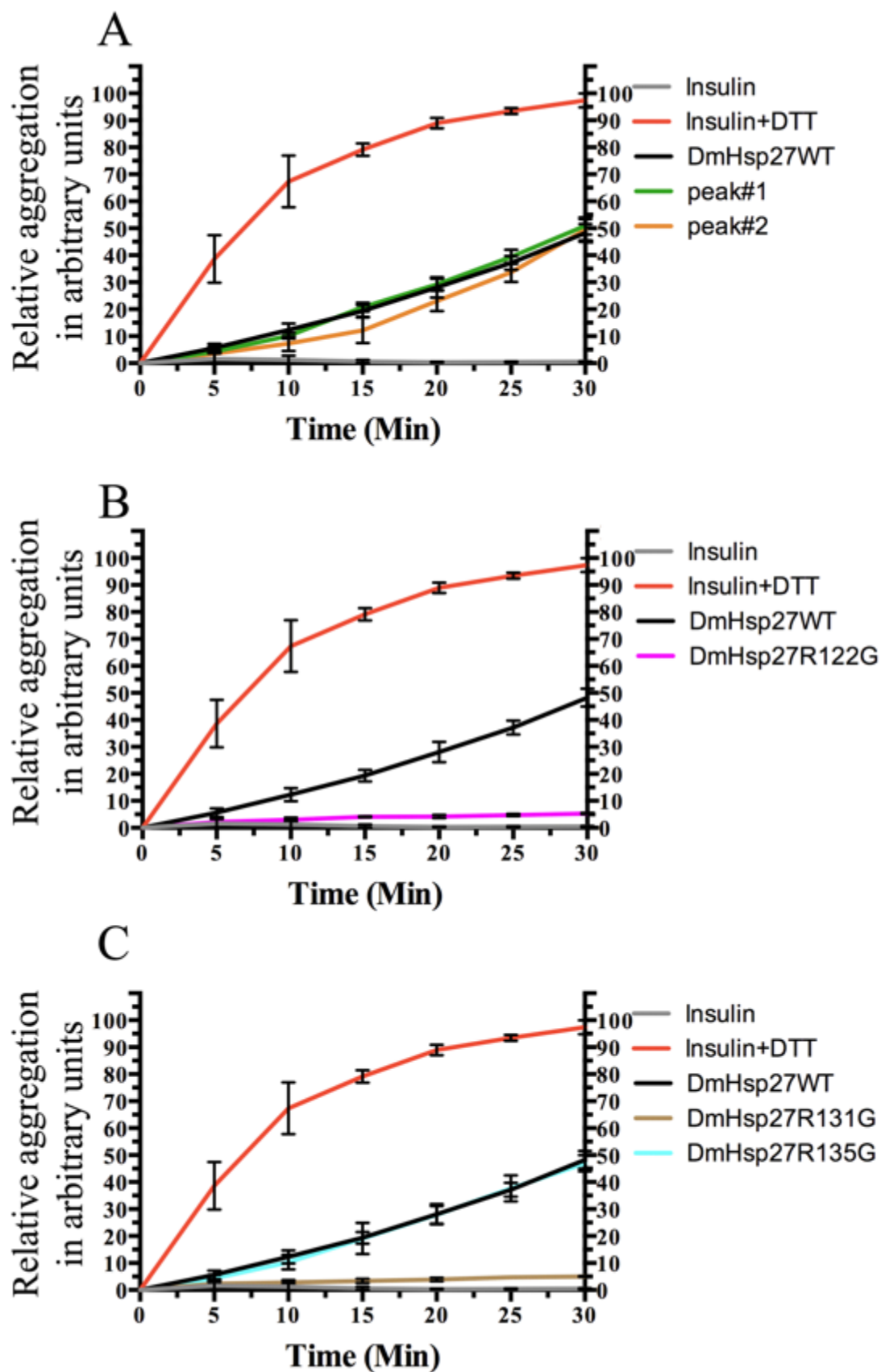


Figure 3.8: Effect of DmHsp27, its two peaks and ACD mutants on reduction-induced aggregation of insulin.

The reduction-induced aggregation of insulin was observed by recording the optical density at 320 nm. The reaction was started by addition of DTT up to the final concentration of 20 mM and aggregation of insulin was followed by an increase in the optical density at 320 nm (curve insulin+DTT). The curves labeled DmHsp27WT or by peak#1 or #2 or DmHsp27R122G, DmHsp27R131G, DmHsp27R135G correspond to aggregation of 52 μ M of insulin in the presence of DTT and 13 μ M of the DmHsp27WT or its peak fractions (A) or different mutants (B and C). The concentration of insulin, and DmHsp27 variants was equal to 0.3 mg/ml. Data are representative of three independent experiments with error bars corresponding to the standard error of the mean.

3.4 Discussion

Small Hsps constitute a diverse and widespread family of molecular chaperones. They are virtually ubiquitous proteins, being present in all kingdoms of life. The *Drosophila melanogaster* genome encodes 12 sHsps, which have distinctive developmental expression patterns, intracellular localizations and substrate specificities. Here, the structure and chaperone-like function of DmHsp27 nuclear sHsp and arginine mutants within the ACD was investigated.

DmHsp27 contains a single cysteine residue at position 93. While a cysteine residue is involved in the dimerization of HspB1 and murine Hsp25 (Baranova et al., 2011, Zavialov et al., 1998), the results presented here demonstrate that DmHSP27WT does not form dimeric interface through the disulfide bond. We suggest that DmHsp27 has the metazoan dimer structure dependent on salt bridges in the $\beta 6+7$ strand. This dimer structure referred as " $\beta 7$ -interface dimer" in which the $\beta 6$ - and $\beta 7$ -strands are fused into an elongated strand that forms the dimer interface with its counterpart from the neighbouring monomer in an anti-parallel orientation (Haslbeck and Vierling, 2015).

DmHsp27WT forms large soluble oligomers in physiological conditions. These oligomers tend to be larger and more polydisperse with increasing temperature. Interestingly, the change in oligomeric size observed with increasing temperature is completely reversible when the protein is cooled down. Similar results have been observed for HspB1 (Skouri-Panet et al., 2012). These results illustrate the possibility of an important reversible structural reorganization of DmHsp27 during thermal stress. The data of intrinsic tryptophan fluorescence showed that heating was accompanied by a monotonous decrease. Moreover the amplitude of fluorescence of DmHsp27WT returns to its initial value upon cooling, supporting an important reversible structural reorganization during stress around tryptophan residue.

The usual profile of sHsps on SEC is one symmetric peak corresponding to the oligomeric form. It has been reported that HspB1 and HspB5 form large oligomers with apparent molecular weight of approximately 560 kDa and 660 kDa respectively (Nefedova et al., 2013, Mymrikov et al., 2012). Our data suggest that unlike mammalian sHsps, DmHsp27WT forms two populations of oligomers with apparent molecular

weight of 725 kDa and 540 kDa. While sHsps are recognized to be dynamic and in constant equilibrium (Stengel et al., 2010, Basha et al., 2012), this does not appear to be the case for the oligomers of DmHsp27. Indeed, each isolated population gave a single peak with the same elution volume when separated and reanalyzed by SEC or native gel. Moreover, the chaperone activity of these populations was comparable to that of DmHsp27WT under reductive and heat stress conditions. The question arises why DmHsp27WT has two functional populations of oligomers. At present, there is no a clear answer to this question. However the recently published data obtained on AgsA an sHsp from the pathogenic bacterium *Salmonella enterica* showed that it exists in an equilibrium between two oligomeric states (18-mer and 24-mer). This equilibrium seems essential for chaperone activity *in vivo* (Mani et al., 2016). The results presented here suggest that the equilibrium between DmHsp27 populations is not important for its *in vitro* chaperone activity. Further experimentations will be needed to assess the *in vivo* function of the two population of DmHsp27.

In the hope of getting inactive mutants, three different arginine residues located in the ACD were mutated and characterized. DmHsp27 arginine122 is equivalent to HspB1 arginine127, whose mutation to tryptophan causes autosomal dominant distal hereditary motor neuropathy. Moreover, DmHsp27 arginine 131 is equivalent to HspB1 arginine 136, whose mutation to tryptophan or leucine is associated with autosomal dominant Charcot–Marie–Tooth disease of the second type (Evgrafov et al., 2004). Finally, DmHsp27 arginine 135 is equivalent to HspB1 arginine 140, HspB5 arginine 120 and HspB4 arginine 116, for which mutation to glycine and cysteine (HspB1-R140G, HspB4-R116C and HspB5-R120G) cause autosomal dominant distal hereditary motor neuropathy, Charcot–Marie–Tooth disease of the second type, dominant desmin related myopathy and cataracts (Gentil and Cooper, 2012, Vicart et al., 1998, Inagaki et al., 2006, Bera and Abraham, 2002, Litt et al., 1998).

Our data show that mutation of arginine residues within the ACD to glycine increased intrinsic fluorescence of tryptophan. This might signify that the tryptophan residue of DmHsp27 wild type is more accessible than the corresponding residue in ACD mutants, suggesting that the tryptophan environment within the (NTR) is more flexible.

Native electrophoresis and SEC analyses show that ACD mutants induce important changes in the quaternary structure of DmHsp27. All mutants form large oligomers of approximately 1100 kDa. This property of DmHsp27 arginine mutants to form large oligomers is similar to HspB1-R140G, HspB4-R116C and HspB5-R120G (Nefedova et al., 2013, Michiel et al., 2009, Cobb and Petrash, 2000, Bova et al., 1999, Bera et al., 2002, Kumar et al., 1999).

On the other hand, the mutant HspB1-R136W equally displayed an elution profile similar to wild type protein with two major peaks, corresponding to 700 kDa and 60 kDa (Almeida-Souza et al., 2010). Although, the mutant HspB1-R127W eluted predominantly in two peaks corresponding to 700 kDa and 30 kDa (Almeida-Souza et al., 2010).

In vivo, DmHSP27WT, R122G, R131G and R135G mutants presented the same intranuclear localization when expressed in HeLa cells and seemed associated with nuclear speckles.

The chaperone activity of R135 was comparable to that of DmHsp27WT under reductive stress and heat stress conditions, while R122G and R131G mutants were more efficient than DmHsp27WT to prevent aggregation of insulin. Some studies have shown that HspB4-R116C, HspB5-R120G and HspB1-R140G decrease the chaperone-like activity using a multitude of substrates (Kumar et al., 1999, Simon et al., 2007, Nefedova et al., 2013, Bova et al., 1999). Others have revealed that HspB5-R120G was comparable to HspB5WT in its ability to prevent aggregation of insulin (Treweek et al., 2005). General chaperone activity models suggest that sHsps dissociated to small oligomeric forms, presumably dimers, which re-associate to a new oligomeric form containing the bound substrate (Haslbeck and Vierling, 2015). In an attempt to understand how ACD mutations in DmHsp27 induce changes in the structure and chaperone activity, we used the 3D electrostatic surface representations of DmHsp27WT, R122G, R131G and R135G. In DmHsp27WT the groove antiparallel dimer interface is positively charged (Fig 3.9 A). The mutated DmHspR122G presents a change of charge from positive to negative in the top of the central region from the face view (Fig 3.9 B, arrow). This change is clearer in the central part from side view (Supplementary Fig 3.10). While for DmHspR131G, positively charged groove becomes slightly positive to hydrophobic (Fig 3.9 C). For these two mutants, the mutation of arginine (a bulky and positively charged amino acid) to

glycine (a small and non-charged amino acid) uncovered negative and hydrophobic regions, and could explain the increase of chaperone activity. The electrostatic potential of DmHspR135G revealed a slight change in the surface charge comparatively to DmHsp27WT (Fig 3.9 D). This could explain why its chaperone activity is similar to that of DmHsp27WT. A study by (Clark et al., 2011) shows that mutant HspB5-R120G can rearrange to form dimer by pairing between Histidine 83 and Aspartic acid 80. Such rearrangement could dissociate DmHsp27R135G in the same way to form dimer by pairing between glutamine 98 and aspartic acid 95 based on sequence alignment. It is possible that ACD dimer in DmHsp27 is able to have more than one conformation, and mutations changes would be compensated. Further crystallographic structures could give us such answers. Altogether these results characterize DmHsp27WT and its ACD arginine mutants. However, more investigations are required for the understanding of the molecular mechanisms responsible of this difference.

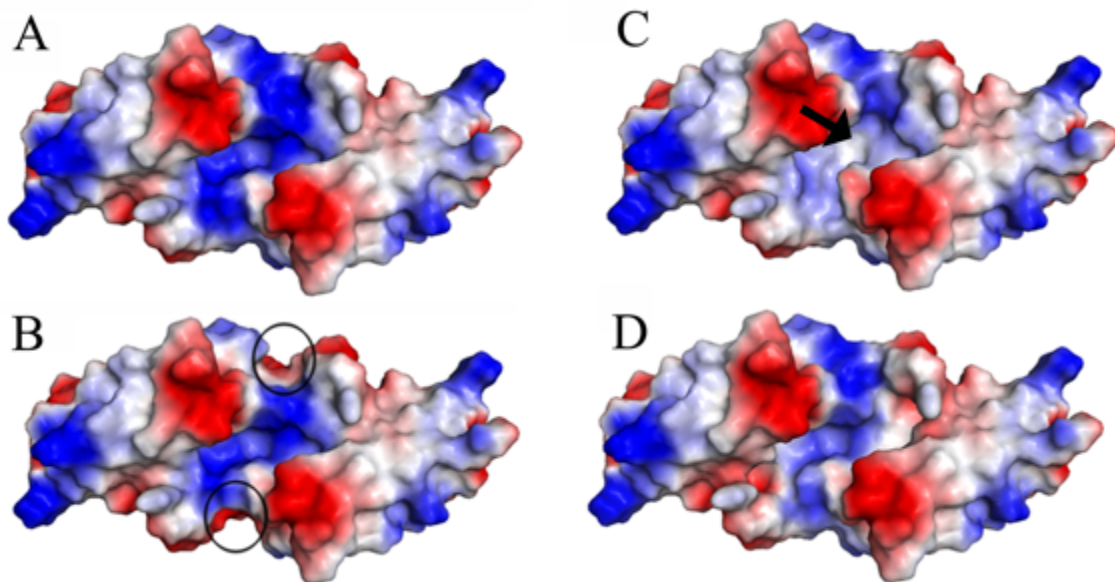


Figure 3.9: Electrostatic surfaces and charge distribution of DmHsp27WT and its ACD mutants.

Face view comparison of the electrostatic surfaces and charge of DmHsp27WT (A), R122G (B), R131G (C) and R135G (D). Black circles indicate differences between DmHsp27WT and R122G and black arrow indicate difference between DmHsp27WT and R131G.

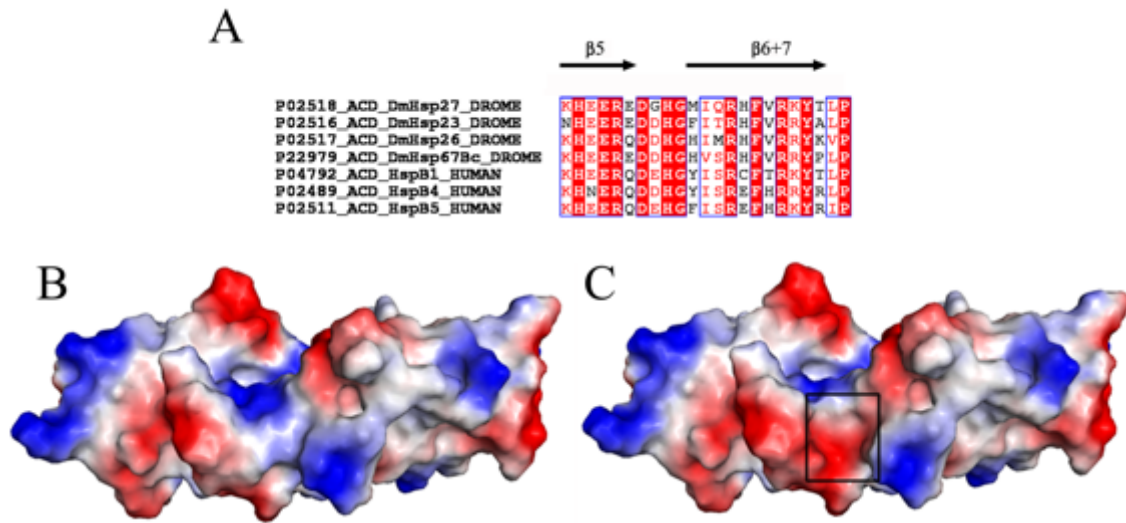


Figure 3.10: Supplementary Figure.

A- Sequence alignment of the region comprising strand $\beta 5$, connecting loop and strand $\beta 6+7$, of DmHsp27, DmHsp26, DmHsp23, DmHsp67Bc and human HspB1, HspB5. The residues homologous to DmHsp27 residues R122, R131 and R135 are indicated by black arrowheads. B- Side view of the surfaces and charge of DmHsp27WT (B) and R122G mutant (C). Black rectangle shows the charge difference.

3.5 Acknowledgments

We would like to thank Jérémie Hamel from Institute for Integrative Systems Biology (IBIS) for help with SEC, Fériel Skouri-Panet from Institute of Mineralogy, Materials Physics and Cosmochemistry and Ahmed Haouz from the crystallogenesi s Platform at the Pasteur Institute for technical help. This work was supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) to RMT. MTM held a studentship from PROTEO, Québec.

3.6 References

- ALMEIDA-SOUZA, L., GOETHALS, S., DE WINTER, V., DIERICK, I., GALLARDO, R., VAN DURME, J., IROBI, J., GETTEMANS, J., ROUSSEAU, F., SCHYMKOWITZ, J., TIMMERMAN, V. & JANSSENS, S. 2010. Increased monomerization of mutant HSPB1 leads to protein hyperactivity in Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *J Biol Chem*, 285, 12778-86.
- AMERIK, A. Y. & HOCHSTRASSER, M. 2004. Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. *Biochim Biophys Acta*, 1695, 189-207.
- BAGNERIS, C., BATEMAN, O. A., NAYLOR, C. E., CRONIN, N., BOELEN, W. C., KEEP, N. H. & SLINGSBY, C. 2009. Crystal structures of alpha-crystallin domain dimers of alphaB-crystallin and Hsp20. *J Mol Biol*, 392, 1242-52.
- BARANOVA, E. V., WEEKS, S. D., BEELEN, S., BUKACH, O. V., GUSEV, N. B. & STRELKOV, S. V. 2011. Three-dimensional structure of alpha-crystallin domain dimers of human small heat shock proteins HSPB1 and HSPB6. *J Mol Biol*, 411, 110-22.
- BASHA, E., O'NEILL, H. & VIERLING, E. 2012. Small heat shock proteins and alpha-crystallins: dynamic proteins with flexible functions. *Trends Biochem Sci*, 37, 106-17.
- BEAULIEU, J. F., ARRIGO, A. P. & TANGUAY, R. M. 1989. Interaction of Drosophila 27,000 Mr heat-shock protein with the nucleus of heat-shocked and ecdysone-stimulated culture cells. *J Cell Sci*, 92 (Pt 1), 29-36.
- BENNDORF, R., MARTIN, J. L., KOSAKOVSKY POND, S. L. & WERTHEIM, J. O. 2014. Neuropathy- and myopathy-associated mutations in human small heat shock proteins: Characteristics and evolutionary history of the mutation sites. *Mutat Res Rev Mutat Res*.
- BERA, S. & ABRAHAM, E. C. 2002. The alphaA-crystallin R116C mutant has a higher affinity for forming heteroaggregates with alphaB-crystallin. *Biochemistry*, 41, 297-305.
- BERA, S., THAMPI, P., CHO, W. J. & ABRAHAM, E. C. 2002. A positive charge preservation at position 116 of alpha A-crystallin is critical for its structural and functional integrity. *Biochemistry*, 41, 12421-6.
- BIASINI, M., BIENERT, S., WATERHOUSE, A., ARNOLD, K., STUDER, G., SCHMIDT, T., KIEFER, F., GALLO CASSARINO, T., BERTONI, M., BORDOLI, L. & SCHWEDE, T. 2014. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Res*, 42, W252-8.
- BONCORAGLIO, A., MINOIA, M. & CARRA, S. 2012. The family of mammalian small heat shock proteins (HSPBs): implications in protein deposit diseases and motor neuropathies. *Int J Biochem Cell Biol*, 44, 1657-69.
- BOVA, M. P., DING, L. L., HORWITZ, J. & FUNG, B. K. 1997. Subunit exchange of alphaA-crystallin. *J Biol Chem*, 272, 29511-7.
- BOVA, M. P., HUANG, Q., DING, L. & HORWITZ, J. 2002. Subunit exchange, conformational stability, and chaperone-like function of the small heat shock protein 16.5 from Methanococcus jannaschii. *J Biol Chem*, 277, 38468-75.

- BOVA, M. P., YARON, O., HUANG, Q., DING, L., HALEY, D. A., STEWART, P. L. & HORWITZ, J. 1999. Mutation R120G in alphaB-crystallin, which is linked to a desmin-related myopathy, results in an irregular structure and defective chaperone-like function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 6137-42.
- CASPERS, G. J., LEUNISSEN, J. A. & DE JONG, W. W. 1995. The expanding small heat-shock protein family, and structure predictions of the conserved "alpha-crystallin domain". *J Mol Evol*, 40, 238-48.
- CLARK, A. R., NAYLOR, C. E., BAGNERIS, C., KEEP, N. H. & SLINGSBY, C. 2011. Crystal structure of R120G disease mutant of human alphaB-crystallin domain dimer shows closure of a groove. *J Mol Biol*, 408, 118-34.
- COBB, B. A. & PETRASH, J. M. 2000. Structural and functional changes in the alpha A-crystallin R116C mutant in hereditary cataracts. *Biochemistry*, 39, 15791-8.
- DATSKEVICH, P. N., NEFEDOVA, V. V., SUDNITSYNA, M. V. & GUSEV, N. B. 2012. Mutations of small heat shock proteins and human congenital diseases. *Biochemistry (Mosc)*, 77, 1500-14.
- DE JONG, W. W., CASPERS, G. J. & LEUNISSEN, J. A. 1998. Genealogy of the alpha-crystallin--small heat-shock protein superfamily. *Int J Biol Macromol*, 22, 151-62.
- DELBECQ, S. P. & KLEVIT, R. E. 2013. One size does not fit all: the oligomeric states of alphaB crystallin. *FEBS Lett*, 587, 1073-80.
- EVGRAFOV, O. V., MERSIYANOVA, I., IROBI, J., VAN DEN BOSCH, L., DIERICK, I., LEUNG, C. L., SCHAGINA, O., VERPOORTEN, N., VAN IMPE, K., FEDOTOV, V., DADALI, E., AUER-GRUMBACH, M., WINDPASSINGER, C., WAGNER, K., MITROVIC, Z., HILTON-JONES, D., TALBOT, K., MARTIN, J. J., VASSERMAN, N., TVERSKAYA, S., POLYAKOV, A., LIEM, R. K., GETTEMANS, J., ROBBERECHT, W., DE JONGHE, P. & TIMMERMAN, V. 2004. Mutant small heat-shock protein 27 causes axonal Charcot-Marie-Tooth disease and distal hereditary motor neuropathy. *Nat Genet*, 36, 602-6.
- FU, X., JIAO, W. & CHANG, Z. 2006. Phylogenetic and biochemical studies reveal a potential evolutionary origin of small heat shock proteins of animals from bacterial class A. *J Mol Evol*, 62, 257-66.
- GENTIL, B. J. & COOPER, L. 2012. Molecular basis of axonal dysfunction and traffic impairments in CMT. *Brain Res Bull*, 88, 444-53.
- HASLBECK, M. & VIERLING, E. 2015. A first line of stress defense: small heat shock proteins and their function in protein homeostasis. *J Mol Biol*, 427, 1537-48.
- HEIRBAUT, M., BEELEN, S., STRELKOV, S. V. & WEEKS, S. D. 2014. Dissecting the functional role of the N-terminal domain of the human small heat shock protein HSPB6. *PLoS One*, 9, e105892.
- HOCHBERG, G. K., ECROYD, H., LIU, C., COX, D., CASCIO, D., SAWAYA, M. R., COLLIER, M. P., STROUD, J., CARVER, J. A., BALDWIN, A. J., ROBINSON, C. V., EISENBERG, D. S., BENESCH, J. L. & LAGANOWSKY, A. 2014. The structured core domain of alphaB-crystallin can prevent amyloid fibrillation and associated toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111, E1562-70.
- HOLMGREN, A. 1979. Thioredoxin catalyzes the reduction of insulin disulfides by dithiothreitol and dihydrolipoamide. *J Biol Chem*, 254, 9627-32.

- INAGAKI, N., HAYASHI, T., ARIMURA, T., KOGA, Y., TAKAHASHI, M., SHIBATA, H., TERAOKA, K., CHIKAMORI, T., YAMASHINA, A. & KIMURA, A. 2006. Alpha B-crystallin mutation in dilated cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun*, 342, 379-86.
- IROBI, J., VAN IMPE, K., SEEMAN, P., JORDANOVA, A., DIERICK, I., VERPOORTEN, N., MICHALIK, A., DE VRIENDT, E., JACOBS, A., VAN GERWEN, V., VENNEKENS, K., MAZANEC, R., TOURNEV, I., HILTON-JONES, D., TALBOT, K., KREMENSKY, I., VAN DEN BOSCH, L., ROBBERECHT, W., VAN VANDEKERCKHOVE, J., VAN BROECKHOVEN, C., GETTEMANS, J., DE JONGHE, P. & TIMMERMAN, V. 2004. Hot-spot residue in small heat-shock protein 22 causes distal motor neuropathy. *Nat Genet*, 36, 597-601.
- KRIEHLUBER, T., RATTEI, T., WEINMAIER, T., BEPPERLING, A., HASLBECK, M. & BUCHNER, J. 2010. Independent evolution of the core domain and its flanking sequences in small heat shock proteins. *FASEB J*, 24, 3633-42.
- KUMAR, L. V., RAMAKRISHNA, T. & RAO, C. M. 1999. Structural and functional consequences of the mutation of a conserved arginine residue in alphaA and alphaB crystallins. *J Biol Chem*, 274, 24137-41.
- LAGANOWSKY, A., BENESCH, J. L., LANDAU, M., DING, L., SAWAYA, M. R., CASCIO, D., HUANG, Q., ROBINSON, C. V., HORWITZ, J. & EISENBERG, D. 2010. Crystal structures of truncated alphaA and alphaB crystallins reveal structural mechanisms of polydispersity important for eye lens function. *Protein Sci*, 19, 1031-43.
- LASKOWSKI, R. A., MACARTHUR, M. W., MOSS, D. S. & THORNTON, J. M. 1993. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of Applied Crystallography*, 26, 283-291.
- LITT, M., KRAMER, P., LAMORTICELLA, D. M., MURPHEY, W., LOVRIEN, E. W. & WELEBER, R. G. 1998. Autosomal dominant congenital cataract associated with a missense mutation in the human alpha crystallin gene CRYAA. *Hum Mol Genet*, 7, 471-4.
- MAAROUFI, H. & TANGUAY, R. M. 2013. Analysis and phylogeny of small heat shock proteins from marine viruses and their cyanobacteria host. *PLoS One*, 8, e81207.
- MANI, N., BHANDARI, S., MORENO, R., HU, L., PRASAD, B. V. & SUGUNA, K. 2016. Multiple oligomeric structures of a bacterial small heat shock protein. *Sci Rep*, 6, 24019.
- MICHAUD, S., LAVOIE, S., GUIMOND, M. O. & TANGUAY, R. M. 2008. The nuclear localization of *Drosophila* Hsp27 is dependent on a monopartite arginine-rich NLS and is uncoupled from its association to nuclear speckles. *Biochim Biophys Acta*, 1783, 1200-10.
- MICHAUD, S., MORROW, G., MARCHAND, J. & TANGUAY, R. M. 2002. *Drosophila* small heat shock proteins: cell and organelle-specific chaperones? *Prog Mol Subcell Biol*, 28, 79-101.
- MICHIEL, M., SKOURI-PANET, F., DUPRAT, E., SIMON, S., FERARD, C., TARDIEU, A. & FINET, S. 2009. Abnormal assemblies and subunit exchange of alphaB-crystallin R120 mutants could be associated with destabilization of the dimeric substructure. *Biochemistry*, 48, 442-53.

- MOGK, A., SCHLIEKER, C., FRIEDRICH, K. L., SCHONFELD, H. J., VIERLING, E. & BUKAU, B. 2003. Refolding of substrates bound to small Hsps relies on a disaggregation reaction mediated most efficiently by ClpB/DnaK. *J Biol Chem*, 278, 31033-42.
- MORROW, G., HEIKKILA, J. J. & TANGUAY, R. M. 2006. Differences in the chaperone-like activities of the four main small heat shock proteins of *Drosophila melanogaster*. *Cell Stress Chaperones*, 11, 51-60.
- MORROW, G. V. & TANGUAY, R. 2015. *Drosophila* Small Heat Shock Proteins: An Update on Their Features and Functions. In: TANGUAY, R. M. & HIGHTOWER, L. E. (eds.) *The Big Book on Small Heat Shock Proteins*. Springer International Publishing.
- MYMRIKOV, E. V., SEIT-NEBI, A. S. & GUSEV, N. B. 2012. Heterooligomeric complexes of human small heat shock proteins. *Cell Stress Chaperones*, 17, 157-69.
- NEFEDOVA, V. V., DATSKEVICH, P. N., SUDNITSYNA, M. V., STRELKOV, S. V. & GUSEV, N. B. 2013. Physico-chemical properties of R140G and K141Q mutants of human small heat shock protein HspB1 associated with hereditary peripheral neuropathies. *Biochimie*, 95, 1582-92.
- RODRIGUES, J. P., LEVITT, M. & CHOPRA, G. 2012. KoBaMIN: a knowledge-based minimization web server for protein structure refinement. *Nucleic Acids Res*, 40, W323-8.
- SIMON, S., MICHIEL, M., SKOURI-PANET, F., LECHAIRE, J. P., VICART, P. & TARDIEU, A. 2007. Residue R120 is essential for the quaternary structure and functional integrity of human alphaB-crystallin. *Biochemistry*, 46, 9605-14.
- SKOURI-PANET, F., MICHIEL, M., FERARD, C., DUPRAT, E. & FINET, S. 2012. Structural and functional specificity of small heat shock protein HspB1 and HspB4, two cellular partners of HspB5: role of the in vitro hetero-complex formation in chaperone activity. *Biochimie*, 94, 975-84.
- STENGEL, F., BALDWIN, A. J., PAINTER, A. J., JAYA, N., BASHA, E., KAY, L. E., VIERLING, E., ROBINSON, C. V. & BENESCH, J. L. 2010. Quaternary dynamics and plasticity underlie small heat shock protein chaperone function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 2007-12.
- TREWEEK, T. M., REKAS, A., LINDNER, R. A., WALKER, M. J., AQUILINA, J. A., ROBINSON, C. V., HORWITZ, J., PERNG, M. D., QUINLAN, R. A. & CARVER, J. A. 2005. R120G alphaB-crystallin promotes the unfolding of reduced alpha-lactalbumin and is inherently unstable. *FEBS J*, 272, 711-24.
- VAN MONTFORT, R., SLINGSBY, C. & VIERLING, E. 2001. Structure and function of the small heat shock protein/alpha-crystallin family of molecular chaperones. *Adv Protein Chem*, 59, 105-56.
- VICART, P., CARON, A., GUICHENEY, P., LI, Z., PREVOST, M. C., FAURE, A., CHATEAU, D., CHAPON, F., TOME, F., DUPRET, J. M., PAULIN, D. & FARDEAU, M. 1998. A missense mutation in the alphaB-crystallin chaperone gene causes a desmin-related myopathy. *Nat Genet*, 20, 92-5.
- WEEKS, S. D., DRINKER, M. & LOLL, P. J. 2007. Ligation independent cloning vectors for expression of SUMO fusions. *Protein Expr Purif*, 53, 40-50.
- ZAVIALOV, A., BENNDORF, R., EHRNSPERGER, M., ZAV'YALOV, V., DUDICH, I., BUCHNER, J. & GAESTEL, M. 1998. The effect of the intersubunit disulfide

bond on the structural and functional properties of the small heat shock protein Hsp25. *Int J Biol Macromol*, 22, 163-73.

**Chapitre 4 : Analyse
fonctionnelle de la région N-
terminale de la petite protéine de
choc thermique DmHsp27**

Avant-Propos

Ce manuscrit est prêt pour soumission ; j'ai participé à la conception des expériences avec Dre Geneviève Morrow et Pr. Robert M Tanguay.

J'ai réalisé toutes les expériences présentées dans cet article, du clonage, mutagenèse, production, purification, aux analyses biochimiques et biophysiques. J'ai également rédigé l'article sous sa forme finale. Dre. Stéphanie Finet, Dre. Geneviève Morrow et Pr. Robert M Tanguay ont supervisé les travaux et ont fait une lecture critique et révision du manuscrit.

Effect of N-terminal region of nuclear *Drosophila melanogaster* small heat shock protein DmHsp27 on function and quaternary structure.

Mohamed Taha Moutaoufik¹, Geneviève Morrow¹, Stéphanie Finet², Robert M Tanguay^{1*}

1- Laboratoire de génétique cellulaire et développementale, Département de biologie moléculaire, de biochimie médicale et de pathologie, Institut de biologie intégrative et des systèmes (IBIS) and PROTEO, Université Laval, Québec, Canada G1V 0A6

2- 2- IMPMC UMR7590, CNRS, UPMC Paris 6, 4 place Jussieu, Paris, France.

* Corresponding author

Email: Robert.tanguay@fmed.ulaval.ca (RMT)

Phone : 418-656-3339

Résumé

L'importance de la région N-terminale (NTR) dans l'oligomérisation et l'activité chaperone de la protéine de choc thermique DmHsp27 de *Drosophila melanogaster* a été étudiée par mutagenèse en utilisant la chromatographie d'exclusion et l'électrophorèse native. La mutation des deux sites de phosphorylation dans la région N-terminale, S58 et S75 n'affecte pas l'équilibre oligomérique ni la localisation intracellulaire après transfection dans des cellules de mammifères. Suppression ou mutation de résidus spécifiques dans la région NTR délimitait un motif (FGFG) important pour la structure oligomérique et l'activité chaperone de DmHsp27. Bien que la suppression totale de la région N-terminale entraîne une perte totale de l'activité chaperone, la délétion du motif (FGFG) à la position 29-32 ou mutation ponctuelle de F29A/Y, G30R et G32R augmente l'oligomérisation et l'activité chaperone dans les conditions de non-choc thermique en utilisant l'insuline comme substrat, suggérant l'importance de ce site pour l'activité chaperone. Contrairement aux sHsps de mammifères, l'activation par la chaleur de DmHsp27 conduit à une augmentation d'oligomérisation pour former de grandes structures d'environ 1100 kDa. Un nouveau mécanisme d'activation thermique pour DmHsp27 est présenté.

Mots clés

Petites protéines de choc thermique ;sHsp; chaperon ; *Drosophila melanogaster*; région N-terminale; DmHsp27

Abstract

The importance of the N-terminal region (NTR) in the oligomerization and chaperone-like activity of the *Drosophila melanogaster* small nuclear heat shock protein DmHsp27 was investigated by mutagenesis using size exclusion chromatography and native gel electrophoresis. Mutation of two sites of phosphorylation in the N-terminal region, S58 and S75, did not affect the oligomerization equilibrium or the intracellular localization of DmHsp27 when transfected into mammalian cells. Deletion or mutation of specific residues within the NTR region delineated a motif (FGFG) important for the oligomeric structure and chaperone-like activity of this sHsp. While deletion of the full N-terminal region, resulted in total loss of chaperone-like activity, removal of the (FGFG) at position 29 to 32 or single mutation of F29A/Y, G30R and G32R enhanced oligomerization and chaperoning capacity under non-heat shock conditions in the insulin assay suggesting the importance of this site for chaperone activity. Unlike mammalian sHsps DmHsp27 heat activation leads to enhanced association of oligomers to form large structures of approximately 1100 kDa. A new mechanism of thermal activation for DmHsp27 is presented.

Keywords

Small heat shock proteins; chaperone; *Drosophila melanogaster*; N-terminal region; DmHsp27

4.1 Introduction

The small heat shock proteins (sHsps) are a ubiquitous family of ATP-independent stress proteins found in all domains of life (Maaroufi and Tanguay, 2013, Caspers et al., 1995, de Jong et al., 1998, Fu et al., 2006, Bourrelle-Langlois et al., 2016). They are up-regulated in response to a variety of stresses that negatively impact protein homeostasis. sHsps have a low molecular weight in the range of 12-43 kDa and are able to form large oligomeric complexes with very dynamic quaternary structure (Kim et al., 1998, van Montfort et al., 2001b, Hanazono et al., 2013, Stengel et al., 2010, Benesch et al., 2010).

Small Hsps contain a tripartite architecture composed of a conserved α -crystallin domain (ACD) flanked by variable N-terminal region (NTR) and C-terminal extension (CTE) (Haslbeck and Vierling, 2015, Basha et al., 2012, Kappe et al., 2010). The NTR is highly variable in length and composition and has been partially modeled; it does not show continuous electron density suggesting a certain level of structural disorder (Kim et al., 1998, van Montfort et al., 2001b, Hanazono et al., 2013, McHaourab et al., 2012, Bepperling et al., 2012). Indeed predictions suggest that the NTR contains some sequence bias common for intrinsically disordered proteins (Weeks and Bouckaert, 2014). In vertebrate and plant sHsps this region has previously been described as a determinant of chaperone activity, substrate specificity and is essential for assembly of the higher order oligomers. (Basha et al., 2006, Heirbaut et al., 2014, Jehle et al., 2011, Braun et al., 2011). The lack of sequence conservation and structure of the NTR in sHsps gives rise to the question as to whether it has a conserved functional role (Heirbaut et al., 2015).

Phosphorylation of human sHsps has been reported to regulate their structure and function (Arrigo, 2013, Haslbeck et al., 2015, Peschek et al., 2013, Rogalla et al., 1999, Kato et al., 1994, Ito et al., 2001). These sites of phosphorylation are located in the NTR suggesting that the phosphorylation primarily affects N-terminal contacts in the oligomer (Braun et al., 2011, Peschek et al., 2013). Non-mammalian sHsps can also be phosphorylated: phosphorylated species of *Drosophila melanogaster* DmHsp27, DmHsp26, CG14207, maize Hsp22 and yeast Hsp26 have been described (Lund et al., 2001, Ficarro et al., 2002, Morrow and Tanguay, 2015, Zhai et al., 2008, Bodenmiller et

al., 2007). However, we ignore the phosphorylation effect of non-mammalian sHsps on their structure and activity (Haslbeck and Vierling, 2015).

Drosophila melanogaster Hsp27 (DmHsp27) is a nuclear-localized sHsp (Beaulieu et al., 1989a, Michaud et al., 2008, Moutaoufik et al., 2016). In addition to its up-regulation in response to stress, DmHsp27 also shows tissue- and stage-specific expression patterns during development (Michaud et al., 2002). We previously showed that, unlike metazoan sHsps, DmHsp27 forms two populations of large oligomers (725 and 540 kDa) that are able to prevent substrate aggregation (Moutaoufik et al., 2016). Here we investigate the importance of the NTR in DmHsp27. We show that, unlike mammalian sHsps, phosphorylation of N-terminal serines in DmHsp27 does not affect the oligomeric state nor the intracellular localization of the protein.

In addition to phosphorylation sites, the NTR contains some sequences that are conserved. Deletion of a conserved FGFG motif (position F29 to G32) results in formation of large oligomers and an increase in chaperone-like activity at non-stress (non-activating) temperature using insulin as a chaperone assay. We further determined the effects of single point mutations within the FGFG motif on oligomeric structure and chaperone-like activity. Mutation of phenylalanine 29 to an alanine or tyrosine (F29A or F29Y) and glycine 30 or 32 to arginine (G30R or G32R) affects oligomerization and display a better chaperone-like activity than the wild-type protein in non-heat shock condition using insulin. Surprisingly, heat activation of DmHsp27 leads to enhanced association to form large size oligomers of approximately 1100 kDa suggest a new mechanism of thermal activation for DmHsp27.

4.2 Results

4.2.1 Effect of Serine phosphorylation on oligomeric structure and localization of DmHsp27

The NTR of vertebrate and plant sHsps has previously been described as a determinant of chaperoning activity and substrate specificity (Basha et al., 2006, Heirbaut et al., 2014). At least, in vertebrate sHsps, post-translational modifications such as phosphorylation of serine residues found in the NTR are believed to affect the association/dissociation equilibrium of sHsps oligomers and lead to chaperone function activation (Haslbeck et al., 2015, Hayes et al., 2009, Ehrnsperger et al., 1997, Shashidharamurthy et al., 2005).

DmHsp27 is present in up to four isoforms according to the tissue and developmental stage (Marin et al., 1996b). It has been reported to be phosphorylated at NTR on at least two serines (S58 and S75) (Bodenmiller et al., 2007, Zhai et al., 2008, Morrow and Tanguay, 2015). Whether serine phosphorylation affects the structure of DmHsp27 is an open issue. To study the effect of serine phosphorylation on the oligomeric structure and localization of DmHsp27, we constructed phosphomimetic and nonphosphorylatable mutants. To mimic phosphorylation serine (S) residues (S58 and/or S75) were substituted by aspartic acid (D) (S58D, S75D and S58/75D). To block phosphorylation, serine (S) residues (S58 and/or S75) were substituted by nonphosphorylatable alanine (A) (S58A, S75A and S58/75A). The migration profile of DmHsp27, phosphomimetic and nonphosphorylatable mutants on native gels was compared. As reported previously (Moutaoufik et al., 2016), DmHsp27 forms two populations of oligomers with apparent molecular weight of 725 and 540 kDa. Phosphomimetic and nonphosphorylatable mutants showed the same populations as wild type DmHsp27 with a light shift for phosphomimetic mutants due to the negative charge of aspartic acid (D) (Fig 4.1A). All mutated constructs demonstrated the equivalent chaperone-like activity to the wild type protein with different substrates (Fig 4.1B and C).

It has been reported that phosphorylation of human HspB1 and HspB5 is a mechanism for nuclear localization in unstressed cells (den Engelsman et al., 2013). The

role of post-translational modifications on the cellular localization of DmHsp27 was therefore examined by immunofluorescence after transfection in HeLa cells. As previously reported (Beaulieu et al., 1989b, Michaud et al., 2008, Moutaoufik et al., 2016), phosphomimetic and nonphosphorylatable mutants of DmHsp27 showed a nuclear localization and association with nuclear speckles similar to the wild type protein. (Fig 4.1D). These results signify that unlike vertebrate/mammalian sHsps, the two sites of phosphorylation S58 and S75 do not affect the oligomerization equilibrium nor the intracellular localization of DmHsp27.

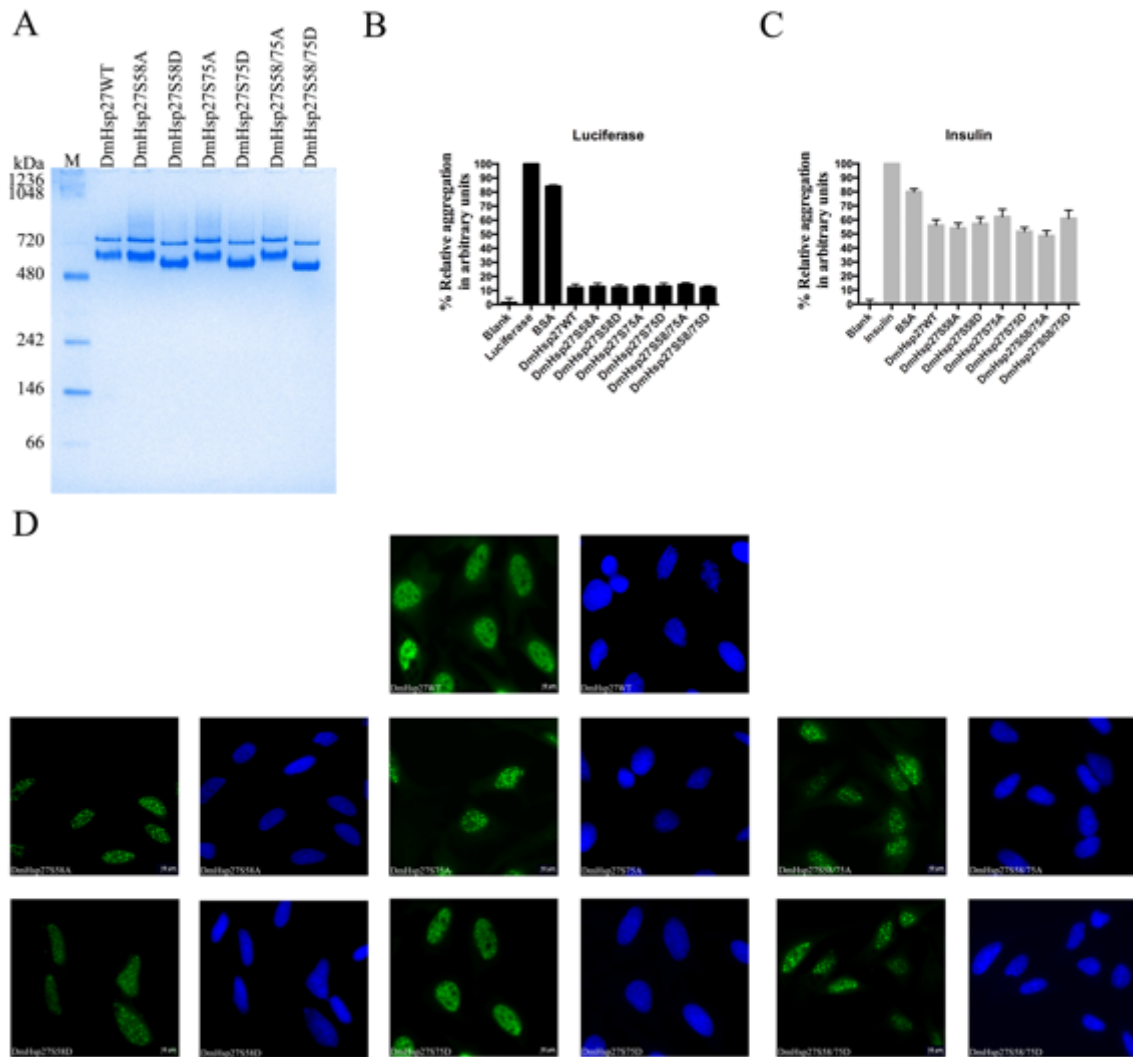


Figure 4.1: Phosphorylation effect of on oligomerization and localization of DmHsp27.

A- Native gradient (4-12%) polyacrylamide gel electrophoresis of recombinant DmHsp27 wild-type, phosphomimetic and nonphosphorylatable serine mutants. Positions of protein markers with molecular weights are shown on the left.

B and C- Preventing aggregation of luciferase and insulin using phosphomimetic and nonphosphorylatable mutants. Data are representative of three independent experiments with error bars corresponding to the standard error of the mean.

D- Intracellular localization of DmHSP27 and its phosphomimetic and nonphosphorylatable mutants in transfected HeLa cells. Forty-eight hours post-transfection, HeLa cells were fixed, permeabilized, and processed for immunofluorescence using antibodies against DmHsp27 (green). Nuclei were counterstained with DAPI. Scale bar is 10 μ m.

4.2.2 Further characterization of NTR in DmHsp27

The N-terminal region of sHsps is generally considered as being poorly conserved at the sequence level. Alignment of NTR of DmHsp27 with some human, murine, fish and Methanococcus sHsps shows high conservation of two residues (F29 and G30 in DmHsp27) (Fig 4.2A). We next examined the effect of these conserved residues within the NTR on the oligomeric structure and localization of DmHsp27. A deletion of the first 86 amino acids of the N-Terminal region (Del_Nter), had a striking effect on the oligomeric equilibrium, which showed a wide band (from 480 to 146 kDa) and one extra band in the region of dimer (Fig 4.3A). This mutant failed to prevent heat-induced aggregation of luciferase (Luc) (Fig. 4.3B), citrate synthase (CS) (Fig 4.3D), L-malate dehydrogenase (MDH), (Fig 4.3E) and DTT-induced aggregation of insulin (Fig. 4.3 C). Accordingly, the NTR of DmHsp27, as seen in other sHsps, is essential for oligomerization and chaperone activity at least for the substrates tested. To further investigate residues that are important for the oligomeric structure and the chaperone-like activity of DmHsp27, we used blast similarity of NTR-DmHsp27. The obtained sequences all belong to insect sHsps. Alignment of these sequences helped to delineate a conserved sequence motif (FGXG) from phenylalanine 29 to glycine 32 in DmHsp27 (Fig 4.2B).

A

DmHSP27_Dmel
I2Jefl_Dmel
HSPB1_Human
HSPB4_Human
HSPB5_Human
HSPB6_Human
CryAA_Mouse
CryAB_Mouse
CryAA_DANRE
CryAB_DANRE
HSP20_METM6

DmHSP27_Dmel
I2Jefl_Dmel
HSPB1_Human
HSPB4_Human
HSPB5_Human
HSPB6_Human
CryAA_Mouse
CryAB_Mouse
CryAA_DANRE
CryAB_DANRE
HSP20_METM6

```

-----MSI I PL--LHLARELDHD-YRTD--WGHLLEDDFGFGVHAHD-----
-----MSVVP LMF RDWDDELDFP-MR----T S R L L D Q H F G Q G L K R D D-----
MTERRVP F S L L R G--P SWD-----P-FRDWY P H S R L F D Q A F G L P R L P E E W S Q W L G G
-----MDVT IQ--HPWFKRT LGP-FY----P S R L F D Q F F G E G L F E Y D-----
-----MDIAIH--HPWIRRP FFP-FHS---P S R L F D Q F F G E H L L E S D-----
-----MEIPVPVQ--P SWLRRASAP-LPGLSAPGR LFDQR F G E G L L E A E-----
-----MDVT IQ--HPWFKRALGP-FY----P S R L F D Q F F G E G L F E Y D-----
-----MDIAIH--HPWIRRP FFP-FHS---P S R L F D Q F F G E H L L E S D-----
-----MDIAIQ--HPWFRRTLGY----P T R L F D Q F F G E G L F D Y D-----
-----MEISIQ--HPWRRRPLFGPFF---P Y R I F D Q Y F G E H L S D S D-----
-----MFGDRPKDP-----F S E I F K V--F G M G V-----

-----L F H P R R L L P N T L G L G R R R Y S P Y E R S H G H N Q M R R A S G G P N A L L P A V G
-----L M S S V W N S R P T V L R-----S G Y L R P W H T N S L Q K Q E S G S T L N I D-----
S S W P G Y V R P L P P A A I E S P-----A V A A P A Y S R A L S R Q L S S G V S E I R H T--
-----L P F L S T I S-----P Y Y R Q S L F R T V--L D S G I-----
-----L F P T S T S L S P-----F Y L R P P S F L R A P S W F D T G L S E M R-----
-----L A A L C P-----T T L A P Y Y L R A P S V A L P V A Q V P T D-----
-----L P F L S T I S-----P Y Y R Q S L F R T V--L D S G I-----
-----L F S T A T S L S P-----F Y L R P P S F L R A P S W I D T G L S E M R-----
-----L P F F T T V S-----P Y Y R H S L F R N I L D S S N S C V S E V R S D-----
-----P F S P F Y T M-----F Y Y R P Y L W R--F P S W W D S C M S E M R Q D--
-----P M E G F G G-----P M G K S M F Q M S M G L E I S G K G F M P I T L-

```

B

HSP27_Drosophila-melanogaster
HSP27_Drosophila-simulans
HSP27_Drosophila-yakuba
HSP27_Drosophila-erecta
HSP27_Drosophila-ananassae
HSP27_Drosophila-persimilis
HSP27_Drosophila-willistoni
HSP27_Drosophila-albomicans
HSP27_Drosophila-busckii
HSP27_Drosophila-buzzatii
HSP27_Drosophila-sulfrigaster-albostrigata
HSP27_Drosophila-virilis
HSP27_Drosophila-mojavensis
HSP27_Drosophila-grimshawi
HSP20_Bactrocera-dorsalis
HSP27_Ceratitiscapitata
XIHSP27_Bactrocera-dorsalis
HSP27_Musca-domestica
HSP27_Stomoxys-calci-trans
HSP27_Drosophila-repletoideis
HSP27_Lucilia-cuprina
HSP25_Sarcophaga-crassipalpis
HSP26_Musca-domestica
HSP27_Musca-domestica
HSP27like_Musca-domestica
HSP27_Stomoxys-calci-trans

```

MSI I P L L H-LARELDHDYR---TDWG-HLLEDDFGFGVHAHDLFHP-RRLLLP
MSI V P L L H-LARELDHDYR---SDWG-HFLEDDFGFGVHAHDLFHP-RRLLMLP
MSI V P L L H-LARELDHDYR---SDWE-HLLEDDFGFGVHAHDLFHP-RRLLMLP
MSI V P L L H-LARELDHDYR---NDWE-HLLEDDFGFGVHAHDLFHP-RRLLMLP
MSI I P L L N-LARELDHDYRGA FNNDWD-HFLEDDFGFGVHAHDLFHP-PRLLMMP
MSL V P L L S-LARELDHDYR-SAYNEWD-HFLEDDFGFGVHAHDLFQR-PRLLMLP
MSI I P L L N-LARELDHDFR---SSED-HFLDDDFGFGVHAQELFHR-PRLLMLP
MSI V P L L S-LARDLESAYS---DWD-HMLDDDFGFGVHAHEL FHR-PRLLMMP
MSI V P L L N-LARELDYAYN---DWD-HLDDDFGFGVHAQELFHR-PRIMMP
MSI I P L L S-LARDLDTAYN---DWD-HFLDDDFGGLHVNELFHR-PRLVIP
MSI V P L L S-LARDLESAYS---DWD-HMLDDDFGFGVHAHEL FHR-PRLLMMP
MSI V P L L S-LARDLDSAYN---DWD-HFLDDDFGFGVHAHEL FHR-PRLVMP
MSI V P L L S-LARDLDSAYS---DWD-HFLDDDFGGLHVNELFHR-PRLVIP
MSI V P L L S-LARDLESAYS---DWD-HLDDDFGFGVHAHEL FHRSPRPLMP
MAI V P L L A N L A R E L D T O Y R---DLE-HYWDDDFGFGIHPMEIFRP-TRH--
MAI V P L L V N L A R E L D S O Y R---DIEQHLWDDDFGGLHPLDIIRP-VRHGH-
MAI V P L L A N L A R E L D T O Y R---DLE-HYWDDDFGFGIHPMEIFRP-TRHGH-
MSL V P I L M H L A R D L D---AEHRGLDEWDR L L D D D F G F G I N P V D I F R---P R L A Q L
MSL V P I L M H L A R D L D---AEHRGHOEWDR L L D D D F G Y G I N P V D I F H H---P R W S R S
MSI V P L L S-LARDLDTAYN---DFD-HFLDDDFGFGVHAHEL FQR-PRLLMMP
MSL V P L L R E F E-A L N-----DVEQLLEDSFGLGIHPIDIFR--PYERSL
MSL V P L L V N L A R G L E N D Y H H H H G L D W D R F L D D D F G F G I N P V D I F R---P R L T T N
MSL I P L L R E L D D T F S-----DVEDFECPFGLGIHPVDIFR--PRHRSI
MSI I P L L R E L E D S F S-----GVEDILEAPFGLGIHPVDIFR--PRHRSI
MSL I P L L R E I D N T F G-----GVEDLEEFGLGIYPVDIFR--PRHNSL
MSL V P I L M H L A R D L D---AEHRRVDS L D R L L D D D F G F G I N P V D I F R---P L W C G Q

```

HSP27_Drosophila-melanogaster
HSP27_Drosophila-simulans
HSP27_Drosophila-yakuba
HSP27_Drosophila-erecta
HSP27_Drosophila-ananassae
HSP27_Drosophila-persimilis
HSP27_Drosophila-willistoni
HSP27_Drosophila-albomicans
HSP27_Drosophila-busckii
HSP27_Drosophila-buzzatii
HSP27_Drosophila-sulfrigaster-albostrigata
HSP27_Drosophila-virilis
HSP27_Drosophila-mojavensis
HSP27_Drosophila-grimshawi
HSP20_Bactrocera-dorsalis
HSP27_Ceratitiscapitata
XIHSP27_Bactrocera-dorsalis
HSP27_Musca-domestica
HSP27_Stomoxys-calci-trans
HSP27_Drosophila-repletoideis
HSP27_Lucilia-cuprina
HSP25_Sarcophaga-crassipalpis
HSP26_Musca-domestica
HSP27_Musca-domestica
HSP27like_Musca-domestica
HSP27_Stomoxys-calci-trans

```

-----NTLGLGRRRYS P Y E R S H G H--H N Q M S-----R R A S G G-P N A L L P A V G
-----NTLGLGRRRYS P Y E R S H G H--H N Q V S-----R R A S G G-P N S L L P A V G
-----STVGLGRRRYS P Y E R S H G H--H H H L V P-----R R S G G G-Q N S L L P A V G
-----SNLGVGRRRYS P Y E R S H G H--H H H L V P-----R R S G G G-Q N S L L P A V G
-----HGS-I G R R R F L P Y E R N H H H G--H H Q L V P-----R R Q S G G-Q N S L L P A V G
H-----H G S T L G R R R F L P Y E R S H H H G H P H Q L V T-----R R Q S G G G Q N S L I P A I G
HYGAGGMGI G R R R Y L P D R S H H H H P H H Q L V P-----R R R S G G Q N S L P A I G
HH--VA-H R R R P H F M P Y E R S H H H--H Q V V P-----A S R R R S G G Q N A L L P I I G
QL--MH--R R R H S F A P Y E R N H H H--H Q L V P-----A R R R G T--L G Q S S L L P A V G
HQ--LH--R R R S H S P Y E R S--H--H Q L V P-----A R R R G S A G-Q N A L L P T I G
HH--VA-H R R R P H F M P Y E R S--H--H Q L V P-----A S R R R S G G Q N A L L P I I G
HH--LH--R R R S H F M P Y E R N--H--H Q L V P-----A R R R G S V G-Q N S L L P V V G
HH--LH--R R R S H F S P Y E R S--H--H Q L L P-----A R R R A S V G-Q N S L L P T V G
HQ--L Q L H R R R S H F N P Y D R H--H--H P L A L-----R R R G S G G G Q N A L L P V I G
-----S L M L Q P R R R H Y P D R A-----Q V L A R-----R A A R L G K D T A E C S S I P T V G
-----S I M L H P R R R H I P Y D R S-----Q V L T R-----R A G R L G K E A G E C S S I P T V G
-----S L M L Q P R R R H Y P D R A-----Q V L A R-----R A A R L G K D T A E C S S I P T V G
HG-----R R P F Y S P Y M L G G R R-----H H H R Q-----H R D R N E--L S V M P M V G
HT-----R R P L Y A P Y L L N--R R-----H H L R Q-----N R D K N E--L S L M P T V G
-----Q H--R R R P L F T P Y E R Y H H L--H Q L V P A A S A A R R R A T P A S G Q N A L L P V V G
V L--R Q-----P R R R Y N P Y I V A K F Q-----R P G R G-----K L D E L E K S E L Q V P H V G
S S--S L L Q P R R S V Y S P Y L S R R Q-----R H H R E-----K N D S T S G S T A L M P T V G
M L--H-----P R N R Y C P Y I A R Y N--R P R-----K E S S M E K S D--I I P T V G
V L--R-----P R N R Y P Y--V I K Y Q--H P I-----K K S P A E K S D S I V P T V G
I L--Y-----P R N S Y C P Y--L A R C G--R P R-----K E A S T K K S E--L L P T V G
Q-----R S L S P Y M L S-----R R Q-----H S D K N E--S S L I P T V G

```

Figure 4.2: Sequence analysis of the N-terminal region of different sHsp

The alignment was made using Muscle (Edgar, 2004). The conserved residues are darkly highlighted in the alignment.

A- Multiple sequence alignment of the NTR of DmHsp27 with l(2)efl from *Drosophila melanogaster*, human (HspB1, HspB4, HspB5 and HspB6), Mouse (CryAA and CryAB), zebrafish (CryAA_DANRE and CryAB_DANRE) and *Methanococcus maripaludis* C6 (Hsp20_METM6).

B- Multiple sequence alignment of the NTR of sHsps obtained using blast similarity of NTR-DmHsp27. Sequence from *Drosophila melanogaster*_Hsp27, *Drosophila simulans*_Hsp27, *Drosophila yakuba*_Hsp27, *Drosophila erecta*_Hsp27, *Drosophila ananassae*_Hsp27, *Drosophila persimilis*_Hsp27, *Drosophila willistoni*_Hsp27, *Drosophila albomicans*_Hsp27, *Drosophila busckii*_Hsp27, *Drosophila buzzatii*_Hsp27, *Drosophila sulfurigaster-albostrigata*_Hsp27, *Drosophila virilis*_Hsp27, *Drosophila mojavensis*_Hsp27, *Drosophila grimshawi*_Hsp27, *Drosophila repletoides*_Hsp27, *Bactrocera dorsalis*_Hsp20, *Ceratitis capitata*_Hsp27, *Bactrocera dorsalis*_Hsp27, *Musca domestica*_Hsp27, *Stomoxys calcitrans*_Hsp27, *Lucilia cuprina*_Hsp27, *Sarcophaga crassipalpis*_Hsp25.

Analysis of a deletion construct eliminating these four residues (del_FGFG) on a native gel, showed that the absence of this region affected the oligomeric equilibrium forming considerably large oligomers (Fig 4.3A). The same construct prevented heat aggregation of Luc, CS and MDH efficiently as DmHsp27 wild type (Fig 4.3B, D and E). Surprisingly, in non-heat condition when using insulin as a substrate, the del_FGFG construct was more efficient in prevention of DTT-induced aggregation of insulin than the WT protein (Fig 4.3 C).

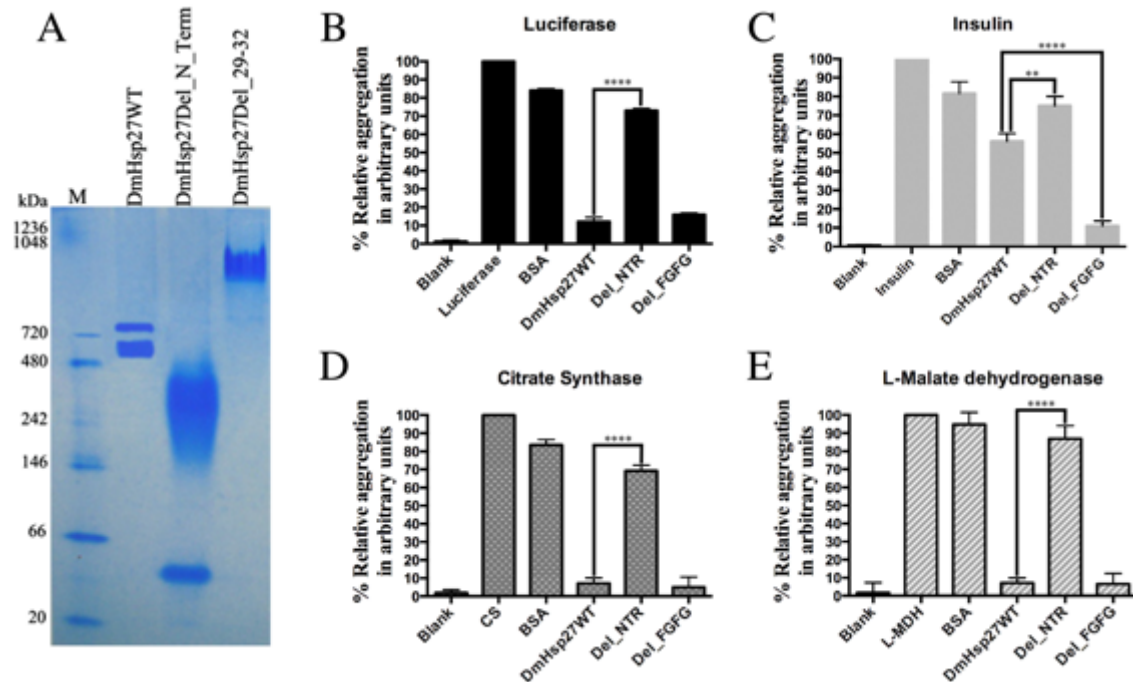


Figure 4.3: N-Terminal region is essential for oligomerization and chaperon-like activity.

A- Native gradient (4-12%) polyacrylamide gel electrophoresis of recombinant DmHsp27 and mutants without N-terminal region and after deletion of FGFG motif at 20°C.

B, C, D and E- Prevention of aggregation of luciferase, insulin, citrate synthase and L-malate dehydrogenase using deletion of N-terminal region or deletion of 29-32 FGFG motif. The standard error calculated from 3 sets of independent experiments. ** indicates $P < 0.01$; **** indicates $P < 0.0001$.

4.2.3 Dissecting the FGFG (29-32) motif.

Since deletion of residues FGFG (29-32) induces formation of a large oligomer, we investigated this region more carefully using single point mutations. Specifically, we focused on F29 (present in all sequences examined) and F31 (less conserved), two residues with large side chains. Phenylalanine in both positions was mutated to an alanine, a smaller amino acid (F29A and F31A), or to an amino acid (tyrosine) that mimicked the size of the original amino acid but altered the hydrophobicity (F29Y and F31Y). The highly conserved glycines G30 and G32 were mutated to alanine (G30A and

G32A) and to a positively charged larger amino acid arginine (G30R and G32R). Mutations in F31 (F31A and F31Y) (Fig 4.4A) or in G30 and G32 (G30A and G32A) (Fig 4.4B) had no effect on oligomerization as shown by the presence of two bands like wild type DmHsp27. However, F29A, F29Y, G30R and G32R showed dramatic changes in oligomeric size as seen for deletion FGFG (29-32) (Fig 4.4 A and B).

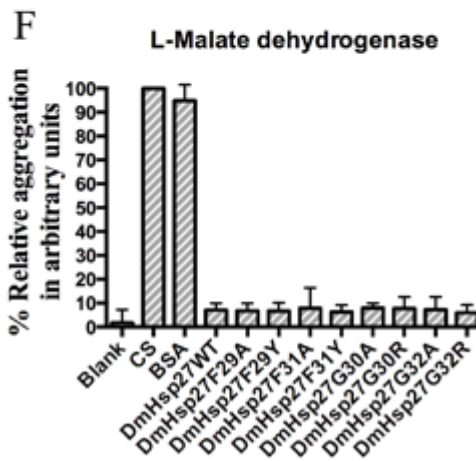
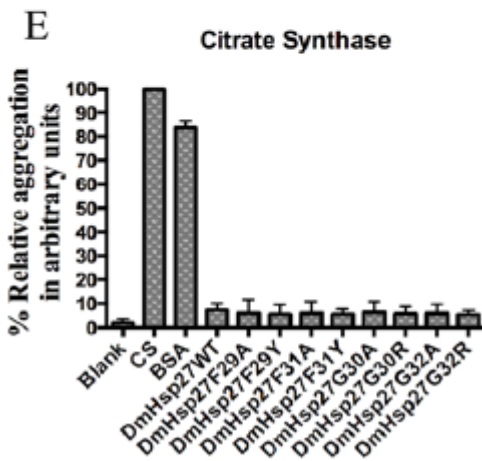
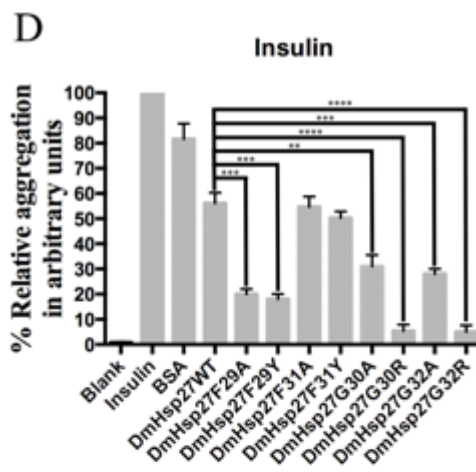
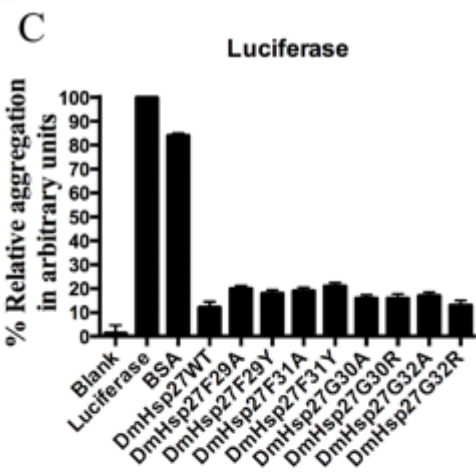
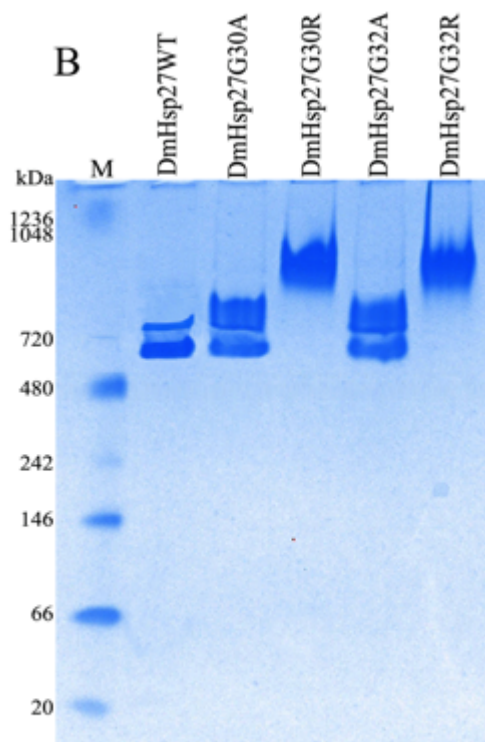
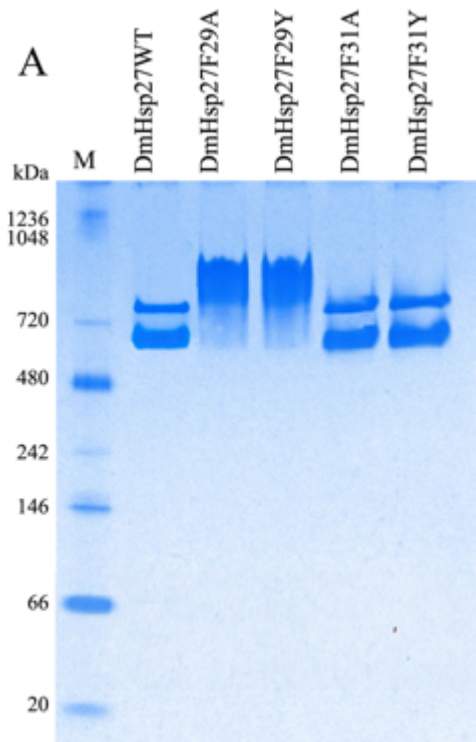


Figure 4.4: Effects of FGFG residues in oligomerization and chaperon-like activity.

A and B- Native gradient (4-12%) polyacrylamide gel electrophoresis of recombinant DmHsp27 and NTR mutants (F29A; F29Y, F31A, F31Y, G30A, G30R, G32A and G32R) at 20°C. Positions of standard protein markers are shown on the left.

C, D, E and F- Preventing aggregation of luciferase, insulin, citrate synthase and L-malate dehydrogenase using NTR mutants (F29A; F29Y, F31A, F31Y, G30A, G30R, G32A and G32R). Data are representatives of three independent experiments. ** indicates $P < 0.01$; *** indicates $P < 0.001$, **** indicates $P < 0.0001$.

The size estimation by native gel electrophoresis was confirmed using SEC for DmHsp27, F29A, F29Y, G30R and G32R mutants. As seen in figure 5, the profile of DmHsp27F29A on Superose 6 gave two peaks (Fig 4.5A). The first one eluted at 13 ml and corresponded to a molecular mass of 800 kDa while the second one eluted at 14.6 ml and had a molecular mass of 540 kDa. For this mutant we noted that the peak #1 corresponding to 800 kDa was more abundant than the peak #2 of 540 kDa. For DmHsp27F29Y the profile on Superose 6 shows one peak eluted at 13 ml (800 kDa) and a shoulder after the main peak at 14 ml (Fig 4.5B). While the R30G and R32G mutants show a single peak at 11ml corresponding to 1100 kDa (Fig 4.5C and D).

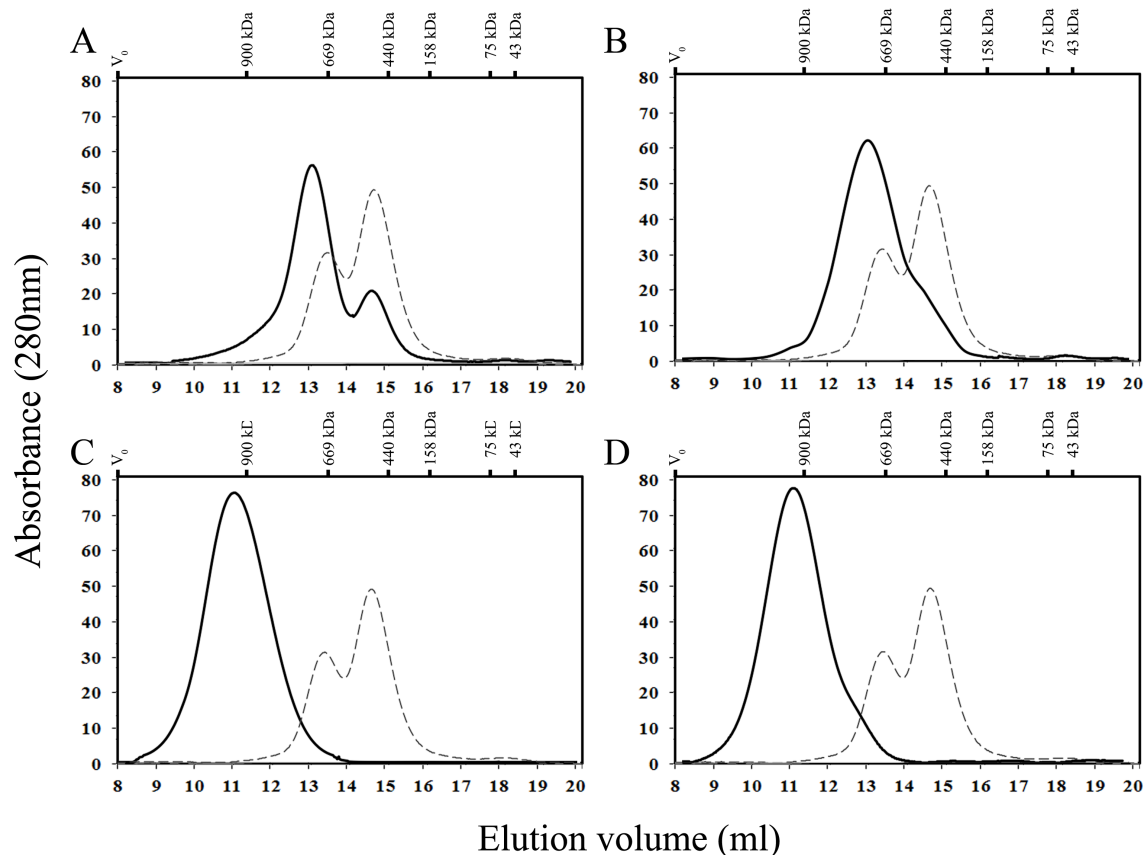


Figure 4.5: Size exclusion chromatography analysis of DmHsp27 N-terminal mutants F29A, F29Y, G30R and G32R.

Size exclusion chromatography (SEC) analysis using a superose 6 10/300 GL (GE Life Sciences) column, with IGM (900 kDa), thyroglobulin (669 kDa), ferritin (440 kDa), aldolase (158 kDa), conalbumin (75 kDa) and ovalbumin (43 kDa) Blue dextran (2000 kDa) was used to determine the void volume of the column V_0 . A- Profile on column of 300 μ g (black line) of DmHsp27F29A compared to 300 μ g (dashed line) of DmHsp27. B- Profile on column of 300 μ g (black line) of DmHsp27F29Y compared to 300 μ g (dashed line) of DmHsp27. C- Profile on column of 300 μ g (black line) of DmHsp27G30R compared to 300 μ g (dashed line) of DmHsp27. D- Profile on column of 300 μ g (black line) of DmHsp27G32R compared to 300 μ g (dashed line) of DmHsp27.

4.2.4 Heat activation of DmHsp27

As reported previously DmHsp27WT can prevent Luc, CS, and MDH heat-induced aggregation more efficiently than insulin DTT induced aggregation (Moutaoufik et al., 2016) and Fig 4.4. In the same way all NTR mutants could efficiently prevent heat-induced aggregation of Luc, CS and, MDH (Fig 4.4C, E and F). No significant differences were shown in chaperone-like activity of DmHsp27 wild type and N-terminal mutants (F29A, F29Y, F31A, F31Y, G30A, G30R, G32A and G32R) in the heat-induced aggregation of Luc at 42 °C, CS and MDH at 45 °C. However, some differences in preventing aggregation using reduction of disulfide bond-induced aggregation of insulin at 20 °C were observed. DmHsp27WT, F31A and F31Y mutants were less efficient. While, mutants G30R and G32R were the most efficient followed by F29A, F29Y, G30A and G32A (Fig 4.4D).

It is possible that DmHsp27 binds more easily to Luc, CS and MDH than to the insulin substrate resulting in a stronger aggregation protection. Alternatively, heat activation of DmHsp27 could lead to a better protection. To test these hypotheses, we performed the insulin chaperone assay at 42 °C. DmHsp27 and all mutants showed a high capacity to reduce insulin aggregation at 42 °C compared to 20 °C (Fig 4.6A). At 20 °C DmHsp27WT prevented reduction-induced aggregation of insulin with 44 % efficiency compared to 77.4 % efficiency at 42 °C. Mutants G30A and G32A show slight improvement at 42 °C with (89.3 and 90.7 % efficiency respectively) compared to 68.2 and 72.3 % efficiency at 20 °C (Fig 4.6A). No significant difference shown for F29Y, G30R and G32R mutants. We therefore compared the oligomeric structure of DmHsp27WT and NTR mutants on a native gel at 42 °C. The results showed that at 42 °C DmHsp27WT and NTR mutants formed oligomers of higher molecular weight than those observed at 20 °C (Fig 4.6B and C). Unlike mammalian sHsps, DmHsp27 heat activation led to formation higher sized oligomers efficient to suppress aggregation of substrates.

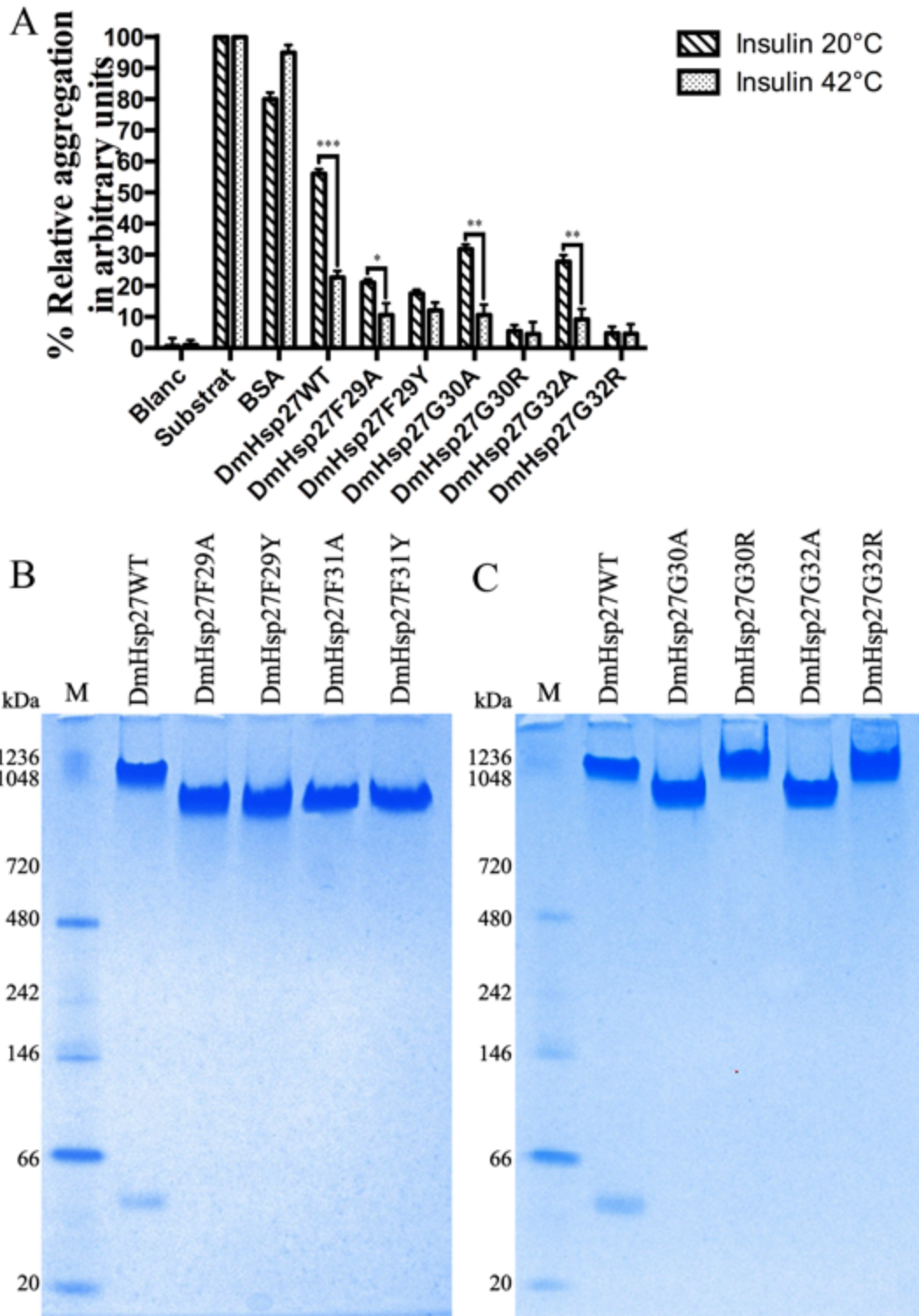


Figure 4.6: Study of heat activation of DmHsp27 and its FGFG mutants.

A- Prevention of aggregation of insulin using DmHsp27WT and NTR mutants at 42 °C compared to 20 °C. Data are representative of three independent experiments, error bars resultant the standard error of the mean.

B and C- Native gradient (4-12%) polyacrylamide gel electrophoresis of recombinant DmHsp27 and NTR mutants at 42°C. Positions of standard protein markers with known molecular weights are shown on the left. * indicates $P < 0.05$, ** indicates $P < 0.01$; *** indicates $P < 0.001$.

The formation of large oligomers induced by elevated temperature are partially reversible as indicated by native gels (Supplementary Fig 4.7). Interestingly, DmHsp27WT and N-terminal mutants decrease oligomeric size after recovery 30 min and 2 hours at 20°C. It should be pointed out that for DmHsp27WT, mutants F31A, F31Y, G30A and G32A two populations of oligomers appears clearly at 2 hours recovery (Supplementary Fig 4.7).

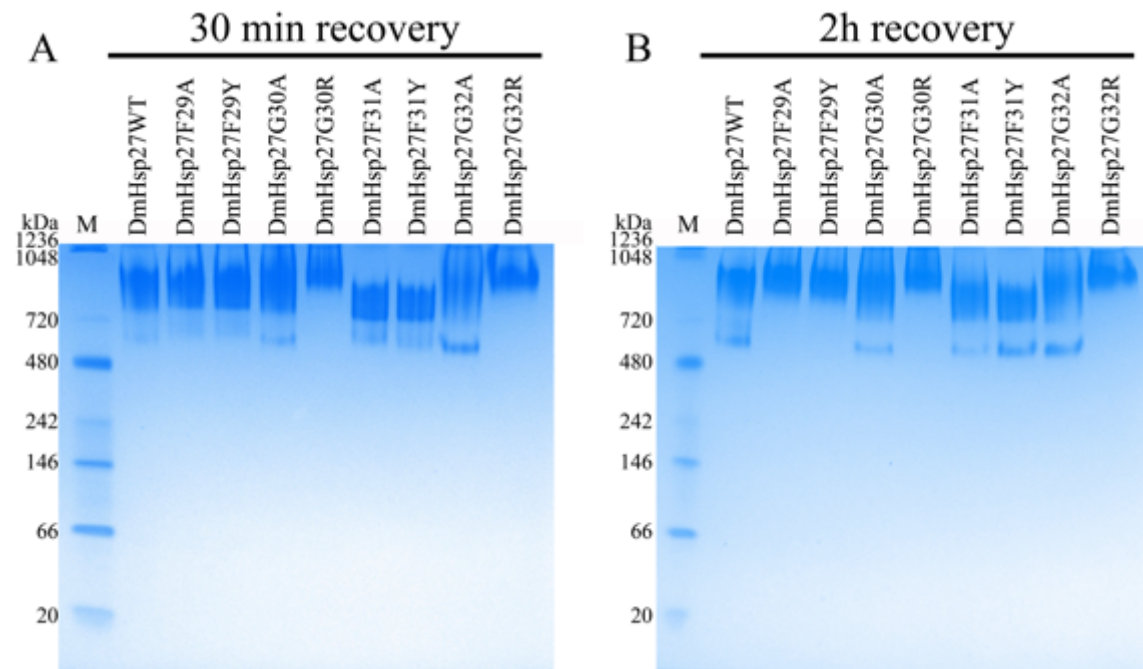


Figure 4.7: Supplementary figure.

Native gradient (4-12%) polyacrylamide gel electrophoresis of recombinant DmHsp27 and NTR mutants heated at 42°C for 1h and cooled back at 20°C for 30 min (A) or 2h

(B). Positions of standard protein markers with known molecular weights are shown on the left.

4.3 Discussion

In the present work we characterized the role of a conserved motif in the NTR of DmHsp27 on its oligomeric structure and chaperone-like activity. This region is poorly conserved among sHsps and is involved in chaperoning and oligomerization.

Phosphorylation of serine residues in the NTR has been reported to regulate the chaperone activity of mammalian sHsps as recently reviewed (Haslbeck and Vierling, 2015, Haslbeck et al., 2015, Haslbeck et al., 2016). A phospho-mimicking mutant of HspB1 has been found to shift the equilibrium between oligomers and dimers in favor of the smaller assemblies (Shashidharamurthy et al., 2005). Similarly, studies using phosphorylation mimicking variants of HspB5 reveal an oligomer ensemble mainly consisting of 12-mers, hexamers and dimers (Peschek et al., 2013). The predominance of these smaller species indicates that the N-terminal contacts in the oligomer are influenced by phosphorylation (Haslbeck and Vierling, 2015). While phosphorylation of HspB5 results in an increase in chaperone activity (Peschek et al., 2013), the situation for HspB1 depends on the model substrate used (Shashidharamurthy et al., 2005, Hayes et al., 2009, Rogalla et al., 1999, Theriault et al., 2004).

As mammalian sHsps, DmHsp27 can be phosphorylated by unknown kinase(s) on at least 2 serines in NTR (S58 and S75) (Bodenmiller et al., 2007, Zhai et al., 2008, Morrow and Tanguay, 2015). Here we show that DmHsp27WT, and its serine 58 and 75 phosphomimetic and nonphosphorylatable mutants have the same oligomeric structure, chaperone-like activity and cellular localization. Thus unlike vertebrate/mammalian sHsps, phosphorylation of S58 and S75 in the NTR does not affect the oligomerization equilibrium nor the nuclear localization of DmHsp27.

Using molecular dynamics simulations Patel et al. (Patel et al., 2014) showed that the NTR of a sHsp dimer is flexible/dynamic and presents two major conformational forms designated “open” or “closed” suggesting that the NTR of the dimer behaves as a structural domain. Complete deletion of DmHsp27 N-terminal region leads to disruption of oligomerization and loss of chaperone function. Studies by incorporation of hydrophobic dyes, cross-linking experiments and analyses by mass spectrometry suggested that substrates bind to segments in the NTR (Lee et al., 1997, Sharma et al.,

1998, Ghosh et al., 2007a, Cheng et al., 2008). Decreased of chaperone activity for DmHsp27_Del_N_Term is not linked to dissociation of oligomeric assembly but to binding role of NTR. As shown for many sHps removal of N-terminal in many sHps leads to loss of chaperone function (Baranova et al., 2011, Feil et al., 2001, Kundu et al., 2007, Laganowsky et al., 2010, Leroux et al., 1997, Heirbaut et al., 2014, Crack et al., 2002, Sun et al., 2004), suggests a conserved role of N-terminal in oligomerization and chaperone-like activity.

Although, NTR has been described as poorly conserved, we delineate a conserved motif phenylalanine 29 to glycine 32 (FGFG) in orthologues of DmHsp27. This motif is equivalent to the described “the phenylalanine-rich region” in vertebrate sHps (Crabbe and Goode, 1994). A larger deletion that also eliminated this motif in human HspB4 and HspB5 resulted in a decrease of oligomeric size and an increase of chaperone-like activity (Pasta et al., 2003). In the case of DmHsp27 deletion of the conserved motif from phenylalanine 29 to glycine 32 (FGFG) affected the oligomeric state differently, with the formation of large oligomers, but resulted in enhancement of chaperone-like activity in non-thermal conditions using insulin. This suggests that there is at least one important residue that modulates oligomerization and chaperone-like activity in this region. We found that the less conserved residue F31 had no effect on quaternary structure nor the chaperone-like activity of DmHsp27. F29 seems important for formation of the smaller 540 kDa species seen by gel filtration (Moutaoufik et al., 2016), whereby mutation of this residue to either an alanine or tyrosine resulted in predominantly larger oligomers with molecular weights close to the 800 kDa species. G30R and G32R destabilized the balance to form a single peak corresponding to a higher oligomer with the highest chaperone-like activity in non-thermal conditions using the insulin assay.

Previous studies on the structure of Hsp16.9 from wheat (van Montfort et al., 2001b) and Hsp16.0 from yeast (Hanazono et al., 2013) highlighted the important role of phenylalanines in the N-terminal region in oligomer formation and chaperone-like activity. Other studies using bovine or murine alphaB-crystallin, showed that mutation of F24, F27 or F28 decrease the oligomeric size and chaperone-like activity at elevated temperatures (Kelley and Abraham, 2003, Horwitz et al., 1998, Plater et al., 1996). Recently, Heirbaut et al (Heirbaut et al., 2014) showed that mutants of the conserved

phenylalanine at position 33 to alanine in NTR of HspB6 was less active in insulin and yeast alcohol dehydrogenase aggregation assays and this residue was linked to the self-association properties of HspB6. F28 in bovine α B-crystallin and F33 in human HspB6, which are equivalent to F29 in DmHsp27 showed different behavior compared to F29 of DmHsp27. Interestingly mutation of glycine at position 34 to arginine in the NTR of HspB1 (equivalent to glycine at position 30 in DmHsp27) has been associated to distal hereditary motor neuropathies (Capponi et al., 2011). A study by Muranova et al (Muranova et al., 2015) showed that mutant HspB1-G34R forms stable oligomers slightly larger than the corresponding oligomers of the HspB1WT and decreased chaperone-like activity.

There is significant controversy concerning the mode of activation of sHsps. sHsps reveal temperature-dependent chaperone activity in preventing aggregation of substrate proteins (Raman et al., 1995, Datta and Rao, 1999). Most chaperone activity models suggests that sHsps dissociate to small oligomeric forms, presumably dimers, which re-associate to a new oligomeric form containing the bound substrate (Haslbeck and Vierling, 2015, Basha et al., 2012, Delbecq and Klevit, 2013, Garrido et al., 2012, McHaourab et al., 2009). However, some sHsps are activated differently. For example, the transition of Hsp26 from *Saccharomyces cerevisiae*, in which the transition into a state of increased substrate binding affinity and chaperone activity occurs through slight conformational changes without perturbation of the oligomeric state (Franzmann et al., 2008). Another example is plant class II sHsps, that remain oligomeric but undergo structural rearrangements (Basha et al., 2010). HspB1 exhibits heat-induced self-association, leading to increased oligomeric size, which correlates with increase in its chaperone-like activity (Lelj-Garolla and Mauk, 2006). Hsp22 (HspB8) from rat reveals heat-induced conformational changes with increased exposure of hydrophobic surfaces and chaperone-like activity (Chowdary et al., 2004). *C. elegans* Hsp17 forms large sheet-like super-molecular assemblies (SMA) at high temperatures and only the SMA form exhibits chaperone-like activity in suppressing the aggregation of non-native substrate proteins (Zhang et al., 2015). It is clear that not all sHsps are activated by the same mechanism. In the case of DmHsp27, we observed a partial reversible heat-activation by induced structural changes that result in formation of higher oligomers of approximately

1100 kDa. DmHsp27WT is more effective as a chaperone at 42 °C than 20 °C using insulin. This suggests that heat enhances DmHsp27 chaperone-like activity by formation of larger oligomers.

How heat induces oligomerization of DmHsp27 is still an open question. In general, temperature-dependent conformational change in sHsps increases exposure of hydrophobic surfaces leading to increase in the chaperone-like activity by interaction with partially unfolded proteins through hydrophobic surfaces and prevents their aggregation. Two studies with alpha-crystallin from bovine lens support this proposition. First Das et al (Das and Surewicz, 1995) showed exposure of hydrophobic surfaces at high temperature. Second, Smith et al (Smith et al., 1996) showed that hydrophobic regions around the residues 32-37 and 72-75 of α A- and 28-34 of α B-crystallin were exposed above 30 °C.

In summary, this study characterized DmHsp27 mutant in the N-terminal region and we suggest a new protection mechanism played by DmHsp27 as molecular chaperone.

4.4 Material and methods

4.4.1 Cloning, expression and purification of recombinant DmHsp27.

The cDNA of wild type DmHsp27 (DmHsp27WT) was cloned using GIBSON ASSEMBLY (NEB) into bacterial expression vector pETHSUK (a gift from Dr. S.Weeks, (Weeks et al., 2007)) and mammalian expression vector pcDNA3.1(+) at KpnI and XhoI sites by PCR as described in (Moutaoufik et al., 2016). Mutations were introduced by using suitable oligomers (Table 1) and site-directed mutagenesis were done using Gibson assembly (NEB) and confirmed by DNA sequencing.

Primer	Primer sequences
pETHSUK DmHsp27Fwd	5'-AGATTGGTGGTACCATGTCAATTATACCACTGC-3'
pETHSUK DmHsp27Rev	5'-AGCAGAAGCTTCTTACTTGCTAGTCTCCATTTTC-3'
pcDNA DmHsp27Fwd	5'-AAACTTAAGCTTGGTACATGTCAATTATACCACTGC-3'
pcDNA DmHsp27Rev	5'-CGGGCCCTCTAGACTTACTTGCTAGTCTCCATTTTC-3'
pETHSUK DmHsp27Del-NTRFwd	5'-GAACAGATTGGTGGTACAATGAAAGATGGCTTCCAG-3'
DmHsp27Del29-32Fwd	5'-GGAGGATGACGTCCATGCCACGATCTGTTCC-3'
DmHsp27Del29-32Rev	5'-GGGCATGGACGTCATCCTCCAGCAAATGCCCCC-3'
DmHsp27F29AFwd	5'-GAGGATGACGCCGGTTTTGGCGTCCATGCCTAT-3'
DmHsp27F29ARev	5'-GACGCCAAAAGCGGTCATCCTCCAGC-3'
DmHsp27F29YFwd	5'-GAGGATGACTACGGTTTTGGCGTCCATGCCTAT-3'
DmHsp27F29YRev	5'-GACGCCAAAAGCGTAGTCATCCTCCAGC-3'
DmHsp27G30AFwd	5'-GAGGATGACTTCGCTTTTGGCGTCCATGCC-3'
DmHsp27G30ARev	5'- GAC GCC AAA AGC GAA GTC ATC CTC CAG C -3'
DmHsp27G30RFwd	5'- GAG GAT GAC TTC CGT TTT GGC GTC CAT GCC -3'
DmHsp27G30RRev	5'- GAC GCC AAA ACG GAA GTC ATC CTC CAG C -3'
DmHsp27F31AFwd	5'-GAGGATGACTTCGGTGTGGCGTCCATGCC-3'
DmHsp27F31ARev	5'-GACGCCAGCACCGAAGTCATCCTCCAGC-3'
DmHsp27F31YFwd	5'-GAGGATGACTTCGGTTATGGCGTCCATGCC-3'
DmHsp27F31YRev	5'-GACGCCATAACCGAAGTCATCCTCCAGC-3'
DmHsp27G32AFwd	5'-GACTTCGGTTTTGCGTCCATGCCACG-3'
DmHsp27G32ARev	5'-GGCATGGACGGCAAAACCGAAGTCATCC-3'
DmHsp27G32Rwd	5'-GACTTCGGTTTTGCGTCCATGCCACG-3'
DmHsp27G32Rev	5'-GGCATGGACGGCAAAACCGAAGTCATCC-3'
DmHsp27S58AFwd	5'-CGTCGTCGCTATGCGCCGTACGAGAGG-3'
DmHsp27S58ARev	5'-CCTCTCGTACGGCGCATAGCGACGCGACC-3'
DmHsp27S58DFwd	5'-CGTCGTCGCTATGACCCGTACGAGAGG-3'

DmHsp27S58DFwd	5'-CCTCTCGTACGGGTCATAGCGACGCGACC-3'
DmHsp27S75AFwd	5'-CACGTCGCGCGGGAGGTCCAAACG3-'
DmHsp27S75ARev	5'-CGTTTGGACCTCCCGCCGCGACGTG-3'
DmHsp27S75DFwd	5'-CACGTCGCGCGGACGGAGGTCCAAACG3-'
DmHsp27S75DRev	5'-CGTTTGGACCTCCGTCCGCGACGTG-3'

Tableau 4-1: Primers sequences used to construct DmHsp27 NTR mutants.

Following the detailed protocol in (Moutaoufik et al., 2016) pETHSUK DmHsp27WT and its N-terminal mutants were expressed in Escherichia coli BL21 (DE3) pLysS strain (NEB). The protein expression was induced with isopropyl- β -thiogalactoside (IPTG) (Roche).

The protein purification was accomplished by affinity chromatography using Ni-NTA agarose (Qiagen) column. His-Sumo-tag was digested with Sumo-Hydrolase followed by size exclusion chromatography (SEC) on Superose 6 10/300 column (GE Lifesciences) as described earlier (Moutaoufik et al., 2016). All mutants gave a good yield of pure protein (25 mg/l) and could

4.4.2 Analysis of the quaternary structure by size exclusion chromatography.

SEC was used to analyze the quaternary structure of DmHsp27. 300 μ g of proteins were loaded on Superose 6 10/300 column (GE Lifesciences) equilibrated with 20 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl. SEC was achieved at room temperature and eluted at 0.5 ml/min. For estimating the molecular weight, the column was calibrated with protein markers immunoglobulin M (IGM) from bovine serum (900 kDa) (Sigma), (thyroglobulin (669 kDa), Ferritin (440 kDa), Aldolase (158 kDa), Conalbumin (75 kDa), Ovalbumin (43 kDa) and Blue Dextran 2000 to determine the void volume) (GE Lifesciences) as detailed in (Moutaoufik et al., 2016).

4.3.3 Analysis of the quaternary structure by native gel electrophoresis.

For native gel electrophoresis samples were kept at room temperature (20 °C) or heated at 42 °C using a water bath during 10 min and loaded on a gel 4-12% gradient native Tris-Glycine gels (Thermo Fisher Scientific). Gels were run at 150 V at room temperature (20 °C) or at 42 °C (on a water bath) using pre-cast Mini-Cell electrophoresis system (XCell SureLock, Life Technology). The protein complexes were stained with Coomassie blue immediately after electrophoresis.

4.4.4 Chaperone-like activity.

Luciferase, citrate synthase, L-malate dehydrogenase and insulin were used as substrates to evaluate the chaperone-like activity as described in Morrow et al 2006 (Morrow et al., 2006) and Moutaoufik et al. 2016 (Moutaoufik et al., 2016).

The heat-induced aggregation assay was performed using : luciferase (0.1 µM, Promega) at 42 °C, citrate synthase (0.16 µM; Sigma) and L-malate dehydrogenase (0.65 µM; Roche) at 45 °C in the absence or presence of DmHsp27 or its mutants. Although, insulin (52 µM, Sigma) non-Heat-induced aggregation was induced by disulfide bonds reduction at 20 °C. All substrats were pre-incubated alone or in the presence of DmHsp27 or its mutants and aggregation was followed by an increase in the optical density at 320 nm on a spectrophotometer with thermostated cells.

4.4.5 Cell culture, transfection conditions and immunofluorescence analyses.

Hela cells were maintained in MEM Alpha (Gibco) supplemented with 5% FBS. Cells were plated in advance at a confluence of 175 000 cells/well (6 well plate) containing glass coverslip for transfection. Later, cells were incubated for 4 h in OptiMEM (Gibco) containing the plasmid pcDNA3.1(+)-DmHsp27: Lipofectamine (Invitrogen) complex (1.5 µl Lipofectamine/1.5 µg DNA), cells were washed with culture medium and incubated for 48 h to express DmHsp27 before immunofluorescence.

Immunofluorescence was performed as described in (Moutaoufik et al., 2016, Moutaoufik et al., 2014). Briefly, cells were washed with PBS and fixed in methanol at -20 C for 20 min. Cells were blocked in PBS 0.1% Tween20-X (PBST) containing 5% BSA (PBST-BSA) and were incubated one hour at room temperature with primary antibody (monoclonal anti-DmHsp27 (2C8E11) (Michaud et al., 2008, Moutaoufik et al., 2016)) diluted (1/20) in PBST-BSA. After they, were washed with PBST and were incubated 45 min with secondary antibody (goat anti-mouse Alexa 488 (Invitrogen)). Finally, cells were mounted in Vectashield mounting medium (Vector Laboratories) and examined using fluorescence microscopy (Axio Observer Z1).

Acknowledgements

This work was funded by a grant from NSERC to RMT and a FQRNT exchange studentship to RMT and SF. MTM held a studentship from PROTEO, Québec. We would like to thank Jérémie Hamel for help with SEC, Halim Maaroufi (IBIS Quebec) and Stephen Weeks (KV Leuven) for valuable discussion.

Contributions

Conceptualization: MTM GM RMT.

Data curation: MTM RMT.

Formal analysis: MTM GM RMT.

Funding acquisition: SF RMT.

Investigation: MTM GM.

Methodology: MTM GM RMT.

Project administration: GM.

Resources: SF RMT.

Software: RMT.

Supervision: RMT.

Validation: MTM GM.

Visualization: MTM GM RMT.

Writing – original draft: MTM RMT.

Writing – review & editing: MTM GM SF RMT.

Competing interests

The authors declare no competing financial interests.

References

- ARRIGO, A. P. 2013. Human small heat shock proteins: protein interactomes of homo- and hetero-oligomeric complexes: an update. *FEBS Lett*, 587, 1959-69.
- BARANOVA, E. V., WEEKS, S. D., BEELEN, S., BUKACH, O. V., GUSEV, N. B. & STRELKOV, S. V. 2011. Three-dimensional structure of alpha-crystallin domain dimers of human small heat shock proteins HSPB1 and HSPB6. *J Mol Biol*, 411, 110-22.
- BASHA, E., FRIEDRICH, K. L. & VIERLING, E. 2006. The N-terminal arm of small heat shock proteins is important for both chaperone activity and substrate specificity. *J Biol Chem*, 281, 39943-52.
- BASHA, E., JONES, C., WYSOCKI, V. & VIERLING, E. 2010. Mechanistic differences between two conserved classes of small heat shock proteins found in the plant cytosol. *J Biol Chem*, 285, 11489-97.
- BASHA, E., O'NEILL, H. & VIERLING, E. 2012. Small heat shock proteins and alpha-crystallins: dynamic proteins with flexible functions. *Trends Biochem Sci*, 37, 106-17.
- BEAULIEU, J. F., ARRIGO, A. P. & TANGUAY, R. M. 1989a. Interaction of *Drosophila* 27,000 Mr heat-shock protein with the nucleus of heat-shocked and ecdysone-stimulated culture cells. *J Cell Sci*, 92 (Pt 1), 29-36.
- BEAULIEU, J. F., ARRIGO, A. P. & TANGUAY, R. M. 1989b. Interaction of *Drosophila* 27000 Mr Heat-Shock Protein with the Nucleus of Heat-Shocked and Ecdysone-Stimulated Culture Cells. *Journal of Cell Science*, 92, 29-36.
- BENESCH, J. L., AQUILINA, J. A., BALDWIN, A. J., REKAS, A., STENGEL, F., LINDNER, R. A., BASHA, E., DEVLIN, G. L., HORWITZ, J., VIERLING, E., CARVER, J. A. & ROBINSON, C. V. 2010. The quaternary organization and dynamics of the molecular chaperone HSP26 are thermally regulated. *Chem Biol*, 17, 1008-17.
- BEPERLING, A., ALTE, F., KRIEHLER, T., BRAUN, N., WEINKAUF, S., GROLL, M., HASLBECK, M. & BUCHNER, J. 2012. Alternative bacterial two-component small heat shock protein systems. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 20407-12.
- BODENMILLER, B., MUELLER, L. N., PEDRIOLI, P. G., PFLIEGER, D., JUNGER, M. A., ENG, J. K., AEBERSOLD, R. & TAO, W. A. 2007. An integrated chemical, mass spectrometric and computational strategy for (quantitative) phosphoproteomics: application to *Drosophila melanogaster* Kc167 cells. *Mol Biosyst*, 3, 275-86.
- BOURRELLE-LANGLOIS, M., MORROW, G., FINET, S. & TANGUAY, R. M. 2016. In Vitro Structural and Functional Characterization of the Small Heat Shock Proteins (sHSP) of the Cyanophage S-ShM2 and Its Host, *Synechococcus* sp. WH7803. *PLoS One*, 11, e0162233.
- BRAUN, N., ZACHARIAS, M., PESCHEK, J., KASTENMULLER, A., ZOU, J., HANZLIK, M., HASLBECK, M., RAPPSILBER, J., BUCHNER, J. & WEINKAUF, S. 2011. Multiple molecular architectures of the eye lens chaperone alphaB-crystallin elucidated by a triple hybrid approach. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 20491-6.

- CAPPONI, S., GEROLDI, A., FOSSA, P., GRANDIS, M., CIOTTI, P., GULLI, R., SCHENONE, A., MANDICH, P. & BELLONE, E. 2011. HSPB1 and HSPB8 in inherited neuropathies: study of an Italian cohort of dHMN and CMT2 patients. *J Peripher Nerv Syst*, 16, 287-94.
- CASPERS, G. J., LEUNISSEN, J. A. & DE JONG, W. W. 1995. The expanding small heat-shock protein family, and structure predictions of the conserved "alpha-crystallin domain". *J Mol Evol*, 40, 238-48.
- CHENG, G., BASHA, E., WYSOCKI, V. H. & VIERLING, E. 2008. Insights into small heat shock protein and substrate structure during chaperone action derived from hydrogen/deuterium exchange and mass spectrometry. *J Biol Chem*, 283, 26634-42.
- CHOWDARY, T. K., RAMAN, B., RAMAKRISHNA, T. & RAO, C. M. 2004. Mammalian Hsp22 is a heat-inducible small heat-shock protein with chaperone-like activity. *Biochem J*, 381, 379-87.
- CRABBE, M. J. & GOODE, D. 1994. alpha-Crystallin: chaperoning and aggregation. *Biochem J*, 297 (Pt 3), 653-4.
- CRACK, J. A., MANSOUR, M., SUN, Y. & MACRAE, T. H. 2002. Functional analysis of a small heat shock/alpha-crystallin protein from *Artemia franciscana*. Oligomerization and thermotolerance. *Eur J Biochem*, 269, 933-42.
- DAS, K. P. & SUREWICZ, W. K. 1995. Temperature-induced exposure of hydrophobic surfaces and its effect on the chaperone activity of alpha-crystallin. *FEBS Lett*, 369, 321-5.
- DATTA, S. A. & RAO, C. M. 1999. Differential temperature-dependent chaperone-like activity of alphaA- and alphaB-crystallin homoaggregates. *J Biol Chem*, 274, 34773-8.
- DE JONG, W. W., CASPERS, G. J. & LEUNISSEN, J. A. 1998. Genealogy of the alpha-crystallin--small heat-shock protein superfamily. *Int J Biol Macromol*, 22, 151-62.
- DELBECQ, S. P. & KLEVIT, R. E. 2013. One size does not fit all: the oligomeric states of alphaB crystallin. *FEBS Lett*, 587, 1073-80.
- DEN ENGELSMAN, J., VAN DE SCHOOTBRUGGE, C., YONG, J., PRUIJN, G. J. & BOELEN, W. C. 2013. Pseudophosphorylated alphaB-Crystallin Is a Nuclear Chaperone Imported into the Nucleus with Help of the SMN Complex. *PLoS One*, 8, e73489.
- EDGAR, R. C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res*, 32, 1792-7.
- EHRNSPERGER, M., GRABER, S., GAESTEL, M. & BUCHNER, J. 1997. Binding of non-native protein to Hsp25 during heat shock creates a reservoir of folding intermediates for reactivation. *EMBO J*, 16, 221-9.
- FEIL, I. K., MALFOIS, M., HENDLE, J., VAN DER ZANDT, H. & SVERGUN, D. I. 2001. A novel quaternary structure of the dimeric alpha-crystallin domain with chaperone-like activity. *J Biol Chem*, 276, 12024-9.
- FICARRO, S. B., MCCLELAND, M. L., STUKENBERG, P. T., BURKE, D. J., ROSS, M. M., SHABANOWITZ, J., HUNT, D. F. & WHITE, F. M. 2002. Phosphoproteome analysis by mass spectrometry and its application to *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Biotechnol*, 20, 301-5.

- FRANZMANN, T. M., MENHORN, P., WALTER, S. & BUCHNER, J. 2008. Activation of the chaperone Hsp26 is controlled by the rearrangement of its thermosensor domain. *Mol Cell*, 29, 207-16.
- FU, X., JIAO, W. & CHANG, Z. 2006. Phylogenetic and biochemical studies reveal a potential evolutionary origin of small heat shock proteins of animals from bacterial class A. *J Mol Evol*, 62, 257-66.
- GARRIDO, C., PAUL, C., SEIGNEURIC, R. & KAMPINGA, H. H. 2012. The small heat shock proteins family: the long forgotten chaperones. *Int J Biochem Cell Biol*, 44, 1588-92.
- GHOSH, J. G., HOUCK, S. A. & CLARK, J. I. 2007. Interactive domains in the molecular chaperone human alphaB crystallin modulate microtubule assembly and disassembly. *PLoS One*, 2, e498.
- HANAZONO, Y., TAKEDA, K., OKA, T., ABE, T., TOMONARI, T., AKIYAMA, N., AIKAWA, Y., YOHDA, M. & MIKI, K. 2013. Nonequivalence observed for the 16-meric structure of a small heat shock protein, SpHsp16.0, from *Schizosaccharomyces pombe*. *Structure*, 21, 220-8.
- HASLBECK, M., PESCHEK, J., BUCHNER, J. & WEINKAUF, S. 2016. Structure and function of alpha-crystallins: Traversing from in vitro to in vivo. *Biochim Biophys Acta*, 1860, 149-66.
- HASLBECK, M. & VIERLING, E. 2015. A first line of stress defense: small heat shock proteins and their function in protein homeostasis. *J Mol Biol*, 427, 1537-48.
- HASLBECK, M., WEINKAUF, S. & BUCHNER, J. 2015. Regulation of the Chaperone Function of Small Hsps. In: TANGUAY, R. M. & HIGHTOWER, L. E. (eds.) *The Big Book on Small Heat Shock Proteins*. Springer International Publishing.
- HAYES, D., NAPOLI, V., MAZURKIE, A., STAFFORD, W. F. & GRACEFFA, P. 2009. Phosphorylation dependence of hsp27 multimeric size and molecular chaperone function. *J Biol Chem*, 284, 18801-7.
- HEIRBAUT, M., BEELEN, S., STRELKOV, S. V. & WEEKS, S. D. 2014. Dissecting the functional role of the N-terminal domain of the human small heat shock protein HSPB6. *PLoS One*, 9, e105892.
- HEIRBAUT, M., STRELKOV, S. V. & WEEKS, S. D. 2015. Everything but the ACD, Functional Conservation of the Non-conserved Terminal Regions in sHSPs. In: TANGUAY, M. R. & HIGHTOWER, E. L. (eds.) *The Big Book on Small Heat Shock Proteins*. Cham: Springer International Publishing.
- HORWITZ, J., BOVA, M., HUANG, Q. L., DING, L., YARON, O. & LOWMAN, S. 1998. Mutation of alpha B-crystallin: effects on chaperone-like activity. *Int J Biol Macromol*, 22, 263-9.
- ITO, H., KAMEI, K., IWAMOTO, I., INAGUMA, Y., NOHARA, D. & KATO, K. 2001. Phosphorylation-induced change of the oligomerization state of alpha B-crystallin. *J Biol Chem*, 276, 5346-52.
- JEHLE, S., VOLLMAR, B. S., BARDIAUX, B., DOVE, K. K., RAJAGOPAL, P., GONEN, T., OSCHKINAT, H. & KLEVIT, R. E. 2011. N-terminal domain of alphaB-crystallin provides a conformational switch for multimerization and structural heterogeneity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 6409-14.

- KAPPE, G., BOELENS, W. C. & DE JONG, W. W. 2010. Why proteins without an alpha-crystallin domain should not be included in the human small heat shock protein family HSPB. *Cell Stress Chaperones*, 15, 457-61.
- KATO, K., HASEGAWA, K., GOTO, S. & INAGUMA, Y. 1994. Dissociation as a result of phosphorylation of an aggregated form of the small stress protein, hsp27. *J Biol Chem*, 269, 11274-8.
- KELLEY, P. B. & ABRAHAM, E. C. 2003. Thermally induced disintegration of the oligomeric structure of alphaB-crystallin mutant F28S is associated with diminished chaperone activity. *Mol Cell Biochem*, 252, 273-8.
- KIM, K. K., KIM, R. & KIM, S. H. 1998. Crystal structure of a small heat-shock protein. *Nature*, 394, 595-9.
- KUNDU, M., SEN, P. C. & DAS, K. P. 2007. Structure, stability, and chaperone function of alphaA-crystallin: role of N-terminal region. *Biopolymers*, 86, 177-92.
- LAGANOWSKY, A., BENESCH, J. L., LANDAU, M., DING, L., SAWAYA, M. R., CASCIO, D., HUANG, Q., ROBINSON, C. V., HORWITZ, J. & EISENBERG, D. 2010. Crystal structures of truncated alphaA and alphaB crystallins reveal structural mechanisms of polydispersity important for eye lens function. *Protein Sci*, 19, 1031-43.
- LEE, G. J., ROSEMAN, A. M., SAIBIL, H. R. & VIERLING, E. 1997. A small heat shock protein stably binds heat-denatured model substrates and can maintain a substrate in a folding-competent state. *EMBO J*, 16, 659-71.
- LELJ-GAROLLA, B. & MAUK, A. G. 2006. Self-association and chaperone activity of Hsp27 are thermally activated. *J Biol Chem*, 281, 8169-74.
- LEROUX, M. R., MELKI, R., GORDON, B., BATELIER, G. & CANDIDO, E. P. 1997. Structure-function studies on small heat shock protein oligomeric assembly and interaction with unfolded polypeptides. *J Biol Chem*, 272, 24646-56.
- LUND, A. A., RHOADS, D. M., LUND, A. L., CERNY, R. L. & ELTHON, T. E. 2001. In vivo modifications of the maize mitochondrial small heat stress protein, HSP22. *J Biol Chem*, 276, 29924-9.
- MAAROUFI, H. & TANGUAY, R. M. 2013. Analysis and phylogeny of small heat shock proteins from marine viruses and their cyanobacteria host. *PLoS One*, 8, e81207.
- MARIN, R., LANDRY, J. & TANGUAY, R. M. 1996. Tissue-specific posttranslational modification of the small heat shock protein HSP27 in *Drosophila*. *Exp Cell Res*, 223, 1-8.
- MCHAOURAB, H. S., GODAR, J. A. & STEWART, P. L. 2009. Structure and mechanism of protein stability sensors: chaperone activity of small heat shock proteins. *Biochemistry*, 48, 3828-37.
- MCHAOURAB, H. S., LIN, Y. L. & SPILLER, B. W. 2012. Crystal structure of an activated variant of small heat shock protein Hsp16.5. *Biochemistry*, 51, 5105-12.
- MICHAUD, S., LAVOIE, S., GUIMOND, M. O. & TANGUAY, R. M. 2008. The nuclear localization of *Drosophila* Hsp27 is dependent on a monopartite arginine-rich NLS and is uncoupled from its association to nuclear speckles. *Biochim Biophys Acta*, 1783, 1200-10.

- MICHAUD, S., MORROW, G., MARCHAND, J. & TANGUAY, R. M. 2002. Drosophila small heat shock proteins: cell and organelle-specific chaperones? *Prog Mol Subcell Biol*, 28, 79-101.
- MORROW, G., HEIKKILA, J. J. & TANGUAY, R. M. 2006. Differences in the chaperone-like activities of the four main small heat shock proteins of *Drosophila melanogaster*. *Cell Stress Chaperones*, 11, 51-60.
- MORROW, G. V. & TANGUAY, R. 2015. Drosophila Small Heat Shock Proteins: An Update on Their Features and Functions. In: TANGUAY, R. M. & HIGHTOWER, L. E. (eds.) *The Big Book on Small Heat Shock Proteins*. Springer International Publishing.
- MOUTAOUIK, M. T., EL FATIMY, R., NASSOUR, H., GAREAU, C., LANG, J., TANGUAY, R. M., MAZROUI, R. & KHANDJIAN, E. W. 2014. UVC-induced stress granules in mammalian cells. *PLoS One*, 9, e112742.
- MOUTAOUIK, M. T., MORROW, G., MAAROUFI, H., FÉRARD, C., FINET, S. & TANGUAY, R. M. 2016. Oligomerization and chaperone-like activity of *Drosophila melanogaster* small heat shock protein DmHsp27 and three arginine mutants in the alpha-crystallin domain. *Cell Stress and Chaperones*, 1-12.
- MURANOVA, L. K., WEEKS, S. D., STRELKOV, S. V. & GUSEV, N. B. 2015. Characterization of Mutants of Human Small Heat Shock Protein HspB1 Carrying Replacements in the N-Terminal Domain and Associated with Hereditary Motor Neuron Diseases. *PLoS One*, 10, e0126248.
- PASTA, S. Y., RAMAN, B., RAMAKRISHNA, T. & RAO CH, M. 2003. Role of the conserved SRLFDQFFG region of alpha-crystallin, a small heat shock protein. Effect on oligomeric size, subunit exchange, and chaperone-like activity. *J Biol Chem*, 278, 51159-66.
- PATEL, S., VIERLING, E. & TAMA, F. 2014. Replica exchange molecular dynamics simulations provide insight into substrate recognition by small heat shock proteins. *Biophys J*, 106, 2644-55.
- PESCHEK, J., BRAUN, N., ROHRBERG, J., BACK, K. C., KRIEHLER, T., KASTENMULLER, A., WEINKAUF, S. & BUCHNER, J. 2013. Regulated structural transitions unleash the chaperone activity of alphaB-crystallin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, E3780-9.
- PLATER, M. L., GOODE, D. & CRABBE, M. J. 1996. Effects of site-directed mutations on the chaperone-like activity of alphaB-crystallin. *J Biol Chem*, 271, 28558-66.
- RAMAN, B., RAMAKRISHNA, T. & RAO, C. M. 1995. Temperature dependent chaperone-like activity of alpha-crystallin. *FEBS Lett*, 365, 133-6.
- ROGALLA, T., EHRNSPERGER, M., PREVILLY, X., KOTLYAROV, A., LUTSCH, G., DUCASSE, C., PAUL, C., WIESKE, M., ARRIGO, A. P., BUCHNER, J. & GAESTEL, M. 1999. Regulation of Hsp27 oligomerization, chaperone function, and protective activity against oxidative stress/tumor necrosis factor alpha by phosphorylation. *J Biol Chem*, 274, 18947-56.
- SHARMA, K. K., KUMAR, G. S., MURPHY, A. S. & KESTER, K. 1998. Identification of 1,1'-bi(4-anilino)naphthalene-5,5'-disulfonic acid binding sequences in alpha-crystallin. *J Biol Chem*, 273, 15474-8.

- SHASHIDHARAMURTHY, R., KOTEICHE, H. A., DONG, J. & MCHAOURAB, H. S. 2005. Mechanism of chaperone function in small heat shock proteins: dissociation of the HSP27 oligomer is required for recognition and binding of destabilized T4 lysozyme. *J Biol Chem*, 280, 5281-9.
- SMITH, J. B., LIU, Y. & SMITH, D. L. 1996. Identification of possible regions of chaperone activity in lens alpha-crystallin. *Exp Eye Res*, 63, 125-8.
- STENGEL, F., BALDWIN, A. J., PAINTER, A. J., JAYA, N., BASHA, E., KAY, L. E., VIERLING, E., ROBINSON, C. V. & BENESCH, J. L. 2010. Quaternary dynamics and plasticity underlie small heat shock protein chaperone function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 2007-12.
- SUN, Y., MANSOUR, M., CRACK, J. A., GASS, G. L. & MACRAE, T. H. 2004. Oligomerization, chaperone activity, and nuclear localization of p26, a small heat shock protein from *Artemia franciscana*. *J Biol Chem*, 279, 39999-40006.
- THERIAULT, J. R., LAMBERT, H., CHAVEZ-ZOBEL, A. T., CHAREST, G., LAVIGNE, P. & LANDRY, J. 2004. Essential role of the NH₂-terminal WD/EPF motif in the phosphorylation-activated protective function of mammalian Hsp27. *J Biol Chem*, 279, 23463-71.
- VAN MONTFORT, R. L., BASHA, E., FRIEDRICH, K. L., SLINGSBY, C. & VIERLING, E. 2001. Crystal structure and assembly of a eukaryotic small heat shock protein. *Nat Struct Biol*, 8, 1025-30.
- WEEKS, S. D. & BOUCKAERT, J. 2014. Small-angle X-ray scattering to obtain models of multivalent lectin-glycan complexes. *Methods Mol Biol*, 1200, 511-26.
- WEEKS, S. D., DRINKER, M. & LOLL, P. J. 2007. Ligation independent cloning vectors for expression of SUMO fusions. *Protein Expr Purif*, 53, 40-50.
- ZHAI, B., VILLEN, J., BEAUSOLEIL, S. A., MINTSERIS, J. & GYGI, S. P. 2008. Phosphoproteome analysis of *Drosophila melanogaster* embryos. *J Proteome Res*, 7, 1675-82.
- ZHANG, K., EZEMADUKA, A. N., WANG, Z., HU, H., SHI, X., LIU, C., LU, X., FU, X., CHANG, Z. & YIN, C. C. 2015. A novel mechanism for small heat shock proteins to function as molecular chaperones. *Sci Rep*, 5, 8811.

Chapitre 5 : Discussion générale et perspectives

Les petites protéines de choc thermique (sHsps) constituent une famille diversifiée et répandue de chaperons moléculaires. Ce sont des protéines exprimées de façon ubiquitaire et qui sont présentes dans tous les règnes de la vie. Les sHsps ont d'abord été identifiées chez *Drosophila melanogaster* en tant que protéines de petit poids moléculaire inductibles par la chaleur (Tissieres et al., 1974). L'expression de nombreuses sHsps est régulée positivement dans le cadre de la réponse au stress cellulaire, mais ces protéines fonctionnent également de manière constitutive dans de nombreux types cellulaires, tissus et organismes (Basha et al., 2012). La plupart des sHsps sont capables d'agir comme des chaperons moléculaires ATP-indépendant en empêchant l'agrégation irréversible des protéines mal repliées.

Le génome de *Drosophila melanogaster* code pour 12 petites Hsp, qui s'expriment distinctivement lors du développement et qui ont différentes localisations intracellulaires et spécificités de substrats. Dans le cadre de cette thèse, j'ai étudié la structure et la fonction de DmHsp27, une sHsp nucléaire chez la drosophile. Ce travail a été essentiellement axé sur la question de savoir comment les oligomères de DmHsp27 accomplissent leur fonction de chaperons moléculaires. Pour aborder cette question, diverses méthodes biochimiques et biophysiques ont été mises en place.

5.1 DmHsp27 n'est pas le seule sHsp nucléaire chez les insectes

La relocalisation des sHsps cytosoliques dans le noyau est observée dans certaines conditions de stress chez pratiquement tous les mammifères (Arrigo and Ahmad-Zadeh, 1981, Borrelli et al., 2002, van de Klundert and de Jong, 1999), mais ce comportement est distinct des sHsps nucléaires qui sont présentes tout le temps dans le noyau chez DmHsp27 et certains sHsps de plantes, grâce à un signal de ciblage nucléaire (NLS) (Siddique et al., 2008, Siddique et al., 2003, Scharf et al., 2001, Michaud et al., 2008). J'ai montré dans le chapitre 2 que le signal NLS riche en arginine n'est pas une particularité de *D. melanogaster* et qu'il existe d'autres sHsps chez les insectes qui présentent le même NLS.

Le rôle exact de la localisation des sHsps dans le noyau reste inconnu. DmHsp27 présente deux patrons d'expression dans le noyau. La protéine peut se disperser uniformément à l'intérieur du noyau et/ou former de petits granules nucléaires identifiées comme des speckles (Michaud et al., 2008, Moutaoufik et al., 2016).

La présence d'une sHsp au niveau des "speckles" nucléaires dans les conditions de non stress est intrigante. Il a été rapporté que HspB1 et HspB5 peuvent se localiser au niveau des speckles nucléaire suivant le choc thermique ou la phosphorylation (van den et al., 2003, den Engelsman et al., 2004, den Engelsman et al., 2013, van Rijk et al., 2003). Par contre, aucune fonction particulière n'a été associée à cette localisation. Il est fort probable que les sHsps jouent le rôle de chaperon dans les speckles. En effet, la forte concentration des protéines dans des petites structures tels que les speckles pourrait favoriser les interactions non spécifiques et causer ainsi le mauvais repliement ou l'agrégation des protéines.

Le réseau d'interaction de DmHsp27 nous laisse croire que cette protéine ne joue pas seulement le rôle de chaperon moléculaire, mais qu'elle est probablement impliquée dans différents processus nucléaires tels que la réplication de l'ADN, la transcription et la maturation de l'ARN.

Dans notre laboratoire on a développé en collaboration avec Dr H.Kampinga (Groningen, Pays bas) une méthode *in cellulo* basée sur (Michels et al., 1995) pour mesurer l'activité thermoprotectrice de DmHsp27. Brièvement la technique se base sur la co-expression de DmHsp27 et la protéine bioluminescente luciférase. Suite au stress thermique si la luciférase est protégée (fonctionnelle), elle va catalyser l'oxydation de la luciférine en présence d'ATP, de Mg^{2+} et d' O^2 pour générer de l'oxyluciférine et de la lumière à une longueur d'onde de 562 nm. La détection de l'activité luciférase est réalisée *in vitro*, après extraction protéique et ajout du substrat luciférine, d' O^2 et d'ATP. Cette technique développée permettra d'étudier l'action de DmHsp27 sur la luciférase tant que chaperon moléculaire dans le noyau des cellules *in vivo*.

5.2 Oligomérisation de DmHsp27 : Une sHsp distincte

Au cours des dernières années, plusieurs structures du domaine ACD chez les animaux ont été résolues par cristallographie aux rayons X ou par résonance magnétique nucléaire (Rajagopal et al., 2015, Hochberg et al., 2014, Baranova et al., 2011, Jehle et al., 2011, Clark et al., 2011, Laganowsky et al., 2010, Bagneris et al., 2009, Weeks et al., 2014). Mais aucune structure oligomérique complète n'est encore disponible. Bien que l'ACD soit l'élément structurel définissant la famille des sHsp, l'oligomérisation dépend des régions NTR et CTE, parce que l'ACD isolé ne forme que des dimères stables (Bagneris et al., 2009).

Durant mes travaux de doctorat, des tentatives pour cristalliser toute la longueur de DmHsp27 ont été entreprises mais ont échouées. Ainsi, plusieurs méthodes structurales biochimiques et biophysiques ont été utilisées pour déterminer la structure quaternaire oligomérique de DmHsp27 et de ses mutants.

Les résidus cystéines 137 et 141 sont impliqués dans la dimérisation de HspB1 humain et Hsp25 murin respectivement (Baranova et al., 2011, Zavialov et al., 1998). Les résultats présentés dans cette thèse démontrent que DmHsp27 ne fait pas l'interface de dimère par des ponts disulfures via la cystéine à la position 93. Cela suggère que DmHsp27 se dimérise essentiellement de manière dépendante des ponts ioniques dans le brin $\beta 6+7$. Ce mode de dimérisation chez les métazoaires appelé « $\beta 7$ -interface dimer» dans lequel les brins $\beta 6$ et $\beta 7$ sont fusionnés en un brin allongé qui forme l'interface du dimère avec son homologue du monomère voisin dans une orientation antiparallèle (Haslbeck and Vierling, 2015).

Le taux d'échange de sous-unités des sHsps est fortement dépendant de la température (Bova et al., 1997, Bova et al., 2002). La diffusion dynamique de la lumière DLS a été utilisée pour analyser la stabilité thermique de DmHsp27WT en séparant les populations solubles de différent rayon hydrodynamique (R_h). DmHsp27WT forme de gros oligomères solubles dans des conditions physiologiques. Ces oligomères ont tendance à être plus gros et plus polydisperses avec l'augmentation de la température. Ce changement de la taille oligomérique observé suite à l'augmentation de la température est complètement réversible lorsque la protéine est refroidie. Des résultats similaires ont été

observés pour HspB1 humain et Hsp25 murin (Ehrnsperger et al., 1999, Chalova et al., 2014, Skouri-Panet et al., 2012). Ces résultats illustrent la possibilité d'une importante réorganisation structurelle réversible de DmHsp27 lors du stress thermique. Les données de fluorescence intrinsèque du tryptophane ont montré que l'augmentation de la température est accompagnée par une diminution monotone de la fluorescence. De plus, l'amplitude de la fluorescence de DmHsp27WT retourne à sa valeur initiale lors du refroidissement, en soutenant une importante réorganisation structurelle réversible au cours du stress autour du résidu tryptophane.

Le profil habituel de sHsps sur chromatographie d'exclusion (SEC) est un seul pic symétrique correspondant aux formes oligomériques. Les données obtenues montrent que, contrairement aux sHsps de mammifères, DmHsp27WT forme deux populations d'oligomères ayant un poids moléculaire de 725 kDa et 540 kDa. Bien que les sHsps soient reconnus pour être dynamiques et en équilibre constant (Stengel et al., 2010, Basha et al., 2012), cela ne semble pas être le cas pour les oligomères de DmHsp27. En effet, chaque population isolée a donné un seul pic avec le même volume d'élution lorsqu'ils sont séparés et ré-analysés par SEC ou sur gel natif. En outre, l'activité de chaperon de DmHsp27WT et de ses deux populations d'oligomères était comparable dans des conditions réductrices de stress thermique. La question qui se pose est pourquoi DmHsp27WT a deux populations oligomériques fonctionnelles. À l'heure actuelle, il n'y a pas de réponse claire à cette question. Cependant, les données publiées récemment obtenues sur AgsA, une sHsp de la bactérie pathogène *Salmonella enterica* ont montré qu'elle existe dans un équilibre entre deux états oligomériques (18-mer et 24-mer). Cet équilibre semble indispensable pour l'activité de chaperon *in vivo* (Mani et al., 2016). Les résultats présentés ici suggèrent que l'équilibre entre les deux populations de DmHsp27 n'a pas d'importance pour son activité chaperon *in vitro*. D'autres expérimentations seront nécessaires pour évaluer la fonction *in vivo* des deux populations de DmHsp27.

5.3 Alpha cristallin de DmHsp27 : Un domaine bien conservé au niveau structural et fonctionnel

Le domaine alpha-cristallin (ACD) représente une signature conservée des sHsps. Dans l'espoir d'obtenir des mutants inactifs, trois différents résidus d'arginine situés dans l'ACD de DmHsp27 ont été mutés et caractérisés. L'arginine122 est équivalent de l'arginine127 chez HspB1, dont la mutation en tryptophane est responsable de la neuropathie motrice héréditaire distale (DHMN). Par ailleurs, l'arginine 131 de DmHsp27 est équivalente de l'arginine 136 chez HspB1, dont la mutation en tryptophane ou leucine est associée à la maladie de Charcot-Marie-Tooth de type 2 (Evgrafov et al., 2004, Kostenko and Moens, 2009). Enfin, l'arginine 135 de DmHsp27 l'équivalent de l'arginine 140 chez HspB1, l'arginine 120 chez HspB5 et l'arginine 116 chez HspB4, pour laquelle la mutation en glycine et cystéine (HspB1-R140G, HspB4-R116C et HspB5-R120G) est la cause de DHMN, la maladie de Charcot-Marie-Tooth de type 2, la myopathie avec surcharge en desmine et la cataracte (Gentil and Cooper, 2012, Vicart et al., 1998, Inagaki et al., 2006, Bera and Abraham, 2002, Litt et al., 1998). Les données montrent que la mutation des résidus arginine au sein de l'ACD en glycine augmente la fluorescence intrinsèque du tryptophane. Cela pourrait signifier que le résidu tryptophane de DmHsp27 est plus accessible que le résidu correspondant dans les mutants ACD, suggérant que l'environnement du tryptophane est plus souple. Des analyses par électrophorèse native et SEC montrent que les mutants dans l'ACD induisent des changements importants dans la structure quaternaire de DmHsp27. Tous les mutants forment de gros oligomères d'environ 1100 kDa. Cette propriété de mutants d'arginine de DmHsp27 pour former de gros oligomères est similaire à HspB1-R140G, HspB4-R116C et HspB5-R120G (Nefedova et al., 2013, Michiel et al., 2009, Cobb and Petrash, 2000, Bova et al., 1999, Bera et al., 2002, Kumar et al., 1999). Puisque les mutants ACD avaient augmenté la taille oligomérique nous avons testé la possibilité d'agrégation *in vivo* dans des cellules cultivées comme ce qui a été montré pour les mutants Hsp27-R148G de hamster chinois et R120G, R120C et R120D chez HspB5 humain (Chavez Zobel et al. 2005 and Simon et al. 2007). *In vivo*, DmHsp27WT et les mutants R122G, R131G et R135G présentent la même localisation intranucléaire lorsqu'elles sont

exprimées dans les cellules HeLa et semblaient s'associer aux structures dites speckles contrairement à ce qui a été montré pour la mutation HspB5-R120 qui empêche la localisation au niveau des speckles (van den et al., 2003).

L'activité de chaperon du mutant R135 était comparable à celle de DmHsp27 dans les conditions de réduction et de stress thermique, tandis que les mutants R122G et R131G étaient plus efficaces que DmHsp27 pour empêcher l'agrégation de l'insuline sous les conditions de réductions. Certaines études ont montré que HspB4-R116C-, HspB5-R120G et HspB1-R140G diminuent l'activité chaperon en utilisant plusieurs substrats (Kumar et al., 1999, Simon et al., 2007, Nefedova et al., 2013, Bova et al., 1999). D'autres ont révélé que le mutant HspB5-R120G avait une activité comparable à celle de HspB5 sauvage dans sa capacité d'empêcher l'agrégation de l'insuline (Treweek et al., 2005).

Une étude par (Clark et al., 2011) a montré que le mutant HspB5-R120G peut se réarranger pour former un dimère par appariement entre l'histidine 83 et l'acide aspartique 80. Un tel réarrangement pourrait dissocier le mutant R135G de DmHsp27 de la même manière pour former un dimère par appariement de bases entre la glutamine 98 et l'acide aspartique 95 en se basant sur l'alignement de séquence. Il est possible que le dimère formé par l'ACD de DmHsp27 soit capable d'avoir plus d'une conformation, et les changements par les mutations seraient compensés. Seules les structures cristallographiques pourraient nous donner de telles réponses. Au total, ces résultats caractérisent les mutants d'arginine au niveau ACD de DmHsp27. Cependant, plusieurs investigations sont encore nécessaires pour la compréhension des mécanismes moléculaires responsables de ces différences.

5.4 Région N-terminale de DmHsp27 : une région critique pour la structure et l'activité chaperon

Différents mécanismes ont été proposés pour réguler la structure oligomérique et le fonctionnement des sHsps. La phosphorylation de résidus serine dans la région N-terminale (NTR) a été rapportée pour réguler l'activité de chaperon des sHsps chez les mammifères (Haslbeck and Vierling, 2015). Il affecte l'état oligomérique vers des plus

petites espèces enrichies en dimères, tétramères et hexamères. Un mutant phospho-mimétique de HspB1 déplace l'équilibre entre les oligomères et dimères en faveur des plus petits assemblages (Shashidharamurthy et al., 2005, Theriault et al., 2004). De même, des études utilisant l'imitation de la phosphorylation des variantes de HspB5 révèlent un assemblage d'oligomères consistant principalement en 12-mers, hexamères et dimères (Peschek et al., 2013). La prédominance de ces espèces indique que principalement les contacts au niveau de la NTR de l'oligomère sont influencés par la phosphorylation, ce qui est également conforme à la localisation des sites de phosphorylation dans cette région. Bien que la phosphorylation de HspB5 résulte en une augmentation de l'activité chaperon (Peschek et al., 2013), la situation est plus compliquée pour HspB1 selon le substrat utilisé (Shashidharamurthy et al., 2005, Hayes et al., 2009, Rogalla et al., 1999). Les autres sHsps non mammifères peuvent également être phosphorylées. C'est le cas de DmHsp27, qui peut être phosphorylée par une/des kinase(s) inconnue(s) au niveau de deux sérines (S58 et S75)(Bodenmiller et al., 2007, Franco et al., 2011, Zhai et al., 2008). Cependant, il reste difficile de savoir si la phosphorylation de sHsps de non mammifères a un impact similaire sur la structure et l'activité chaperon comme c'est le cas pour les sHsps des mammifères. Ici j'ai montré que DmHsp27, et les mutants phospho-mimétiques et non-phosphorylables au niveau des deux sérine 58 et 75 avaient la même structure oligomérique, activité chaperon et localisation que DmHsp27WT. Ainsi, à la différence des sHsps de mammifères, les deux sites de phosphorylation S58 et S75 n'ont pas affecter l'équilibre oligomérique, ni la localisation intracellulaire de DmHsp27.

La région NTR de sHsps a été décrite comme étant mal conservée. Fonctionnellement, le rôle du NTR a été impliqué dans l'activité chaperon et l'oligomérisation. La plupart des études ont indiqué que la suppression ou la mutation de la région NTR sont accompagnées d'une réduction de l'activité chaperon et la dissociation des oligomères. Par utilisation des simulations de la dynamique moléculaire de Hsp16.9 du blé et Hsp18.1 du petit pois (Patel et al., 2014) ont montré que la région NTR du dimère est flexible/dynamique et présente deux conformations : une conformation fermée (inactive) lors du repos et une conformation ouverte (active) suite au stress, suggérant que la NTR du dimère se comporte comme un domaine structural. Dans ce travail, j'ai

caractérisé pour la première fois le rôle d'un motif conservé dans la région N-terminale de DmHsp27 sur la structure oligomérique et l'activité chaperon. La délétion de la région NTR dans de nombreux sHsps conduit à la perturbation d'oligomérisation et la perte de la fonction de chaperon (Baranova et al., 2011, Feil et al., 2001, Kundu et al., 2007, Laganowsky et al., 2010, Leroux et al., 1997, Heirbaut et al., 2014, Crack et al., 2002, Sun et al., 2004, Theriault et al., 2004). Des données similaires ont été obtenues après délétion complète du NTR chez DmHsp27 suggérant un rôle essentiel du NTR dans l'oligomérisation et l'activité chaperon.

Le motif conservé (FGFG) du phenylalanine 29 en glycine 32 est équivalent à la « région riche en phénylalanine » décrite chez plusieurs sHsps de vertébrés (Crabbe and Goode, 1994). La délétion de ce motif dans HspB4 et HspB5 humains montrent une diminution de la taille oligomérique et une augmentation de l'activité chaperon (Pasta et al., 2003). La délétion du motif (FGFG) affecte l'état oligomérique avec la formation de gros oligomères et améliore l'activité chaperon ce qui suggère la présence au moins d'un site important pour l'oligomérisation et l'activité chaperon dans ce motif. Pour déterminer les résidus fonctionnels dans le motif FGFG de DmHsp27, j'ai étudié les mutants de résidus F29, G30, F31 et G32. Le résidu F31, le moins conservé n'a aucun effet sur la structure quaternaire ni l'activité chaperon de DmHsp27. Le résidu F29 semble important pour oligomérisation du pic # 2 autour de 540 kDa décrit dans (Moutaoufik et al., 2016). Les mutants F29A et F29Y dissocient partiellement le pic # 2 pour former de gros oligomères présentés par le pic # 1 à environ 800 kDa. Les mutants G30R et G32R déstabilisent l'équilibre pour former un seul pic correspondant à un oligomère supérieur avec une augmentation de l'activité chaperon en utilisant l'insuline comme substrat. Deux articles sur la structure de Hsp16.9 du blé (van Montfort et al., 2001b) et Hsp16.0 de levure (Hanazono et al., 2013) ont mis en évidence le rôle important des phenylalanines dans la région N-terminale dans la formation d'oligomères et l'activité chaperon. Des études antérieures utilisant alphaB-cristallin bovin ou murin, ont montré que la mutation de F24, F27 ou F28 diminue la taille oligomérique et l'activité chaperon à des températures élevées (Kelley and Abraham, 2003, Horwitz et al., 1998, Plater et al., 1996). Récemment, (Heirbaut et al., 2014) ont montré que la mutation de la phenylalanine conservée à la position 33 en alanine dans le NTR de HspB6 humain la

rend moins active en utilisant l'insuline et l'alcool déshydrogénase de levure comme substrats. F28 chez alphaB-cristallin bovin et F33 chez HspB6 humain, qui sont équivalents à F29 dans DmHsp27 ont montré un comportement différent par rapport à F29 de DmHsp27. F29 de DmHsp27 semble plus affecter l'équilibre entre les deux pics (populations). De plus, la mutation de la glycine à la position 34 en arginine dans région NTR de HspB1 (équivalent à la glycine à la position 30 DmHsp27) a été associée à des neuropathies motrices héréditaires distales (Capponi et al., 2011). Une étude réalisée par (Muranova et al., 2015) a montré que le mutant HspB1-G34R forme des oligomères stables légèrement plus gros que les oligomères correspondants de HspB1WT et une diminution de l'activité chaperon.

En résumé, les mutations des F29, G30 et G32 dans le domaine N-terminal destabilisent la structure oligomérique *in vitro*. En outre, ces mutations augmentent l'activité chaperon dans les conditions de réductions.

5.5 Activation thermique de DmHsp27 : relation structure et fonction

Il existe une controverse concernant le mode d'activation de sHsps. Le modèle général d'activité chaperon suggère que les sHsps se dissocient en petites formes oligomériques, probablement dimères, pour se réassocier en une nouvelle forme oligomérique contenant le substrat lié (Haslbeck and Vierling, 2015, Basha et al., 2012, Delbecq and Klevit, 2013, Garrido et al., 2012, McHaourab et al., 2009). Ce modèle présente des exceptions pour certaines sHsps, par exemple pour Hsp26 de *S. cerevisiae*, chez laquelle la transition vers un état augmentant l'affinité et la liaison au substrat et l'activité chaperon se fait par de légers changements conformationnels sans perturbation de l'état oligomérique (Franzmann et al., 2008). Un autre exemple est observé chez les sHsps de classe II des plantes, qui restent oligomériques mais subissent des réarrangements structuraux lors de l'activation (Basha et al., 2010).

In vitro, HspB1 montre une auto-association suite à la chaleur, conduisant à une augmentation de la taille oligomérique, en corrélation avec l'augmentation de son activité chaperon (Lelj-Garolla and Mauk, 2006). Hsp22 de rat révèle des changements

conformationnels par la chaleur ce qui augmente l'exposition des surfaces hydrophobes et d'activité chaperon (Chowdary et al., 2004). CeHsp17 de *C. elegans* forme des gros assemblages en forme d'assemblage en feuille super-moléculaire (SMA : sheet-like super-molecular assemblies) à des températures élevées et seulement la forme SMA présente une activité chaperon (Zhang et al., 2015).

Il est évident que toutes les sHsps ne s'activent pas par le même mécanisme. Dans le cas de DmHsp27, j'ai montré une activation thermique réversible induite par des changements structuraux qui conduisent à la formation de gros oligomères supérieurs à 1000 kDa. DmHsp27 est plus efficace en tant que chaperon à 42 °C qu'à 20 °C en utilisant l'insuline. Ceci suggère que l'activation thermique de DmHsp27 se passe essentiellement par la formation de gros oligomères d'environ 1100 kDa. Les espèces activées lient les substrats non-natifs et empêchent leurs agrégations par la formation des complexes stables DmHsp27/substrat (Figure 5.1).

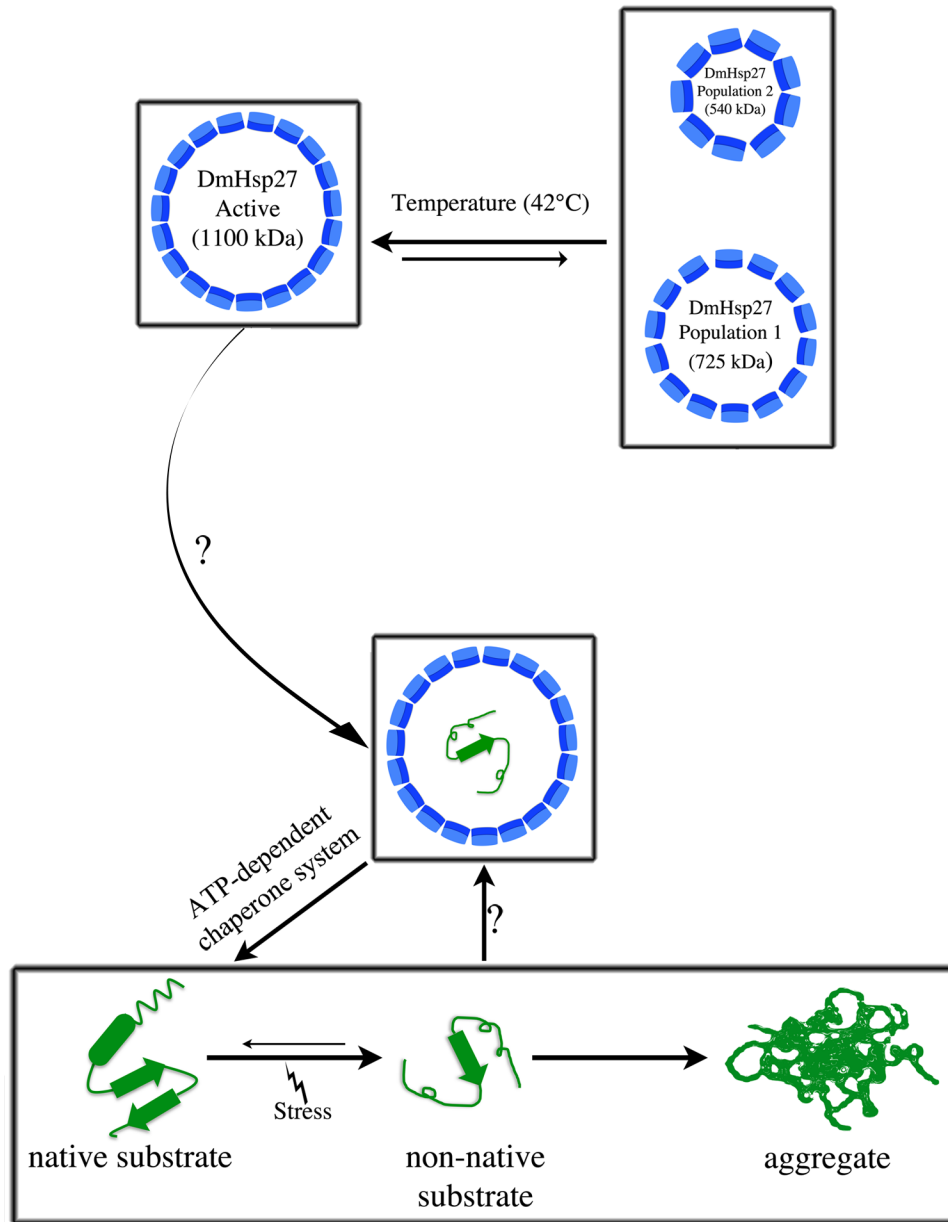


Figure 5.1: Le mécanisme d'activation de DmHsp27.

DmHsp27 forme des oligomères avec deux populations à 540 et 725 kDa. En réponse à l'augmentation de température, DmHsp27 s'active. Cette activation conduit à une association des oligomères d'environ 1100 kDa. Les espèces activées lient les substrats non-native et empêchent leurs agrégations par la formation de complexes stables de DmHsp27/substrat. Les substrats liés peuvent être libérés des complexes DmHsp27 et

replier par le système de chaperon ATP dépendant Hsp70/40. Les points d'interrogation indiquent les points, qui ne sont pas résolues en détail.

En résumé, la corrélation de la transition structurelle et l'activité chaperon de DmHsp27 est maintenant plus évidente. Néanmoins, nous sommes encore loin de comprendre les détails des mécanismes de l'activité chaperon. Comment DmHsp27 reconnaît et lie les substrats et l'implication de son NTR dans ce processus restent énigmatique.

5.6 Conclusion

Depuis leurs découvertes chez la drosophile les sHsps ont fait l'objet de nombreuses recherches, à la fois au niveau de leur structure qu'au niveau de leur fonction. Ici, nous avons étudié pour la première fois DmHsp27 une petite protéine de stress nucléaire chez *Drosophila melanogaster*. La structure oligomérique, le modèle d'activation thermique, la corrélation mécanistique des états oligomériques et l'activité chaperon de DmHsp27 ont été déterminées. Néanmoins, nous sommes encore loin de comprendre les principaux aspects importants de la fonction de DmHsp27. Nous avons entrepris un grand travail de cristallisation sans succès et à ce jour nous pensons que sans structure 3D, il reste difficile d'expliquer les différents assemblages obtenus suite à des variations dans la région N-terminale. De plus, comment DmHsp27 reconnaît et lie son substrat et comment se passe le réassemblage des complexes DmHsp27-substrats, reste encore un mystère.

Finalement, l'édition du genome est un domaine en plein essor, grâce au développement de différentes techniques reposant sur l'utilisation de nucléases. Ces avancées récentes, rapportent de nouveaux outils moléculaires très ingénieux qui pourraient être utilisées d'un coté pour analyser l'importance de la fonction des sHsps dans des conditions in cellulo et exploitées pour approfondir les résultats présentés dans cette thèse.

Références

- AHMAD, M. F., RAMAN, B., RAMAKRISHNA, T. & RAO CH, M. 2008. Effect of phosphorylation on alpha B-crystallin: differences in stability, subunit exchange and chaperone activity of homo and mixed oligomers of alpha B-crystallin and its phosphorylation-mimicking mutant. *J Mol Biol*, 375, 1040-51.
- AHRMAN, E., GUSTAVSSON, N., HULTSCHIG, C., BOELENS, W. C. & EMANUELSSON, C. S. 2007a. Small heat shock proteins prevent aggregation of citrate synthase and bind to the N-terminal region which is absent in thermostable forms of citrate synthase. *Extremophiles*, 11, 659-66.
- AHRMAN, E., LAMBERT, W., AQUILINA, J. A., ROBINSON, C. V. & EMANUELSSON, C. S. 2007b. Chemical cross-linking of the chloroplast localized small heat-shock protein, Hsp21, and the model substrate citrate synthase. *Protein Sci*, 16, 1464-78.
- ALMEIDA-SOUZA, L., GOETHALS, S., DE WINTER, V., DIERICK, I., GALLARDO, R., VAN DURME, J., IROBI, J., GETTEMANS, J., ROUSSEAU, F., SCHYMKOWITZ, J., TIMMERMAN, V. & JANSSENS, S. 2010. Increased monomerization of mutant HSPB1 leads to protein hyperactivity in Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *J Biol Chem*, 285, 12778-86.
- AMERIK, A. Y. & HOCHSTRASSER, M. 2004. Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. *Biochim Biophys Acta*, 1695, 189-207.
- ANFINSEN, C. B. 1973. Principles that govern the folding of protein chains. *Science*, 181, 223-30.
- ANFINSEN, C. B., HABER, E., SELA, M. & WHITE, F. H., JR. 1961. The kinetics of formation of native ribonuclease during oxidation of the reduced polypeptide chain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 47, 1309-14.
- AQUILINA, J. A., BENESCH, J. L., BATEMAN, O. A., SLINGSBY, C. & ROBINSON, C. V. 2003. Polydispersity of a mammalian chaperone: mass spectrometry reveals the population of oligomers in alphaB-crystallin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 10611-6.
- ARRIGO, A. P. 1998. Small stress proteins: chaperones that act as regulators of intracellular redox state and programmed cell death. *Biol Chem*, 379, 19-26.
- ARRIGO, A. P. 2013. Human small heat shock proteins: protein interactomes of homo- and hetero-oligomeric complexes: an update. *FEBS Lett*, 587, 1959-69.
- ARRIGO, A. P. & AHMAD-ZADEH, C. 1981. Immunofluorescence localization of a small heat shock protein (hsp 23) in salivary gland cells of *Drosophila melanogaster*. *Mol Gen Genet*, 184, 73-9.
- ARRIGO, A. P., DARLIX, J. L., KHANDJIAN, E. W., SIMON, M. & SPAHR, P. F. 1985. Characterization of the prosome from *Drosophila* and its similarity to the cytoplasmic structures formed by the low molecular weight heat-shock proteins. *EMBO J*, 4, 399-406.
- ARTERO, R., FURLONG, E. E., BECKETT, K., SCOTT, M. P. & BAYLIES, M. 2003. Notch and Ras signaling pathway effector genes expressed in fusion competent and founder cells during *Drosophila* myogenesis. *Development*, 130, 6257-72.
- ASHBURNER, M. 1970. The genetic analysis of puffing in polytene chromosomes of *Drosophila*. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 176, 319-27.

- AYME, A. & TISSIERES, A. 1985. Locus 67B of *Drosophila melanogaster* contains seven, not four, closely related heat shock genes. *Embo J*, 4, 2949-54.
- BACHETTI, T., DI ZANNI, E., BALBI, P., BOCCA, P., PRIGIONE, I., DEIANA, G. A., REZZANI, A., CECCHERINI, I. & SECHI, G. 2010. In vitro treatments with ceftriaxone promote elimination of mutant glial fibrillary acidic protein and transcription down-regulation. *Exp Cell Res*, 316, 2152-65.
- BAGNERIS, C., BATEMAN, O. A., NAYLOR, C. E., CRONIN, N., BOELEN, W. C., KEEP, N. H. & SLINGSBY, C. 2009. Crystal structures of alpha-crystallin domain dimers of alphaB-crystallin and Hsp20. *J Mol Biol*, 392, 1242-52.
- BALCH, W. E., MORIMOTO, R. I., DILLIN, A. & KELLY, J. W. 2008. Adapting proteostasis for disease intervention. *Science*, 319, 916-9.
- BALDWIN, A. J., HILTON, G. R., LIOE, H., BAGNERIS, C., BENESCH, J. L. & KAY, L. E. 2011a. Quaternary dynamics of alphaB-crystallin as a direct consequence of localised tertiary fluctuations in the C-terminus. *J Mol Biol*, 413, 310-20.
- BALDWIN, A. J., LIOE, H., HILTON, G. R., BAKER, L. A., RUBINSTEIN, J. L., KAY, L. E. & BENESCH, J. L. 2011b. The polydispersity of alphaB-crystallin is rationalized by an interconverting polyhedral architecture. *Structure*, 19, 1855-63.
- BARANOVA, E. V., WEEKS, S. D., BEELEN, S., BUKACH, O. V., GUSEV, N. B. & STRELKOV, S. V. 2011. Three-dimensional structure of alpha-crystallin domain dimers of human small heat shock proteins HSPB1 and HSPB6. *J Mol Biol*, 411, 110-22.
- BASHA, E., FRIEDRICH, K. L. & VIERLING, E. 2006. The N-terminal arm of small heat shock proteins is important for both chaperone activity and substrate specificity. *J Biol Chem*, 281, 39943-52.
- BASHA, E., JONES, C., BLACKWELL, A. E., CHENG, G., WATERS, E. R., SAMSEL, K. A., SIDDIQUE, M., PETT, V., WYSOCKI, V. & VIERLING, E. 2013. An unusual dimeric small heat shock protein provides insight into the mechanism of this class of chaperones. *J Mol Biol*, 425, 1683-96.
- BASHA, E., JONES, C., WYSOCKI, V. & VIERLING, E. 2010. Mechanistic differences between two conserved classes of small heat shock proteins found in the plant cytosol. *J Biol Chem*, 285, 11489-97.
- BASHA, E., LEE, G. J., BRECI, L. A., HAUSRATH, A. C., BUAN, N. R., GIESE, K. C. & VIERLING, E. 2004a. The identity of proteins associated with a small heat shock protein during heat stress in vivo indicates that these chaperones protect a wide range of cellular functions. *J Biol Chem*, 279, 7566-75.
- BASHA, E., LEE, G. J., DEMELER, B. & VIERLING, E. 2004b. Chaperone activity of cytosolic small heat shock proteins from wheat. *Eur J Biochem*, 271, 1426-36.
- BASHA, E., O'NEILL, H. & VIERLING, E. 2012. Small heat shock proteins and alpha-crystallins: dynamic proteins with flexible functions. *Trends Biochem Sci*, 37, 106-17.
- BEAULIEU, J. F., ARRIGO, A. P. & TANGUAY, R. M. 1989a. Interaction of *Drosophila* 27,000 Mr heat-shock protein with the nucleus of heat-shocked and ecdysone-stimulated culture cells. *J Cell Sci*, 92 (Pt 1), 29-36.
- BEAULIEU, J. F., ARRIGO, A. P. & TANGUAY, R. M. 1989b. Interaction of *Drosophila* 27000 Mr Heat-Shock Protein with the Nucleus of Heat-Shocked and Ecdysone-Stimulated Culture Cells. *Journal of Cell Science*, 92, 29-36.

- BENESCH, J. L., AQUILINA, J. A., BALDWIN, A. J., REKAS, A., STENGEL, F., LINDNER, R. A., BASHA, E., DEVLIN, G. L., HORWITZ, J., VIERLING, E., CARVER, J. A. & ROBINSON, C. V. 2010. The quaternary organization and dynamics of the molecular chaperone HSP26 are thermally regulated. *Chem Biol*, 17, 1008-17.
- BENESCH, J. L., AYOUB, M., ROBINSON, C. V. & AQUILINA, J. A. 2008. Small heat shock protein activity is regulated by variable oligomeric substructure. *J Biol Chem*, 283, 28513-7.
- BENNDORF, R., MARTIN, J. L., KOSAKOVSKY POND, S. L. & WERTHEIM, J. O. 2014. Neuropathy- and myopathy-associated mutations in human small heat shock proteins: Characteristics and evolutionary history of the mutation sites. *Mutat Res Rev Mutat Res*.
- BENTLEY, N. J., FITCH, I. T. & TUIITE, M. F. 1992. The small heat-shock protein Hsp26 of *Saccharomyces cerevisiae* assembles into a high molecular weight aggregate. *Yeast*, 8, 95-106.
- BEPPELING, A., ALTE, F., KRIEHLBER, T., BRAUN, N., WEINKAUF, S., GROLL, M., HASLBECK, M. & BUCHNER, J. 2012. Alternative bacterial two-component small heat shock protein systems. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 20407-12.
- BERA, S. & ABRAHAM, E. C. 2002. The alphaA-crystallin R116C mutant has a higher affinity for forming heteroaggregates with alphaB-crystallin. *Biochemistry*, 41, 297-305.
- BERA, S., THAMPI, P., CHO, W. J. & ABRAHAM, E. C. 2002. A positive charge preservation at position 116 of alpha A-crystallin is critical for its structural and functional integrity. *Biochemistry*, 41, 12421-6.
- BERRY, V., FRANCIS, P., REDDY, M. A., COLLYER, D., VITHANA, E., MACKAY, I., DAWSON, G., CAREY, A. H., MOORE, A., BHATTACHARYA, S. S. & QUINLAN, R. A. 2001. Alpha-B crystallin gene (CRYAB) mutation causes dominant congenital posterior polar cataract in humans. *Am J Hum Genet*, 69, 1141-5.
- BHAGYALAXMI, S. G., SRINIVAS, P., BARTON, K. A., KUMAR, K. R., VIDYAVATHI, M., PETRASH, J. M., BHANUPRAKASH REDDY, G. & PADMA, T. 2009. A novel mutation (F71L) in alphaA-crystallin with defective chaperone-like function associated with age-related cataract. *Biochim Biophys Acta*, 1792, 974-81.
- BIASINI, M., BIENERT, S., WATERHOUSE, A., ARNOLD, K., STUDER, G., SCHMIDT, T., KIEFER, F., GALLO CASSARINO, T., BERTONI, M., BORDOLI, L. & SCHWEDE, T. 2014. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Res*, 42, W252-8.
- BLOEMENDAL, M., TOUMADJE, A. & JOHNSON, W. C., JR. 1999. Bovine lens crystallins do contain helical structure: a circular dichroism study. *Biochim Biophys Acta*, 1432, 234-8.
- BODENMILLER, B., MUELLER, L. N., PEDRIOLI, P. G., PFLIEGER, D., JUNGER, M. A., ENG, J. K., AEBERSOLD, R. & TAO, W. A. 2007. An integrated chemical, mass spectrometric and computational strategy for (quantitative) phosphoproteomics: application to *Drosophila melanogaster* Kc167 cells. *Mol Biosyst*, 3, 275-86.
- BODENMILLER, B., WANKA, S., KRAFT, C., URBAN, J., CAMPBELL, D., PEDRIOLI, P. G., GERRITS, B., PICOTTI, P., LAM, H., VITEK, O., BRUSNIAK, M. Y., ROSCHITZKI, B., ZHANG, C., SHOKAT, K. M., SCHLAPBACH, R., COLMAN-LERNER, A.,

- NOLAN, G. P., NESVIZHSKII, A. I., PETER, M., LOEWITH, R., VON MERING, C. & AEBERSOLD, R. 2010. Phosphoproteomic analysis reveals interconnected system-wide responses to perturbations of kinases and phosphatases in yeast. *Sci Signal*, 3, rs4.
- BONCORAGLIO, A., MINOIA, M. & CARRA, S. 2012. The family of mammalian small heat shock proteins (HSPBs): implications in protein deposit diseases and motor neuropathies. *Int J Biochem Cell Biol*, 44, 1657-69.
- BORRELLI, M. J., BERNOCK, L. J., LANDRY, J., SPITZ, D. R., WEBER, L. A., HICKEY, E., FREEMAN, M. L. & CORRY, P. M. 2002. Stress protection by a fluorescent Hsp27 chimera that is independent of nuclear translocation or multimeric dissociation. *Cell Stress Chaperones*, 7, 281-96.
- BOURRELLE-LANGLOIS, M., MORROW, G., FINET, S. & TANGUAY, R. M. 2016. In Vitro Structural and Functional Characterization of the Small Heat Shock Proteins (sHSP) of the Cyanophage S-ShM2 and Its Host, *Synechococcus* sp. WH7803. *PLoS One*, 11, e0162233.
- BOVA, M. P., DING, L. L., HORWITZ, J. & FUNG, B. K. 1997. Subunit exchange of alphaA-crystallin. *J Biol Chem*, 272, 29511-7.
- BOVA, M. P., HUANG, Q., DING, L. & HORWITZ, J. 2002. Subunit exchange, conformational stability, and chaperone-like function of the small heat shock protein 16.5 from *Methanococcus jannaschii*. *J Biol Chem*, 277, 38468-75.
- BOVA, M. P., YARON, O., HUANG, Q., DING, L., HALEY, D. A., STEWART, P. L. & HORWITZ, J. 1999. Mutation R120G in alphaB-crystallin, which is linked to a desmin-related myopathy, results in an irregular structure and defective chaperone-like function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 6137-42.
- BRAUN, N., ZACHARIAS, M., PESCHEK, J., KASTENMULLER, A., ZOU, J., HANZLIK, M., HASLBECK, M., RAPPSILBER, J., BUCHNER, J. & WEINKAUF, S. 2011. Multiple molecular architectures of the eye lens chaperone alphaB-crystallin elucidated by a triple hybrid approach. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 20491-6.
- BRUEY, J. M., DUCASSE, C., BONNIAUD, P., RAVAGNAN, L., SUSIN, S. A., DIAZ-LATOUD, C., GURBUXANI, S., ARRIGO, A. P., KROEMER, G., SOLARY, E. & GARRIDO, C. 2000. Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. *Nat Cell Biol*, 2, 645-52.
- BUREL, C., MEZGER, V., PINTO, M., RALLU, M., TRIGON, S. & MORANGE, M. 1992. Mammalian heat shock protein families. Expression and functions. *Experientia*, 48, 629-34.
- CAPPONI, S., GEROLDI, A., FOSSA, P., GRANDIS, M., CIOTTI, P., GULLI, R., SCHENONE, A., MANDICH, P. & BELLONE, E. 2011. HSPB1 and HSPB8 in inherited neuropathies: study of an Italian cohort of dHMN and CMT2 patients. *J Peripher Nerv Syst*, 16, 287-94.
- CARRA, S., BONCORAGLIO, A., KANON, B., BRUNSTING, J. F., MINOIA, M., RANA, A., VOS, M. J., SEIDEL, K., SIBON, O. C. & KAMPINGA, H. H. 2010. Identification of the *Drosophila* ortholog of HSPB8: implication of HSPB8 loss of function in protein folding diseases. *J Biol Chem*, 285, 37811-22.
- CARRA, S., BRUNSTING, J. F., LAMBERT, H., LANDRY, J. & KAMPINGA, H. H. 2009. HspB8 participates in protein quality control by a non-chaperone-like

- mechanism that requires eIF2{alpha} phosphorylation. *J Biol Chem*, 284, 5523-32.
- CARRA, S., SEGUIN, S. J., LAMBERT, H. & LANDRY, J. 2008. HspB8 chaperone activity toward poly(Q)-containing proteins depends on its association with Bag3, a stimulator of macroautophagy. *J Biol Chem*, 283, 1437-44.
- CASHIKAR, A. G., DUENNWALD, M. & LINDQUIST, S. L. 2005. A chaperone pathway in protein disaggregation. Hsp26 alters the nature of protein aggregates to facilitate reactivation by Hsp104. *J Biol Chem*, 280, 23869-75.
- CASPERS, G. J., LEUNISSEN, J. A. & DE JONG, W. W. 1995. The expanding small heat-shock protein family, and structure predictions of the conserved "alpha-crystallin domain". *J Mol Evol*, 40, 238-48.
- CATALAN, A., HUTTER, S. & PARSCH, J. 2012. Population and sex differences in *Drosophila melanogaster* brain gene expression. *BMC Genomics*, 13, 654.
- CE, P., ERKIZAN, O. & GEDIZLIOGLU, M. 2011. Elevated HSP27 levels during attacks in patients with multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand*, 124, 317-20.
- CELNIKER, S. E., DILLON, L. A., GERSTEIN, M. B., GUNSALUS, K. C., HENIKOFF, S., KARPEN, G. H., KELLIS, M., LAI, E. C., LIEB, J. D., MACALPINE, D. M., MICKLEM, G., PIANO, F., SNYDER, M., STEIN, L., WHITE, K. P., WATERSTON, R. H. & MOD, E. C. 2009. Unlocking the secrets of the genome. *Nature*, 459, 927-30.
- CHALOVA, A. S., SUDNITSYNA, M. V., SEMENYUK, P. I., ORLOV, V. N. & GUSEV, N. B. 2014. Effect of disulfide crosslinking on thermal transitions and chaperone-like activity of human small heat shock protein HspB1. *Cell Stress Chaperones*, 19, 963-72.
- CHARETTE, S. J., LAVOIE, J. N., LAMBERT, H. & LANDRY, J. 2000. Inhibition of Daxx-mediated apoptosis by heat shock protein 27. *Mol Cell Biol*, 20, 7602-12.
- CHATR-ARYAMONTRI, A., OUGHTRED, R., BOUCHER, L., RUST, J., CHANG, C., KOLAS, N. K., O'DONNELL, L., OSTER, S., THEESFELD, C., SELLAM, A., STARK, C., BREITKREUTZ, B. J., DOLINSKI, K. & TYERS, M. 2017. The BioGRID interaction database: 2017 update. *Nucleic Acids Res*, 45, D369-D379.
- CHEN, J., FEIGE, M. J., FRANZMANN, T. M., BEPPERLING, A. & BUCHNER, J. 2010a. Regions outside the alpha-crystallin domain of the small heat shock protein Hsp26 are required for its dimerization. *J Mol Biol*, 398, 122-31.
- CHEN, J., XIE, C., TIAN, L., HONG, L., WU, X. & HAN, J. 2010b. Participation of the p38 pathway in *Drosophila* host defense against pathogenic bacteria and fungi. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 20774-9.
- CHEN, Q., MA, J., YAN, M., MOTHABI, M. E., LIU, Y. & ZHENG, F. 2009. A novel mutation in CRYAB associated with autosomal dominant congenital nuclear cataract in a Chinese family. *Mol Vis*, 15, 1359-65.
- CHEN, S. F., KANG, M. L., CHEN, Y. C., TANG, H. W., HUANG, C. W., LI, W. H., LIN, C. P., WANG, C. Y., WANG, P. Y., CHEN, G. C. & WANG, H. D. 2012. Autophagy-related gene 7 is downstream of heat shock protein 27 in the regulation of eye morphology, polyglutamine toxicity, and lifespan in *Drosophila*. *J Biomed Sci*, 19, 52.
- CHEN, S. J., SUN, T. X., AKHTAR, N. J. & LIANG, J. J. 2001. Oxidation of human lens recombinant alphaA-crystallin and cysteine-deficient mutants. *J Mol Biol*, 305, 969-76.

- CHENG, G., BASHA, E., WYSOCKI, V. H. & VIERLING, E. 2008. Insights into small heat shock protein and substrate structure during chaperone action derived from hydrogen/deuterium exchange and mass spectrometry. *J Biol Chem*, 283, 26634-42.
- CHINTAPALLI, V. R., WANG, J. & DOW, J. A. 2007. Using FlyAtlas to identify better *Drosophila melanogaster* models of human disease. *Nat Genet*, 39, 715-20.
- CHOU, K. C. & SHEN, H. B. 2007. Euk-mPLOC: a fusion classifier for large-scale eukaryotic protein subcellular location prediction by incorporating multiple sites. *J Proteome Res*, 6, 1728-34.
- CHOU, K. C. & SHEN, H. B. 2008. Cell-PLOC: a package of Web servers for predicting subcellular localization of proteins in various organisms. *Nat Protoc*, 3, 153-62.
- CHOWDARY, T. K., RAMAN, B., RAMAKRISHNA, T. & RAO, C. M. 2004. Mammalian Hsp22 is a heat-inducible small heat-shock protein with chaperone-like activity. *Biochem J*, 381, 379-87.
- CIMDINS, A., KLINKERT, B., ASCHKE-SONNENBORN, U., KAISER, F. M., KORTMANN, J. & NARBERHAUS, F. 2014. Translational control of small heat shock genes in mesophilic and thermophilic cyanobacteria by RNA thermometers. *RNA Biol*, 11, 594-608.
- CLARK, A. R., NAYLOR, C. E., BAGNERIS, C., KEEP, N. H. & SLINGSBY, C. 2011. Crystal structure of R120G disease mutant of human alphaB-crystallin domain dimer shows closure of a groove. *J Mol Biol*, 408, 118-34.
- COBB, B. A. & PETRASH, J. M. 2000. Structural and functional changes in the alpha A-crystallin R116C mutant in hereditary cataracts. *Biochemistry*, 39, 15791-8.
- COLINET, H., LEE, S. F. & HOFFMANN, A. 2010a. Knocking down expression of Hsp22 and Hsp23 by RNA interference affects recovery from chill coma in *Drosophila melanogaster*. *J Exp Biol*, 213, 4146-50.
- COLINET, H., LEE, S. F. & HOFFMANN, A. 2010b. Temporal expression of heat shock genes during cold stress and recovery from chill coma in adult *Drosophila melanogaster*. *FEBS J*, 277, 174-85.
- COLINET, H., SIAUSSAT, D., BOZZOLAN, F. & BOWLER, K. 2013. Rapid decline of cold tolerance at young age is associated with expression of stress genes in *Drosophila melanogaster*. *J Exp Biol*, 216, 253-9.
- CRABBE, M. J. & GOODE, D. 1994. alpha-Crystallin: chaperoning and aggregation. *Biochem J*, 297 (Pt 3), 653-4.
- CRACK, J. A., MANSOUR, M., SUN, Y. & MACRAE, T. H. 2002. Functional analysis of a small heat shock/alpha-crystallin protein from *Artemia franciscana*. Oligomerization and thermotolerance. *Eur J Biochem*, 269, 933-42.
- CRAIG, E. A. & MCCARTHY, B. J. 1980. Four *Drosophila* heat shock genes at 67B: characterization of recombinant plasmids. *Nucleic Acids Res*, 8, 4441-57.
- CROOKS, G. E., HON, G., CHANDONIA, J. M. & BRENNER, S. E. 2004. WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res*, 14, 1188-90.
- DAS, K. P. & SUREWICZ, W. K. 1995. Temperature-induced exposure of hydrophobic surfaces and its effect on the chaperone activity of alpha-crystallin. *FEBS Lett*, 369, 321-5.

- DATSKEVICH, P. N., NEFEDOVA, V. V., SUDNITSYNA, M. V. & GUSEV, N. B. 2012. Mutations of small heat shock proteins and human congenital diseases. *Biochemistry (Mosc)*, 77, 1500-14.
- DATTA, S. A. & RAO, C. M. 1999. Differential temperature-dependent chaperone-like activity of alphaA- and alphaB-crystallin homoaggregates. *J Biol Chem*, 274, 34773-8.
- DE JONG, W. W., CASPERS, G. J. & LEUNISSEN, J. A. 1998. Genealogy of the alpha-crystallin--small heat-shock protein superfamily. *Int J Biol Macromol*, 22, 151-62.
- DE JONG, W. W., LEUNISSEN, J. A. & VOORTER, C. E. 1993. Evolution of the alpha-crystallin/small heat-shock protein family. *Mol Biol Evol*, 10, 103-26.
- DEL BIGIO, M. R., CHUDLEY, A. E., SARNAT, H. B., CAMPBELL, C., GOOBIE, S., CHODIRKER, B. N. & SELCEN, D. 2011. Infantile muscular dystrophy in Canadian aboriginals is an alphaB-crystallinopathy. *Ann Neurol*, 69, 866-71.
- DELBECQ, S. P., JEHLE, S. & KLEVIT, R. 2012. Binding determinants of the small heat shock protein, alphaB-crystallin: recognition of the 'Ixl' motif. *EMBO J*, 31, 4587-94.
- DELBECQ, S. P. & KLEVIT, R. E. 2013. One size does not fit all: the oligomeric states of alphaB crystallin. *FEBS Lett*, 587, 1073-80.
- DEN ENGELSMAN, J., BENNINK, E. J., DOERWALD, L., ONNEKINK, C., WUNDERINK, L., ANDLEY, U. P., KATO, K., DE JONG, W. W. & BOELEN, W. C. 2004. Mimicking phosphorylation of the small heat-shock protein alphaB-crystallin recruits the F-box protein FBX4 to nuclear SC35 speckles. *Eur J Biochem*, 271, 4195-203.
- DEN ENGELSMAN, J., VAN DE SCHOOTBRUGGE, C., YONG, J., PRUIJN, G. J. & BOELEN, W. C. 2013. Pseudophosphorylated alphaB-Crystallin Is a Nuclear Chaperone Imported into the Nucleus with Help of the SMN Complex. *PLoS One*, 8, e73489.
- DERHAM, B. K., ELLORY, J. C., BRON, A. J. & HARDING, J. J. 2003. The molecular chaperone alpha-crystallin incorporated into red cell ghosts protects membrane Na/K-ATPase against glycation and oxidative stress. *Eur J Biochem*, 270, 2605-11.
- DEVI, R. R., YAO, W., VIJAYALAKSHMI, P., SERGEEV, Y. V., SUNDARESAN, P. & HEJTMANCIK, J. F. 2008. Crystallin gene mutations in Indian families with inherited pediatric cataract. *Mol Vis*, 14, 1157-70.
- DOBSON, C. M. & KARPLUS, M. 1999. The fundamentals of protein folding: bringing together theory and experiment. *Curr Opin Struct Biol*, 9, 92-101.
- DUENNWALD, M. L., ECHEVERRIA, A. & SHORTER, J. 2012. Small heat shock proteins potentiate amyloid dissolution by protein disaggregases from yeast and humans. *PLoS Biol*, 10, e1001346.
- DURA, J. M. 1981. Stage dependent synthesis of heat shock induced proteins in early embryos of *Drosophila melanogaster*. *Mol Gen Genet*, 184, 381-5.
- ECHANIZ-LAGUNA, A., GEUENS, T., PETIOT, P., PEREON, Y., ADRIAENSSENS, E., HAIDAR, M., CAPPONI, S., MAISONOBE, T., FOURNIER, E., DUBOURG, O., DEGOS, B., SALACHAS, F., LENGLET, T., EYMARD, B., DELMONT, E., POUGET, J., MORALES, R., GOIZET, C., LATOUR, P., TIMMERMAN, V. & STOJKOVIC, T.

2017. Axonal Neuropathies due to Mutations in Small Heat Shock Proteins: Clinical, Genetic and Functional Insights into Novel Mutations. *Hum Mutat*.
- ECONOMOU, K., KOTSILITI, E. & MINTZAS, A. C. 2016. Stage and cell-specific expression and intracellular localization of the small heat shock protein Hsp27 during oogenesis and spermatogenesis in the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*. *J Insect Physiol*, 96, 64-72.
- EDGAR, R. C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res*, 32, 1792-7.
- EHRNSPERGER, M., GRABER, S., GAESTEL, M. & BUCHNER, J. 1997. Binding of non-native protein to Hsp25 during heat shock creates a reservoir of folding intermediates for reactivation. *EMBO J*, 16, 221-9.
- EHRNSPERGER, M., LILIE, H., GAESTEL, M. & BUCHNER, J. 1999. The dynamics of Hsp25 quaternary structure. Structure and function of different oligomeric species. *J Biol Chem*, 274, 14867-74.
- ELEFATHERIANOS, I. & CASTILLO, J. C. 2012. Molecular mechanisms of aging and immune system regulation in *Drosophila*. *Int J Mol Sci*, 13, 9826-44.
- ELLIS, R. J. 2001. Macromolecular crowding: obvious but underappreciated. *Trends Biochem Sci*, 26, 597-604.
- ELLIS, R. J. & MINTON, A. P. 2006. Protein aggregation in crowded environments. *Biol Chem*, 387, 485-97.
- ESTRADA, B., CHOE, S. E., GISSELBRECHT, S. S., MICHAUD, S., RAJ, L., BUSSER, B. W., HALFON, M. S., CHURCH, G. M. & MICHELSON, A. M. 2006. An integrated strategy for analyzing the unique developmental programs of different myoblast subtypes. *PLoS Genet*, 2, e16.
- EVGRAFOV, O. V., MERSIYANOVA, I., IROBI, J., VAN DEN BOSCH, L., DIERICK, I., LEUNG, C. L., SCHAGINA, O., VERPOORTEN, N., VAN IMPE, K., FEDOTOV, V., DADALI, E., AUER-GRUMBACH, M., WINDPASSINGER, C., WAGNER, K., MITROVIC, Z., HILTON-JONES, D., TALBOT, K., MARTIN, J. J., VASSERMAN, N., TVERSKAYA, S., POLYAKOV, A., LIEM, R. K., GETTEMANS, J., ROBBERECHT, W., DE JONGHE, P. & TIMMERMAN, V. 2004. Mutant small heat-shock protein 27 causes axonal Charcot-Marie-Tooth disease and distal hereditary motor neuropathy. *Nat Genet*, 36, 602-6.
- EYLES, S. J. & GIERASCH, L. M. 2010. Nature's molecular sponges: small heat shock proteins grow into their chaperone roles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 2727-8.
- FEIL, I. K., MALFOIS, M., HENDLE, J., VAN DER ZANDT, H. & SVERGUN, D. I. 2001. A novel quaternary structure of the dimeric alpha-crystallin domain with chaperone-like activity. *J Biol Chem*, 276, 12024-9.
- FICARRO, S. B., MCCLELAND, M. L., STUKENBERG, P. T., BURKE, D. J., ROSS, M. M., SHABANOWITZ, J., HUNT, D. F. & WHITE, F. M. 2002. Phosphoproteome analysis by mass spectrometry and its application to *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Biotechnol*, 20, 301-5.
- FICHNA, J. P., POTULSKA-CHROMIK, A., MISZTA, P., REDOWICZ, M. J., KAMINSKA, A. M., ZEKANOWSKI, C. & FILIPEK, S. 2017. A novel dominant D109A CRYAB mutation in a family with myofibrillar myopathy affects alphaB-crystallin structure. *BBA Clin*, 7, 1-7.

- FINK, A. L. 1999. Chaperone-mediated protein folding. *Physiol Rev*, 79, 425-49.
- FINN, R. D., BATEMAN, A., CLEMENTS, J., COGGILL, P., EBERHARDT, R. Y., EDDY, S. R., HEGER, A., HETHERINGTON, K., HOLM, L., MISTRY, J., SONNHAMMER, E. L., TATE, J. & PUNTA, M. 2014. Pfam: the protein families database. *Nucleic Acids Res*, 42, D222-30.
- FINN, R. D., CLEMENTS, J. & EDDY, S. R. 2011. HMMER web server: interactive sequence similarity searching. *Nucleic Acids Res*, 39, W29-37.
- FISHER, K. H., DEANE, C. M. & WAKEFIELD, J. G. 2008. The functional domain grouping of microtubule associated proteins. *Commun Integr Biol*, 1, 47-50.
- FORREST, K. M., AL-SARRAJ, S., SEWRY, C., BUK, S., TAN, S. V., PITT, M., DURWARD, A., MCDUGALL, M., IRVING, M., HANNA, M. G., MATTHEWS, E., SARKOZY, A., HUDSON, J., BARRESI, R., BUSHBY, K., JUNGBLUTH, H. & WRAIGE, E. 2011. Infantile onset myofibrillar myopathy due to recessive CRYAB mutations. *Neuromuscul Disord*, 21, 37-40.
- FRANCO, M., SEYFRIED, N. T., BRAND, A. H., PENG, J. & MAYOR, U. 2011. A novel strategy to isolate ubiquitin conjugates reveals wide role for ubiquitination during neural development. *Mol Cell Proteomics*, 10, M110 002188.
- FRANZMANN, T. M., MENHORN, P., WALTER, S. & BUCHNER, J. 2008. Activation of the chaperone Hsp26 is controlled by the rearrangement of its thermosensor domain. *Mol Cell*, 29, 207-16.
- FRYDMAN, J. 2001. Folding of newly translated proteins in vivo: the role of molecular chaperones. *Annu Rev Biochem*, 70, 603-47.
- FU, X. 2014. Chaperone function and mechanism of small heat-shock proteins. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 46, 347-56.
- FU, X., JIAO, W. & CHANG, Z. 2006. Phylogenetic and biochemical studies reveal a potential evolutionary origin of small heat shock proteins of animals from bacterial class A. *J Mol Evol*, 62, 257-66.
- FU, X., SHI, X., YAN, L., ZHANG, H. & CHANG, Z. 2013. In vivo substrate diversity and preference of small heat shock protein IbpB as revealed by using a genetically incorporated photo-cross-linker. *J Biol Chem*, 288, 31646-54.
- FU, X., ZHANG, H., ZHANG, X., CAO, Y., JIAO, W., LIU, C., SONG, Y., ABULIMITI, A. & CHANG, Z. 2005. A dual role for the N-terminal region of Mycobacterium tuberculosis Hsp16.3 in self-oligomerization and binding denaturing substrate proteins. *J Biol Chem*, 280, 6337-48.
- GARRIDO, C., PAUL, C., SEIGNEURIC, R. & KAMPINGA, H. H. 2012. The small heat shock proteins family: the long forgotten chaperones. *Int J Biochem Cell Biol*, 44, 1588-92.
- GEIGER-THORNSBERRY, G. L. & MACKAY, T. F. 2004. Quantitative trait loci affecting natural variation in *Drosophila* longevity. *Mech Ageing Dev*, 125, 179-89.
- GENTIL, B. J. & COOPER, L. 2012. Molecular basis of axonal dysfunction and traffic impairments in CMT. *Brain Res Bull*, 88, 444-53.
- GHAOUI, R., PALMIO, J., BREWER, J., LEK, M., NEEDHAM, M., EVILA, A., HACKMAN, P., JONSON, P. H., PENTTILA, S., VIHOLA, A., HUOVINEN, S., LINDFORS, M., DAVIS, R. L., WADDELL, L., KAUR, S., YIANNIKAS, C., NORTH, K., CLARKE, N., MACARTHUR, D. G., SUE, C. M. & UDD, B. 2016. Mutations in HSPB8 causing a

- new phenotype of distal myopathy and motor neuropathy. *Neurology*, 86, 391-8.
- GHOSH, J. G., HOUCK, S. A. & CLARK, J. I. 2007a. Interactive domains in the molecular chaperone human alphaB crystallin modulate microtubule assembly and disassembly. *PLoS One*, 2, e498.
- GHOSH, J. G., SHENOY, A. K., JR. & CLARK, J. I. 2006. N- and C-Terminal motifs in human alphaB crystallin play an important role in the recognition, selection, and solubilization of substrates. *Biochemistry*, 45, 13847-54.
- GHOSH, J. G., SHENOY, A. K., JR. & CLARK, J. I. 2007b. Interactions between important regulatory proteins and human alphaB crystallin. *Biochemistry*, 46, 6308-17.
- GIESE, K. C., BASHA, E., CATAGUE, B. Y. & VIERLING, E. 2005. Evidence for an essential function of the N terminus of a small heat shock protein in vivo, independent of in vitro chaperone activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 18896-901.
- GIESE, K. C. & VIERLING, E. 2002. Changes in oligomerization are essential for the chaperone activity of a small heat shock protein in vivo and in vitro. *J Biol Chem*, 277, 46310-8.
- GIOT, L., BADER, J. S., BROUWER, C., CHAUDHURI, A., KUANG, B., LI, Y., HAO, Y. L., OOI, C. E., GODWIN, B., VITOLS, E., VIJAYADAMODAR, G., POCHART, P., MACHINENI, H., WELSH, M., KONG, Y., ZERHUSEN, B., MALCOLM, R., VARRONE, Z., COLLIS, A., MINTO, M., BURGESS, S., MCDANIEL, L., STIMPSON, E., SPRIGGS, F., WILLIAMS, J., NEURATH, K., IOIME, N., AGEE, M., VOSS, E., FURTAK, K., RENZULLI, R., AANENSEN, N., CARROLLA, S., BICKELHAUPT, E., LAZOVATSKY, Y., DASILVA, A., ZHONG, J., STANYON, C. A., FINLEY, R. L., JR., WHITE, K. P., BRAVERMAN, M., JARVIE, T., GOLD, S., LEACH, M., KNIGHT, J., SHIMKETS, R. A., MCKENNA, M. P., CHANT, J. & ROTHBERG, J. M. 2003. A protein interaction map of *Drosophila melanogaster*. *Science*, 302, 1727-36.
- GOLDSTEIN, L. S. & GUNAWARDENA, S. 2000. Flying through the drosophila cytoskeletal genome. *J Cell Biol*, 150, F63-8.
- GONG, L., PURI, M., UNLU, M., YOUNG, M., ROBERTSON, K., VISWANATHAN, S., KRISHNASWAMY, A., DOWD, S. R. & MINDEN, J. S. 2004. *Drosophila* ventral furrow morphogenesis: a proteomic analysis. *Development*, 131, 643-56.
- GORLICH, D. 1997. Nuclear protein import. *Curr Opin Cell Biol*, 9, 412-9.
- GRAW, J., KLOPP, N., ILLIG, T., PREISING, M. N. & LORENZ, B. 2006. Congenital cataract and macular hypoplasia in humans associated with a de novo mutation in CRYAA and compound heterozygous mutations in P. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 244, 912-9.
- GU, F., LUO, W., LI, X., WANG, Z., LU, S., ZHANG, M., ZHAO, B., ZHU, S., FENG, S., YAN, Y. B., HUANG, S. & MA, X. 2008. A novel mutation in AlphaA-crystallin (CRYAA) caused autosomal dominant congenital cataract in a large Chinese family. *Hum Mutat*, 29, 769.
- GUPTA, R. & SRIVASTAVA, O. P. 2004. Deamidation affects structural and functional properties of human alphaA-crystallin and its oligomerization with alphaB-crystallin. *J Biol Chem*, 279, 44258-69.
- GURUHARSHA, K. G., RUAL, J. F., ZHAI, B., MINTSERIS, J., VAIDYA, P., VAIDYA, N., BEEKMAN, C., WONG, C., RHEE, D. Y., CENAJ, O., MCKILLIP, E., SHAH, S.,

- STAPLETON, M., WAN, K. H., YU, C., PARSA, B., CARLSON, J. W., CHEN, X., KAPADIA, B., VIJAYRAGHAVAN, K., GYGI, S. P., CELNIKER, S. E., OBAR, R. A. & ARTAVANIS-TSAKONAS, S. 2011. A protein complex network of *Drosophila melanogaster*. *Cell*, 147, 690-703.
- HANAZONO, Y., TAKEDA, K., OKA, T., ABE, T., TOMONARI, T., AKIYAMA, N., AIKAWA, Y., YOHDA, M. & MIKI, K. 2013. Nonequivalence observed for the 16-meric structure of a small heat shock protein, SpHsp16.0, from *Schizosaccharomyces pombe*. *Structure*, 21, 220-8.
- HANDLER, D., OLIVIERI, D., NOVATCHKOVA, M., GRUBER, F. S., MEIXNER, K., MECHTLER, K., STARK, A., SACHIDANANDAM, R. & BRENNECKE, J. 2011. A systematic analysis of *Drosophila* TUDOR domain-containing proteins identifies Vreteno and the Tdrd12 family as essential primary piRNA pathway factors. *EMBO J*, 30, 3977-93.
- HANSEN, L., YAO, W., EIBERG, H., KJAER, K. W., BAGGESEN, K., HEJTMANCIK, J. F. & ROSENBERG, T. 2007. Genetic heterogeneity in microcornea-cataract: five novel mutations in CRYAA, CRYGD, and GJA8. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 48, 3937-44.
- HAO, X., ZHANG, S., TIMAKOV, B. & ZHANG, P. 2007. The Hsp27 gene is not required for *Drosophila* development but its activity is associated with starvation resistance. *Cell Stress Chaperones*, 12, 364-72.
- HARTL, F. U., BRACHER, A. & HAYER-HARTL, M. 2011. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature*, 475, 324-32.
- HASLBECK, M., BRAUN, N., STROMER, T., RICHTER, B., MODEL, N., WEINKAUF, S. & BUCHNER, J. 2004a. Hsp42 is the general small heat shock protein in the cytosol of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J*, 23, 638-49.
- HASLBECK, M., FRANZMANN, T., WEINFURTNER, D. & BUCHNER, J. 2005a. Some like it hot: the structure and function of small heat-shock proteins. *Nat Struct Mol Biol*, 12, 842-6.
- HASLBECK, M., IGNATIOU, A., SAIBIL, H., HELMICH, S., FRENZL, E., STROMER, T. & BUCHNER, J. 2004b. A domain in the N-terminal part of Hsp26 is essential for chaperone function and oligomerization. *J Mol Biol*, 343, 445-55.
- HASLBECK, M., KASTENMULLER, A., BUCHNER, J., WEINKAUF, S. & BRAUN, N. 2008. Structural dynamics of archaeal small heat shock proteins. *J Mol Biol*, 378, 362-74.
- HASLBECK, M., MIESS, A., STROMER, T., WALTER, S. & BUCHNER, J. 2005b. Disassembling protein aggregates in the yeast cytosol. The cooperation of Hsp26 with Ssa1 and Hsp104. *J Biol Chem*, 280, 23861-8.
- HASLBECK, M., PESCHEK, J., BUCHNER, J. & WEINKAUF, S. 2016. Structure and function of alpha-crystallins: Traversing from in vitro to in vivo. *Biochim Biophys Acta*, 1860, 149-66.
- HASLBECK, M. & VIERLING, E. 2015. A first line of stress defense: small heat shock proteins and their function in protein homeostasis. *J Mol Biol*, 427, 1537-48.
- HASLBECK, M., WALKE, S., STROMER, T., EHRNSPERGER, M., WHITE, H. E., CHEN, S., SAIBIL, H. R. & BUCHNER, J. 1999. Hsp26: a temperature-regulated chaperone. *EMBO J*, 18, 6744-51.

- HASLBECK, M., WEINKAUF, S. & BUCHNER, J. 2015. Regulation of the Chaperone Function of Small Hsps. *In: TANGUAY, R. M. & HIGHTOWER, L. E. (eds.) The Big Book on Small Heat Shock Proteins*. Springer International Publishing.
- HAVASI, A., LI, Z., WANG, Z., MARTIN, J. L., BOTLA, V., RUCHALSKI, K., SCHWARTZ, J. H. & BORKAN, S. C. 2008. Hsp27 inhibits Bax activation and apoptosis via a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanism. *J Biol Chem*, 283, 12305-13.
- HAYES, D., NAPOLI, V., MAZURKIE, A., STAFFORD, W. F. & GRACEFFA, P. 2009. Phosphorylation dependence of hsp27 multimeric size and molecular chaperone function. *J Biol Chem*, 284, 18801-7.
- HEIRBAUT, M., BEELEN, S., STRELKOV, S. V. & WEEKS, S. D. 2014. Dissecting the functional role of the N-terminal domain of the human small heat shock protein HSPB6. *PLoS One*, 9, e105892.
- HEIRBAUT, M., LERMYTE, F., MARTIN, E. M., BEELEN, S., VERSCHUEREN, T., SOBOTT, F., STRELKOV, S. V. & WEEKS, S. D. 2016. The preferential heterodimerization of human small heat shock proteins HSPB1 and HSPB6 is dictated by the N-terminal domain. *Arch Biochem Biophys*, 610, 41-50.
- HEIRBAUT, M., STRELKOV, S. V. & WEEKS, S. D. 2015. Everything but the ACD, Functional Conservation of the Non-conserved Terminal Regions in sHSPs. *In: TANGUAY, M. R. & HIGHTOWER, E. L. (eds.) The Big Book on Small Heat Shock Proteins*. Cham: Springer International Publishing.
- HOCHBERG, G. K., ECROYD, H., LIU, C., COX, D., CASCIO, D., SAWAYA, M. R., COLLIER, M. P., STROUD, J., CARVER, J. A., BALDWIN, A. J., ROBINSON, C. V., EISENBERG, D. S., BENESCH, J. L. & LAGANOWSKY, A. 2014. The structured core domain of alphaB-crystallin can prevent amyloid fibrillation and associated toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111, E1562-70.
- HOLMGREN, A. 1979. Thioredoxin catalyzes the reduction of insulin disulfides by dithiothreitol and dihydrolipoamide. *J Biol Chem*, 254, 9627-32.
- HORWITZ, J. 1992. Alpha-crystallin can function as a molecular chaperone. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 10449-53.
- HORWITZ, J., BOVA, M., HUANG, Q. L., DING, L., YARON, O. & LOWMAN, S. 1998. Mutation of alpha B-crystallin: effects on chaperone-like activity. *Int J Biol Macromol*, 22, 263-9.
- HOULDEN, H., LAURA, M., WAVRANT-DE VRIEZE, F., BLAKE, J., WOOD, N. & REILLY, M. M. 2008. Mutations in the HSP27 (HSPB1) gene cause dominant, recessive, and sporadic distal HMN/CMT type 2. *Neurology*, 71, 1660-8.
- HUGHES, J. R., MEIRELES, A. M., FISHER, K. H., GARCIA, A., ANTROBUS, P. R., WAINMAN, A., ZITZMANN, N., DEANE, C., OHKURA, H. & WAKEFIELD, J. G. 2008. A microtubule interactome: complexes with roles in cell cycle and mitosis. *PLoS Biol*, 6, e98.
- HUOT, J., HOULE, F., SPITZ, D. R. & LANDRY, J. 1996. HSP27 phosphorylation-mediated resistance against actin fragmentation and cell death induced by oxidative stress. *Cancer Res*, 56, 273-9.
- IKEDA, Y., ABE, A., ISHIDA, C., TAKAHASHI, K., HAYASAKA, K. & YAMADA, M. 2009. A clinical phenotype of distal hereditary motor neuropathy type II with a novel HSPB1 mutation. *J Neurol Sci*, 277, 9-12.

- INAGAKI, N., HAYASHI, T., ARIMURA, T., KOGA, Y., TAKAHASHI, M., SHIBATA, H., TERAOKA, K., CHIKAMORI, T., YAMASHINA, A. & KIMURA, A. 2006. Alpha B-crystallin mutation in dilated cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun*, 342, 379-86.
- INGOLIA, T. D. & CRAIG, E. A. 1982. Four small Drosophila heat shock proteins are related to each other and to mammalian alpha-crystallin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 79, 2360-4.
- IROBI, J., VAN IMPE, K., SEEMAN, P., JORDANOVA, A., DIERICK, I., VERPOORTEN, N., MICHALIK, A., DE VRIENDT, E., JACOBS, A., VAN GERWEN, V., VENNEKENS, K., MAZANEC, R., TOURNEV, I., HILTON-JONES, D., TALBOT, K., KREMENSKY, I., VAN DEN BOSCH, L., ROBBERECHT, W., VAN VANDEKERCKHOVE, J., VAN BROECKHOVEN, C., GETTEMANS, J., DE JONGHE, P. & TIMMERMAN, V. 2004. Hot-spot residue in small heat-shock protein 22 causes distal motor neuropathy. *Nat Genet*, 36, 597-601.
- ITO, H., KAMEI, K., IWAMOTO, I., INAGUMA, Y., NOHARA, D. & KATO, K. 2001. Phosphorylation-induced change of the oligomerization state of alpha B-crystallin. *J Biol Chem*, 276, 5346-52.
- JAENICKE, R. 1987. Folding and association of proteins. *Prog Biophys Mol Biol*, 49, 117-237.
- JAKOB, U., GAESTEL, M., ENGEL, K. & BUCHNER, J. 1993. Small heat shock proteins are molecular chaperones. *J Biol Chem*, 268, 1517-20.
- JAMES, P. A., RANKIN, J. & TALBOT, K. 2008. Asymmetrical late onset motor neuropathy associated with a novel mutation in the small heat shock protein HSPB1 (HSP27). *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 79, 461-3.
- JAYA, N., GARCIA, V. & VIERLING, E. 2009. Substrate binding site flexibility of the small heat shock protein molecular chaperones. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 15604-9.
- JEHLE, S., VAN ROSSUM, B., STOUT, J. R., NOGUCHI, S. M., FALBER, K., REHBEIN, K., OSCHKINAT, H., KLEVIT, R. E. & RAJAGOPAL, P. 2009. alphaB-crystallin: a hybrid solid-state/solution-state NMR investigation reveals structural aspects of the heterogeneous oligomer. *J Mol Biol*, 385, 1481-97.
- JEHLE, S., VOLLMAR, B. S., BARDIAUX, B., DOVE, K. K., RAJAGOPAL, P., GONEN, T., OSCHKINAT, H. & KLEVIT, R. E. 2011. N-terminal domain of alphaB-crystallin provides a conformational switch for multimerization and structural heterogeneity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 6409-14.
- JIAO, W., QIAN, M., LI, P., ZHAO, L. & CHANG, Z. 2005. The essential role of the flexible termini in the temperature-responsiveness of the oligomeric state and chaperone-like activity for the polydisperse small heat shock protein IbpB from Escherichia coli. *J Mol Biol*, 347, 871-84.
- JOANISSE, D. R., INAGUMA, Y. & TANGUAY, R. M. 1998. Cloning and developmental expression of a nuclear ubiquitin-conjugating enzyme (DmUbc9) that interacts with small heat shock proteins in Drosophila melanogaster. *Biochem Biophys Res Commun*, 244, 102-9.
- KALLAPPAGOUDAR, S., VARMA, P., PATHAK, R. U., SENTHILKUMAR, R. & MISHRA, R. K. 2010. Nuclear matrix proteome analysis of Drosophila melanogaster. *Mol Cell Proteomics*, 9, 2005-18.

- KANG, H., MCELROY, K. A., JUNG, Y. L., ALEKSEYENKO, A. A., ZEE, B. M., PARK, P. J. & KURODA, M. I. 2015. Sex comb on midleg (Scm) is a functional link between PcG-repressive complexes in *Drosophila*. *Genes Dev*, 29, 1136-50.
- KAPELNIKOV, A., ZELINGER, E., GOTTLIEB, Y., RHRISSORRAKRAI, K., GUNSALUS, K. C. & HEIFETZ, Y. 2008. Mating induces an immune response and developmental switch in the *Drosophila* oviduct. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 13912-7.
- KAPPE, G., BOELEN, W. C. & DE JONG, W. W. 2010. Why proteins without an alpha-crystallin domain should not be included in the human small heat shock protein family HSPB. *Cell Stress Chaperones*, 15, 457-61.
- KAPPE, G., LEUNISSEN, J. A. & DE JONG, W. W. 2002. Evolution and diversity of prokaryotic small heat shock proteins. *Prog Mol Subcell Biol*, 28, 1-17.
- KATO, K., HASEGAWA, K., GOTO, S. & INAGUMA, Y. 1994. Dissociation as a result of phosphorylation of an aggregated form of the small stress protein, hsp27. *J Biol Chem*, 269, 11274-8.
- KEDERSHA, N. L., GUPTA, M., LI, W., MILLER, I. & ANDERSON, P. 1999. RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 alpha to the assembly of mammalian stress granules. *J Cell Biol*, 147, 1431-42.
- KELLEY, P. B. & ABRAHAM, E. C. 2003. Thermally induced disintegration of the oligomeric structure of alphaB-crystallin mutant F28S is associated with diminished chaperone activity. *Mol Cell Biochem*, 252, 273-8.
- KHAN, A. O., ABU SAFIEH, L. & ALKURAYA, F. S. 2010. Later retinal degeneration following childhood surgical aphakia in a family with recessive CRYAB mutation (p.R56W). *Ophthalmic Genet*, 31, 30-6.
- KIM, K. K., KIM, R. & KIM, S. H. 1998. Crystal structure of a small heat-shock protein. *Nature*, 394, 595-9.
- KIM, R., LAI, L., LEE, H. H., CHEONG, G. W., KIM, K. K., WU, Z., YOKOTA, H., MARQUSEE, S. & KIM, S. H. 2003. On the mechanism of chaperone activity of the small heat-shock protein of *Methanococcus jannaschii*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 8151-5.
- KINGSOLVER, M. B., HUANG, Z. & HARDY, R. W. 2013. Insect antiviral innate immunity: pathways, effectors, and connections. *J Mol Biol*, 425, 4921-36.
- KLOETZEL, P. M. & BAUTZ, E. K. 1983. Heat-shock proteins are associated with hnRNA in *Drosophila melanogaster* tissue culture cells. *EMBO J*, 2, 705-10.
- KOLB, S. J., SNYDER, P. J., POI, E. J., RENARD, E. A., BARTLETT, A., GU, S., SUTTON, S., ARNOLD, W. D., FREIMER, M. L., LAWSON, V. H., KISSEL, J. T. & PRIOR, T. W. 2010. Mutant small heat shock protein B3 causes motor neuropathy: utility of a candidate gene approach. *Neurology*, 74, 502-6.
- KOSTENKO, S. & MOENS, U. 2009. Heat shock protein 27 phosphorylation: kinases, phosphatases, functions and pathology. *Cell Mol Life Sci*, 66, 3289-307.
- KRAJEWSKI, S. S., JOSWIG, M., NAGEL, M. & NARBERHAUS, F. 2014. A tricistronic heat shock operon is important for stress tolerance of *Pseudomonas putida* and conserved in many environmental bacteria. *Environ Microbiol*, 16, 1835-53.

- KRIEHLUBER, T., RATTEI, T., WEINMAIER, T., BEPPERLING, A., HASLBECK, M. & BUCHNER, J. 2010. Independent evolution of the core domain and its flanking sequences in small heat shock proteins. *FASEB J*, 24, 3633-42.
- KUMAR, L. V., RAMAKRISHNA, T. & RAO, C. M. 1999. Structural and functional consequences of the mutation of a conserved arginine residue in alphaA and alphaB crystallins. *J Biol Chem*, 274, 24137-41.
- KUNDU, M., SEN, P. C. & DAS, K. P. 2007. Structure, stability, and chaperone function of alphaA-crystallin: role of N-terminal region. *Biopolymers*, 86, 177-92.
- KURAPATI, R., PASSANANTI, H. B., ROSE, M. R. & TOWER, J. 2000. Increased hsp22 RNA levels in *Drosophila* lines genetically selected for increased longevity. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 55, B552-9.
- LAGANOWSKY, A., BENESCH, J. L., LANDAU, M., DING, L., SAWAYA, M. R., CASCIO, D., HUANG, Q., ROBINSON, C. V., HORWITZ, J. & EISENBERG, D. 2010. Crystal structures of truncated alphaA and alphaB crystallins reveal structural mechanisms of polydispersity important for eye lens function. *Protein Sci*, 19, 1031-43.
- LAMBERT, H., CHARETTE, S. J., BERNIER, A. F., GUIMOND, A. & LANDRY, J. 1999. HSP27 multimerization mediated by phosphorylation-sensitive intermolecular interactions at the amino terminus. *J Biol Chem*, 274, 9378-85.
- LAMBERT, W., RUTSDOTTIR, G., HUSSEIN, R., BERNFUR, K., KJELLSTROM, S. & EMANUELSSON, C. 2013. Probing the transient interaction between the small heat-shock protein Hsp21 and a model substrate protein using crosslinking mass spectrometry. *Cell Stress Chaperones*, 18, 75-85.
- LANDIS, G., SHEN, J. & TOWER, J. 2012. Gene expression changes in response to aging compared to heat stress, oxidative stress and ionizing radiation in *Drosophila melanogaster*. *Aging (Albany NY)*, 4, 768-89.
- LASKOWSKI, R. A., MACARTHUR, M. W., MOSS, D. S. & THORNTON, J. M. 1993. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of Applied Crystallography*, 26, 283-291.
- LAVOIE, J. N., GINGRAS-BRETON, G., TANGUAY, R. M. & LANDRY, J. 1993a. Induction of Chinese hamster HSP27 gene expression in mouse cells confers resistance to heat shock. HSP27 stabilization of the microfilament organization. *J Biol Chem*, 268, 3420-9.
- LAVOIE, J. N., HICKEY, E., WEBER, L. A. & LANDRY, J. 1993b. Modulation of actin microfilament dynamics and fluid phase pinocytosis by phosphorylation of heat shock protein 27. *J Biol Chem*, 268, 24210-4.
- LAVOIE, J. N., LAMBERT, H., HICKEY, E., WEBER, L. A. & LANDRY, J. 1995. Modulation of cellular thermoresistance and actin filament stability accompanies phosphorylation-induced changes in the oligomeric structure of heat shock protein 27. *Mol Cell Biol*, 15, 505-16.
- LEE, G. J., POKALA, N. & VIERLING, E. 1995. Structure and in vitro molecular chaperone activity of cytosolic small heat shock proteins from pea. *J Biol Chem*, 270, 10432-8.
- LEE, G. J., ROSEMAN, A. M., SAIBIL, H. R. & VIERLING, E. 1997. A small heat shock protein stably binds heat-denatured model substrates and can maintain a substrate in a folding-competent state. *EMBO J*, 16, 659-71.

- LEE, G. J. & VIERLING, E. 2000. A small heat shock protein cooperates with heat shock protein 70 systems to reactivate a heat-denatured protein. *Plant Physiol*, 122, 189-98.
- LEE, U., WIE, C., ESCOBAR, M., WILLIAMS, B., HONG, S. W. & VIERLING, E. 2005. Genetic analysis reveals domain interactions of Arabidopsis Hsp100/ClpB and cooperation with the small heat shock protein chaperone system. *Plant Cell*, 17, 559-71.
- LEEMANS, R., EGGER, B., LOOP, T., KAMMERMEIER, L., HE, H., HARTMANN, B., CERTA, U., HIRTH, F. & REICHERT, H. 2000. Quantitative transcript imaging in normal and heat-shocked Drosophila embryos by using high-density oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 12138-43.
- LELJ-GAROLLA, B. & MAUK, A. G. 2006. Self-association and chaperone activity of Hsp27 are thermally activated. *J Biol Chem*, 281, 8169-74.
- LELJ-GAROLLA, B. & MAUK, A. G. 2012. Roles of the N- and C-terminal sequences in Hsp27 self-association and chaperone activity. *Protein Sci*, 21, 122-33.
- LENTZE, N., AQUILINA, J. A., LINDBAUER, M., ROBINSON, C. V. & NARBERHAUS, F. 2004. Temperature and concentration-controlled dynamics of rhizobial small heat shock proteins. *Eur J Biochem*, 271, 2494-503.
- LENTZE, N. & NARBERHAUS, F. 2004. Detection of oligomerisation and substrate recognition sites of small heat shock proteins by peptide arrays. *Biochem Biophys Res Commun*, 325, 401-7.
- LENTZE, N., STUDER, S. & NARBERHAUS, F. 2003. Structural and functional defects caused by point mutations in the alpha-crystallin domain of a bacterial alpha-heat shock protein. *J Mol Biol*, 328, 927-37.
- LEROUX, M. R., MELKI, R., GORDON, B., BATELIER, G. & CANDIDO, E. P. 1997. Structure-function studies on small heat shock protein oligomeric assembly and interaction with unfolded polypeptides. *J Biol Chem*, 272, 24646-56.
- LEWIS-SMITH, D. J., DUFF, J., PYLE, A., GRIFFIN, H., POLVIKOSKI, T., BIRCHALL, D., HORVATH, R. & CHINNERY, P. F. 2016. Novel HSPB1 mutation causes both motor neuronopathy and distal myopathy. *Neurol Genet*, 2, e110.
- LI, H., LI, C., LU, Q., SU, T., KE, T., LI, D. W., YUAN, M., LIU, J., REN, X., ZHANG, Z., ZENG, S., WANG, Q. K. & LIU, M. 2008. Cataract mutation P20S of alphaB-crystallin impairs chaperone activity of alphaA-crystallin and induces apoptosis of human lens epithelial cells. *Biochim Biophys Acta*, 1782, 303-9.
- LI, H. F. & ZHANG, H. L. 2012. Elevated HSP27 levels during attacks in patients with multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand*, 126, e8-9.
- LIANG, P. & MACRAE, T. H. 1999. The synthesis of a small heat shock/alpha-crystallin protein in Artemia and its relationship to stress tolerance during development. *Dev Biol*, 207, 445-56.
- LIAO, P. C., LIN, H. Y., YUH, C. H., YU, L. K. & WANG, H. D. 2008. The effect of neuronal expression of heat shock proteins 26 and 27 on lifespan, neurodegeneration, and apoptosis in Drosophila. *Biochem Biophys Res Commun*, 376, 637-41.
- LIN, K. P., SOONG, B. W., YANG, C. C., HUANG, L. W., CHANG, M. H., LEE, I. H., ANTONELLIS, A. & LEE, Y. C. 2011. The mutational spectrum in a cohort of Charcot-Marie-Tooth disease type 2 among the Han Chinese in Taiwan. *PLoS One*, 6, e29393.

- LINDNER, R. A., KAPUR, A., MARIANI, M., TITMUSS, S. J. & CARVER, J. A. 1998. Structural alterations of alpha-crystallin during its chaperone action. *Eur J Biochem*, 258, 170-83.
- LINDQUIST, S. 1986. The heat-shock response. *Annu Rev Biochem*, 55, 1151-91.
- LITT, M., KRAMER, P., LAMORTICELLA, D. M., MURPHEY, W., LOVRIEN, E. W. & WELEBER, R. G. 1998. Autosomal dominant congenital cataract associated with a missense mutation in the human alpha crystallin gene CRYAA. *Hum Mol Genet*, 7, 471-4.
- LIU, R., WOOLNER, S., JOHNDROW, J. E., METZGER, D., FLORES, A. & PARKHURST, S. M. 2008. Sisyphus, the Drosophila myosin XV homolog, traffics within filopodia transporting key sensory and adhesion cargos. *Development*, 135, 53-63.
- LIU, Y., ZHANG, X., LUO, L., WU, M., ZENG, R., CHENG, G., HU, B., LIU, B., LIANG, J. J. & SHANG, F. 2006. A novel alphaB-crystallin mutation associated with autosomal dominant congenital lamellar cataract. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 47, 1069-75.
- LUIGETTI, M., FABRIZI, G. M., MADIA, F., FERRARINI, M., CONTE, A., DEL GRANDE, A., TASCIA, G., TONALI, P. A. & SABATELLI, M. 2010. A novel HSPB1 mutation in an Italian patient with CMT2/dHMN phenotype. *J Neurol Sci*, 298, 114-7.
- LUND, A. A., RHOADS, D. M., LUND, A. L., CERNY, R. L. & ELTHON, T. E. 2001. In vivo modifications of the maize mitochondrial small heat stress protein, HSP22. *J Biol Chem*, 276, 29924-9.
- MAAROUFI, H. & TANGUAY, R. M. 2013. Analysis and phylogeny of small heat shock proteins from marine viruses and their cyanobacteria host. *PLoS One*, 8, e81207.
- MACARIO, A. J. & CONWAY DE MACARIO, E. 2005. Sick chaperones, cellular stress, and disease. *N Engl J Med*, 353, 1489-501.
- MACKAY, D. S., ANDLEY, U. P. & SHIELS, A. 2003. Cell death triggered by a novel mutation in the alphaA-crystallin gene underlies autosomal dominant cataract linked to chromosome 21q. *Eur J Hum Genet*, 11, 784-93.
- MANDICH, P., GRANDIS, M., VARESE, A., GEROLDI, A., ACQUAVIVA, M., CIOTTI, P., GULLI, R., DORIA-LAMBA, L., FABRIZI, G. M., GIRIBALDI, G., PIZZUTI, A., SCHENONE, A. & BELLONE, E. 2010. Severe neuropathy after diphtheria-tetanus-pertussis vaccination in a child carrying a novel frame-shift mutation in the small heat-shock protein 27 gene. *J Child Neurol*, 25, 107-9.
- MANI, N., BHANDARI, S., MORENO, R., HU, L., PRASAD, B. V. & SUGUNA, K. 2016. Multiple oligomeric structures of a bacterial small heat shock protein. *Sci Rep*, 6, 24019.
- MAO, Y. W., LIU, J. P., XIANG, H. & LI, D. W. 2004. Human alphaA- and alphaB-crystallins bind to Bax and Bcl-X(S) to sequester their translocation during staurosporine-induced apoptosis. *Cell Death Differ*, 11, 512-26.
- MARIN, R., DEMERS, M. & TANGUAY, R. M. 1996a. Cell-specific heat-shock induction of Hsp23 in the eye of Drosophila melanogaster. *Cell Stress Chaperones*, 1, 40-6.

- MARIN, R., LANDRY, J. & TANGUAY, R. M. 1996b. Tissue-specific posttranslational modification of the small heat shock protein HSP27 in *Drosophila*. *Exp Cell Res*, 223, 1-8.
- MARIN, R. & TANGUAY, R. M. 1996. Stage-specific localization of the small heat shock protein Hsp27 during oogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma*, 105, 142-149.
- MARIN, R., VALET, J. P. & TANGUAY, R. M. 1993. hsp23 and hsp26 exhibit distinct spatial and temporal patterns of constitutive expression in *Drosophila* adults. *Dev Genet*, 14, 69-77.
- MARYGOLD, S. J., CROSBY, M. A., GOODMAN, J. L. & FLYBASE, C. 2016. Using FlyBase, a Database of *Drosophila* Genes and Genomes. *Methods Mol Biol*, 1478, 1-31.
- MCDONALD, E. T., BORTOLUS, M., KOTEICHE, H. A. & MCHAOURAB, H. S. 2012. Sequence, structure, and dynamic determinants of Hsp27 (HspB1) equilibrium dissociation are encoded by the N-terminal domain. *Biochemistry*, 51, 1257-68.
- MCGRAW, L. A., CLARK, A. G. & WOLFNER, M. F. 2008. Post-mating gene expression profiles of female *Drosophila melanogaster* in response to time and to four male accessory gland proteins. *Genetics*, 179, 1395-408.
- MCHAOURAB, H. S., DODSON, E. K. & KOTEICHE, H. A. 2002. Mechanism of chaperone function in small heat shock proteins. Two-mode binding of the excited states of T4 lysozyme mutants by alphaA-crystallin. *J Biol Chem*, 277, 40557-66.
- MCHAOURAB, H. S., GODAR, J. A. & STEWART, P. L. 2009. Structure and mechanism of protein stability sensors: chaperone activity of small heat shock proteins. *Biochemistry*, 48, 3828-37.
- MCHAOURAB, H. S., LIN, Y. L. & SPILLER, B. W. 2012. Crystal structure of an activated variant of small heat shock protein Hsp16.5. *Biochemistry*, 51, 5105-12.
- MCWILLIAM, H., LI, W., ULUDAG, M., SQUIZZATO, S., PARK, Y. M., BUSO, N., COWLEY, A. P. & LOPEZ, R. 2013. Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI. *Nucleic Acids Res*, 41, W597-600.
- MEHLEN, P., KRETZ-REMY, C., PREVILLET, X. & ARRIGO, A. P. 1996a. Human hsp27, *Drosophila* hsp27 and human alphaB-crystallin expression-mediated increase in glutathione is essential for the protective activity of these proteins against TNFalpha-induced cell death. *EMBO J*, 15, 2695-706.
- MEHLEN, P., SCHULZE-OSTHOFF, K. & ARRIGO, A. P. 1996b. Small stress proteins as novel regulators of apoptosis. Heat shock protein 27 blocks Fas/APO-1- and staurosporine-induced cell death. *J Biol Chem*, 271, 16510-4.
- MICHAUD, S., LAVOIE, S., GUIMOND, M. O. & TANGUAY, R. M. 2008. The nuclear localization of *Drosophila* Hsp27 is dependent on a monopartite arginine-rich NLS and is uncoupled from its association to nuclear speckles. *Biochim Biophys Acta*, 1783, 1200-10.
- MICHAUD, S., MARIN, R. & TANGUAY, R. M. 1997a. Regulation of heat shock gene induction and expression during *Drosophila* development. *Cell Mol Life Sci*, 53, 104-13.

- MICHAUD, S., MARIN, R., WESTWOOD, J. T. & TANGUAY, R. M. 1997b. Cell-specific expression and heat-shock induction of Hsps during spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Cell Science*, 110, 1989-1997.
- MICHAUD, S., MORROW, G., MARCHAND, J. & TANGUAY, R. M. 2002. *Drosophila* small heat shock proteins: cell and organelle-specific chaperones? *Prog Mol Subcell Biol*, 28, 79-101.
- MICHAUD, S. & TANGUAY, R. M. 2003. Expression of the Hsp23 chaperone during *Drosophila* embryogenesis: association to distinct neural and glial lineages. *BMC Dev Biol*, 3, 9.
- MICHELS, A. A., NGUYEN, V. T., KONINGS, A. W., KAMPINGA, H. H. & BENSUADE, O. 1995. Thermostability of a nuclear-targeted luciferase expressed in mammalian cells. Destabilizing influence of the intranuclear microenvironment. *Eur J Biochem*, 234, 382-9.
- MICHIEL, M., SKOURI-PANET, F., DUPRAT, E., SIMON, S., FERARD, C., TARDIEU, A. & FINET, S. 2009. Abnormal assemblies and subunit exchange of alphaB-crystallin R120 mutants could be associated with destabilization of the dimeric substructure. *Biochemistry*, 48, 442-53.
- MINOIA, M., BONCORAGLIO, A., VINET, J., MORELLI, F. F., BRUNSTING, J. F., POLETTI, A., KROM, S., REITS, E., KAMPINGA, H. H. & CARRA, S. 2014. BAG3 induces the sequestration of proteasomal clients into cytoplasmic puncta: implications for a proteasome-to-autophagy switch. *Autophagy*, 10, 1603-21.
- MOGK, A., DEUERLING, E., VORDERWULBECKE, S., VIERLING, E. & BUKAU, B. 2003a. Small heat shock proteins, ClpB and the DnaK system form a functional triade in reversing protein aggregation. *Mol Microbiol*, 50, 585-95.
- MOGK, A., SCHLIEKER, C., FRIEDRICH, K. L., SCHONFELD, H. J., VIERLING, E. & BUKAU, B. 2003b. Refolding of substrates bound to small Hsps relies on a disaggregation reaction mediated most efficiently by ClpB/DnaK. *J Biol Chem*, 278, 31033-42.
- MORROW, G., BATTISTINI, S., ZHANG, P. & TANGUAY, R. M. 2004. Decreased lifespan in the absence of expression of the mitochondrial small heat shock protein Hsp22 in *Drosophila*. *J Biol Chem*, 279, 43382-5.
- MORROW, G., HEIKKILA, J. J. & TANGUAY, R. M. 2006. Differences in the chaperone-like activities of the four main small heat shock proteins of *Drosophila melanogaster*. *Cell Stress Chaperones*, 11, 51-60.
- MORROW, G., INAGUMA, Y., KATO, K. & TANGUAY, R. M. 2000a. The small heat shock protein Hsp22 of *Drosophila melanogaster* is a mitochondrial protein displaying oligomeric organization. *J Biol Chem*, 275, 31204-10.
- MORROW, G., INAGUMA, Y., KATO, K. & TANGUAY, R. M. 2000b. The small heat shock protein Hsp22 of *Drosophila melanogaster* is a mitochondrial protein displaying oligomeric organization. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 31204-31210.
- MORROW, G. & TANGUAY, R. M. 2012. Small heat shock protein expression and functions during development. *Int J Biochem Cell Biol*, 44, 1613-21.
- MORROW, G. V. & TANGUAY, R. 2015. *Drosophila* Small Heat Shock Proteins: An Update on Their Features and Functions. In: TANGUAY, R. M. & HIGHTOWER,

- L. E. (eds.) *The Big Book on Small Heat Shock Proteins*. Springer International Publishing.
- MOUTAOUIK, M. T., EL FATIMY, R., NASSOUR, H., GAREAU, C., LANG, J., TANGUAY, R. M., MAZROUI, R. & KHANDJIAN, E. W. 2014. UVC-induced stress granules in mammalian cells. *PLoS One*, 9, e112742.
- MOUTAOUIK, M. T., MORROW, G., MAAROUFI, H., FÉRARD, C., FINET, S. & TANGUAY, R. M. 2016. Oligomerization and chaperone-like activity of *Drosophila melanogaster* small heat shock protein DmHsp27 and three arginine mutants in the alpha-crystallin domain. *Cell Stress and Chaperones*, 1-12.
- MULLER, L., HUTTER, S., STAMBOLIYSKA, R., SAMINADIN-PETER, S. S., STEPHAN, W. & PARSCH, J. 2011. Population transcriptomics of *Drosophila melanogaster* females. *BMC Genomics*, 12, 81.
- MURANOVA, L. K., WEEKS, S. D., STRELKOV, S. V. & GUSEV, N. B. 2015. Characterization of Mutants of Human Small Heat Shock Protein HspB1 Carrying Replacements in the N-Terminal Domain and Associated with Hereditary Motor Neuron Diseases. *PLoS One*, 10, e0126248.
- MYMRIKOV, E. V., SEIT-NEBI, A. S. & GUSEV, N. B. 2012. Heterooligomeric complexes of human small heat shock proteins. *Cell Stress Chaperones*, 17, 157-69.
- NARBERHAUS, F. 2002. Alpha-crystallin-type heat shock proteins: socializing minichaperones in the context of a multichaperone network. *Microbiol Mol Biol Rev*, 66, 64-93; table of contents.
- NEFEDOVA, V. V., DATSKEVICH, P. N., SUDNITSYNA, M. V., STRELKOV, S. V. & GUSEV, N. B. 2013. Physico-chemical properties of R140G and K141Q mutants of human small heat shock protein HspB1 associated with hereditary peripheral neuropathies. *Biochimie*, 95, 1582-92.
- NICOLAOU, P., KNOLL, R., HAGHIGHI, K., FAN, G. C., DORN, G. W., 2ND, HASENFUB, G. & KRANIAS, E. G. 2008. Human mutation in the anti-apoptotic heat shock protein 20 abrogates its cardioprotective effects. *J Biol Chem*, 283, 33465-71.
- NIGG, E. A. 1997. Nucleocytoplasmic transport: signals, mechanisms and regulation. *Nature*, 386, 779-87.
- NOVER, L. & SCHARF, K. D. 1984. Synthesis, modification and structural binding of heat-shock proteins in tomato cell cultures. *Eur J Biochem*, 139, 303-13.
- O'CALLAGHAN-SUNOL, C., GABAI, V. L. & SHERMAN, M. Y. 2007. Hsp27 modulates p53 signaling and suppresses cellular senescence. *Cancer Res*, 67, 11779-88.
- OHNO, M., FORNEROD, M. & MATTAJ, I. W. 1998. Nucleocytoplasmic transport: the last 200 nanometers. *Cell*, 92, 327-36.
- PALMERI, D. & MALIM, M. H. 1999. Importin beta can mediate the nuclear import of an arginine-rich nuclear localization signal in the absence of importin alpha. *Mol Cell Biol*, 19, 1218-25.
- PARKER, C. S. & TOPOL, J. 1984. A *Drosophila* RNA polymerase II transcription factor binds to the regulatory site of an hsp 70 gene. *Cell*, 37, 273-83.
- PASTA, S. Y., RAMAN, B., RAMAKRISHNA, T. & RAO CH, M. 2003. Role of the conserved SRLFDQFFG region of alpha-crystallin, a small heat shock protein. Effect on oligomeric size, subunit exchange, and chaperone-like activity. *J Biol Chem*, 278, 51159-66.

- PATEL, S., VIERLING, E. & TAMA, F. 2014. Replica exchange molecular dynamics simulations provide insight into substrate recognition by small heat shock proteins. *Biophys J*, 106, 2644-55.
- PAUL, C., MANERO, F., GONIN, S., KRETZ-REMY, C., VIROT, S. & ARRIGO, A. P. 2002. Hsp27 as a negative regulator of cytochrome C release. *Mol Cell Biol*, 22, 816-34.
- PELHAM, H. R. 1982. A regulatory upstream promoter element in the *Drosophila* hsp 70 heat-shock gene. *Cell*, 30, 517-28.
- PERNG, M. D., CAIRNS, L., VAN DEN, I. P., PRESCOTT, A., HUTCHESON, A. M. & QUINLAN, R. A. 1999. Intermediate filament interactions can be altered by HSP27 and alphaB-crystallin. *J Cell Sci*, 112 (Pt 13), 2099-112.
- PESCHEK, J., BRAUN, N., ROHRBERG, J., BACK, K. C., KRIEHLBER, T., KASTENMULLER, A., WEINKAUF, S. & BUCHNER, J. 2013. Regulated structural transitions unleash the chaperone activity of alphaB-crystallin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, E3780-9.
- PIETROWSKI, D., DURANTE, M. J., LIEBSTEIN, A., SCHMITT-JOHN, T., WERNER, T. & GRAW, J. 1994. Alpha-crystallins are involved in specific interactions with the murine gamma D/E/F-crystallin-encoding gene. *Gene*, 144, 171-8.
- PILOTTO, A., MARZILIANO, N., PASOTTI, M., GRASSO, M., COSTANTE, A. M. & ARBUSTINI, E. 2006. alphaB-crystallin mutation in dilated cardiomyopathies: low prevalence in a consecutive series of 200 unrelated probands. *Biochem Biophys Res Commun*, 346, 1115-7.
- PLATER, M. L., GOODE, D. & CRABBE, M. J. 1996. Effects of site-directed mutations on the chaperone-like activity of alphaB-crystallin. *J Biol Chem*, 271, 28558-66.
- POSNER, M., KISS, A. J., SKIBA, J., DROSSMAN, A., DOLINSKA, M. B., HEJTMANCIK, J. F. & SERGEEV, Y. V. 2012. Functional validation of hydrophobic adaptation to physiological temperature in the small heat shock protein alphaA-crystallin. *PLoS One*, 7, e34438.
- POULAIN, P., GELLY, J. C. & FLATTERS, D. 2010. Detection and architecture of small heat shock protein monomers. *PLoS One*, 5, e9990.
- PRAS, E., FRYDMAN, M., LEVY-NISSENBAUM, E., BAKHAN, T., RAZ, J., ASSIA, E. I., GOLDMAN, B. & PRAS, E. 2000. A nonsense mutation (W9X) in CRYAA causes autosomal recessive cataract in an inbred Jewish Persian family. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 41, 3511-5.
- QUINLAN, R. A., ZHANG, Y., LANSBURY, A., WILLIAMSON, I., POHL, E. & SUN, F. 2013. Changes in the quaternary structure and function of MjHSP16.5 attributable to deletion of the IXI motif and introduction of the substitution, R107G, in the alpha-crystallin domain. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 368, 20120327.
- RAJAGOPAL, P., LIU, Y., SHI, L., CLOUSER, A. F. & KLEVIT, R. E. 2015. Structure of the alpha-crystallin domain from the redox-sensitive chaperone, HSPB1. *J Biomol NMR*, 63, 223-8.
- RAMAN, B., RAMAKRISHNA, T. & RAO, C. M. 1995. Temperature dependent chaperone-like activity of alpha-crystallin. *FEBS Lett*, 365, 133-6.
- RATAJCZAK, E., ZIETKIEWICZ, S. & LIBEREK, K. 2009. Distinct activities of *Escherichia coli* small heat shock proteins IbpA and IbpB promote efficient protein disaggregation. *J Mol Biol*, 386, 178-89.

- RICHTER, K., HASLBECK, M. & BUCHNER, J. 2010. The heat shock response: life on the verge of death. *Mol Cell*, 40, 253-66.
- RINEHART, J. P., LI, A., YOCUM, G. D., ROBICH, R. M., HAYWARD, S. A. & DENLINGER, D. L. 2007. Up-regulation of heat shock proteins is essential for cold survival during insect diapause. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 11130-7.
- RITOSSA, F. 1962. New Puffing Pattern Induced by Temperature Shock and Dnp in *Drosophila*. *Experientia*, 18, 571-&.
- ROBERT, X. & GOUET, P. 2014. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic Acids Res*, 42, W320-4.
- RODRIGUES, J. P., LEVITT, M. & CHOPRA, G. 2012. KoBaMIN: a knowledge-based minimization web server for protein structure refinement. *Nucleic Acids Res*, 40, W323-8.
- ROGALLA, T., EHRNSPERGER, M., PREVILLE, X., KOTLYAROV, A., LUTSCH, G., DUCASSE, C., PAUL, C., WIESKE, M., ARRIGO, A. P., BUCHNER, J. & GAESTEL, M. 1999. Regulation of Hsp27 oligomerization, chaperone function, and protective activity against oxidative stress/tumor necrosis factor alpha by phosphorylation. *J Biol Chem*, 274, 18947-56.
- RORTH, P., SZABO, K., BAILEY, A., LAVERTY, T., REHM, J., RUBIN, G. M., WEIGMANN, K., MILAN, M., BENES, V., ANSORGE, W. & COHEN, S. M. 1998. Systematic gain-of-function genetics in *Drosophila*. *Development*, 125, 1049-57.
- ROSENBAUM, E. E., BREHM, K. S., VASILJEVIC, E., LIU, C. H., HARDIE, R. C. & COLLEY, N. J. 2011. XPORT-dependent transport of TRP and rhodopsin. *Neuron*, 72, 602-15.
- ROSSOR, A. M., DAVIDSON, G. L., BLAKE, J., POLKE, J. M., MURPHY, S. M., HOULDEN, H., INNES, A., KALMAR, B., GREENSMITH, L. & REILLY, M. M. 2012. A novel p.Gln175X [corrected] premature stop mutation in the C-terminal end of HSP27 is a cause of CMT2. *J Peripher Nerv Syst*, 17, 201-5.
- SACCONI, S., FEASSON, L., ANTOINE, J. C., PECHEUX, C., BERNARD, R., COBO, A. M., CASARIN, A., SALVIATI, L., DESNUELLE, C. & URTIZBEREA, A. 2012. A novel CRYAB mutation resulting in multisystemic disease. *Neuromuscul Disord*, 22, 66-72.
- SAJI, H., IIZUKA, R., YOSHIDA, T., ABE, T., KIDOKORO, S., ISHII, N. & YOHDA, M. 2008. Role of the IXI/V motif in oligomer assembly and function of StHsp14.0, a small heat shock protein from the acidothermophilic archaeon, *Sulfolobus tokodaii* strain 7. *Proteins*, 71, 771-82.
- SANTHIYA, S. T., SOKER, T., KLOPP, N., ILLIG, T., PRAKASH, M. V., SELVARAJ, B., GOPINATH, P. M. & GRAW, J. 2006. Identification of a novel, putative cataract-causing allele in CRYAA (G98R) in an Indian family. *Mol Vis*, 12, 768-73.
- SATISH KUMAR, M., MRUDULA, T., MITRA, N. & BHANUPRAKASH REDDY, G. 2004. Enhanced degradation and decreased stability of eye lens alpha-crystallin upon methylglyoxal modification. *Exp Eye Res*, 79, 577-83.
- SCHARF, K. D., HEIDER, H., HOHFELD, I., LYCK, R., SCHMIDT, E. & NOVER, L. 1998. The tomato Hsf system: HsfA2 needs interaction with HsfA1 for efficient nuclear import and may be localized in cytoplasmic heat stress granules. *Mol Cell Biol*, 18, 2240-51.

- SCHARF, K. D., SIDDIQUE, M. & VIERLING, E. 2001. The expanding family of Arabidopsis thaliana small heat stress proteins and a new family of proteins containing alpha-crystallin domains (Acid proteins). *Cell Stress Chaperones*, 6, 225-37.
- SCHOENHERR, J. A., DRENNAN, J. M., MARTINEZ, J. S., CHIKKA, M. R., HALL, M. C., CHANG, H. C. & CLEMENS, J. C. 2012. Drosophila activated Cdc42 kinase has an anti-apoptotic function. *PLoS Genet*, 8, e1002725.
- SELCEN, D. 2011. Myofibrillar myopathies. *Neuromuscul Disord*, 21, 161-71.
- SELCEN, D. & ENGEL, A. G. 2003. Myofibrillar myopathy caused by novel dominant negative alpha B-crystallin mutations. *Ann Neurol*, 54, 804-10.
- SHARMA, K. K., KUMAR, G. S., MURPHY, A. S. & KESTER, K. 1998. Identification of 1,1'-bi(4-anilino)naphthalene-5,5'-disulfonic acid binding sequences in alpha-crystallin. *J Biol Chem*, 273, 15474-8.
- SHASHIDHARAMURTHY, R., KOTEICHE, H. A., DONG, J. & MCHAOURAB, H. S. 2005. Mechanism of chaperone function in small heat shock proteins: dissociation of the HSP27 oligomer is required for recognition and binding of destabilized T4 lysozyme. *J Biol Chem*, 280, 5281-9.
- SHI, J., KOTEICHE, H. A., MCDONALD, E. T., FOX, T. L., STEWART, P. L. & MCHAOURAB, H. S. 2013. Cryoelectron microscopy analysis of small heat shock protein 16.5 (Hsp16.5) complexes with T4 lysozyme reveals the structural basis of multimode binding. *J Biol Chem*, 288, 4819-30.
- SHORTER, J. 2011. The mammalian disaggregase machinery: Hsp110 synergizes with Hsp70 and Hsp40 to catalyze protein disaggregation and reactivation in a cell-free system. *PLoS One*, 6, e26319.
- SIDDIQUE, M., GERNHARD, S., VON KOSKULL-DORING, P., VIERLING, E. & SCHARF, K. D. 2008. The plant sHSP superfamily: five new members in Arabidopsis thaliana with unexpected properties. *Cell Stress Chaperones*, 13, 183-97.
- SIDDIQUE, M., PORT, M., TRIPP, J., WEBER, C., ZIELINSKI, D., CALLIGARIS, R., WINKELHAUS, S. & SCHARF, K. D. 2003. Tomato heat stress protein Hsp16.1-CIII represents a member of a new class of nucleocytoplasmic small heat stress proteins in plants. *Cell Stress Chaperones*, 8, 381-94.
- SIMON, S., MICHIEL, M., SKOURI-PANET, F., LECHAIRE, J. P., VICART, P. & TARDIEU, A. 2007. Residue R120 is essential for the quaternary structure and functional integrity of human alphaB-crystallin. *Biochemistry*, 46, 9605-14.
- SINGH, D., RAMAN, B., RAMAKRISHNA, T. & RAO CH, M. 2007. Mixed oligomer formation between human alphaA-crystallin and its cataract-causing G98R mutant: structural, stability and functional differences. *J Mol Biol*, 373, 1293-304.
- SINGH, K., GROTH-VASSELLI, B. & FARNSWORTH, P. N. 1998. Interaction of DNA with bovine lens alpha-crystallin: its functional implications. *Int J Biol Macromol*, 22, 315-20.
- SKOURI-PANET, F., MICHIEL, M., FERARD, C., DUPRAT, E. & FINET, S. 2012. Structural and functional specificity of small heat shock protein HspB1 and HspB4, two cellular partners of HspB5: role of the in vitro hetero-complex formation in chaperone activity. *Biochimie*, 94, 975-84.

- SMITH, J. B., LIU, Y. & SMITH, D. L. 1996. Identification of possible regions of chaperone activity in lens alpha-crystallin. *Exp Eye Res*, 63, 125-8.
- SPECHT, S., MILLER, S. B., MOGK, A. & BUKAU, B. 2011. Hsp42 is required for sequestration of protein aggregates into deposition sites in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*, 195, 617-29.
- STAMLER, R., KAPPE, G., BOELEN, W. & SLINGSBY, C. 2005. Wrapping the alpha-crystallin domain fold in a chaperone assembly. *J Mol Biol*, 353, 68-79.
- STEGE, G. J., LI, G. C., LI, L., KAMPINGA, H. H. & KONINGS, A. W. 1994. On the role of hsp72 in heat-induced intranuclear protein aggregation. *Int J Hyperthermia*, 10, 659-74.
- STENGEL, F., BALDWIN, A. J., PAINTER, A. J., JAYA, N., BASHA, E., KAY, L. E., VIERLING, E., ROBINSON, C. V. & BENESCH, J. L. 2010. Quaternary dynamics and plasticity underlie small heat shock protein chaperone function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 2007-12.
- STOEVRING, B., VANG, O. & CHRISTIANSEN, M. 2005. (alpha)B-crystallin in cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *Clin Chim Acta*, 356, 95-101.
- STROMER, T., EHNSPERGER, M., GAESTEL, M. & BUCHNER, J. 2003. Analysis of the interaction of small heat shock proteins with unfolding proteins. *J Biol Chem*, 278, 18015-21.
- STROMER, T., FISCHER, E., RICHTER, K., HASLBECK, M. & BUCHNER, J. 2004. Analysis of the regulation of the molecular chaperone Hsp26 by temperature-induced dissociation: the N-terminal domain is important for oligomer assembly and the binding of unfolding proteins. *J Biol Chem*, 279, 11222-8.
- STUDER, S. & NARBERHAUS, F. 2000. Chaperone activity and homo- and hetero-oligomer formation of bacterial small heat shock proteins. *J Biol Chem*, 275, 37212-8.
- STUDER, S., OBRIST, M., LENTZE, N. & NARBERHAUS, F. 2002. A critical motif for oligomerization and chaperone activity of bacterial alpha-heat shock proteins. *Eur J Biochem*, 269, 3578-86.
- SUN, W., XIAO, X., LI, S., GUO, X. & ZHANG, Q. 2011. Mutation analysis of 12 genes in Chinese families with congenital cataracts. *Mol Vis*, 17, 2197-206.
- SUN, Y., MANSOUR, M., CRACK, J. A., GASS, G. L. & MACRAE, T. H. 2004. Oligomerization, chaperone activity, and nuclear localization of p26, a small heat shock protein from *Artemia franciscana*. *J Biol Chem*, 279, 39999-40006.
- TAKAHASHI, K. H., RAKO, L., TAKANO-SHIMIZU, T., HOFFMANN, A. A. & LEE, S. F. 2010. Effects of small Hsp genes on developmental stability and microenvironmental canalization. *BMC Evol Biol*, 10, 284.
- TAMURA, K., STECHER, G., PETERSON, D., FILIPSKI, A. & KUMAR, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol*, 30, 2725-9.
- TANG, B. S., ZHAO, G. H., LUO, W., XIA, K., CAI, F., PAN, Q., ZHANG, R. X., ZHANG, F. F., LIU, X. M., CHEN, B., ZHANG, C., SHEN, L., JIANG, H., LONG, Z. G. & DAI, H. P. 2005. Small heat-shock protein 22 mutated in autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth disease type 2L. *Hum Genet*, 116, 222-4.

- TANGUAY, R. M., WU, Y. & KHANDJIAN, E. W. 1993. Tissue-specific expression of heat shock proteins of the mouse in the absence of stress. *Dev Genet*, 14, 112-8.
- THERIAULT, J. R., LAMBERT, H., CHAVEZ-ZOBEL, A. T., CHAREST, G., LAVIGNE, P. & LANDRY, J. 2004. Essential role of the NH₂-terminal WD/EPF motif in the phosphorylation-activated protective function of mammalian Hsp27. *J Biol Chem*, 279, 23463-71.
- TISSIERES, A., MITCHELL, H. K. & TRACY, U. M. 1974. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *J Mol Biol*, 84, 389-98.
- TOMANCAK, P., BERMAN, B. P., BEATON, A., WEISZMANN, R., KWAN, E., HARTENSTEIN, V., CELNIKER, S. E. & RUBIN, G. M. 2007. Global analysis of patterns of gene expression during *Drosophila* embryogenesis. *Genome Biol*, 8, R145.
- TOMOYASU, T., TABATA, A. & NAGAMUNE, H. 2010. Investigation of the chaperone function of the small heat shock protein-AgsA. *BMC Biochem*, 11, 27.
- TREWEEK, T. M., ECROYD, H., WILLIAMS, D. M., MEEHAN, S., CARVER, J. A. & WALKER, M. J. 2007. Site-directed mutations in the C-terminal extension of human alphaB-crystallin affect chaperone function and block amyloid fibril formation. *PLoS One*, 2, e1046.
- TREWEEK, T. M., REKAS, A., LINDNER, R. A., WALKER, M. J., AQUILINA, J. A., ROBINSON, C. V., HORWITZ, J., PERNG, M. D., QUINLAN, R. A. & CARVER, J. A. 2005. R120G alphaB-crystallin promotes the unfolding of reduced alpha-lactalbumin and is inherently unstable. *FEBS J*, 272, 711-24.
- TREWEEK, T. M., REKAS, A., WALKER, M. J. & CARVER, J. A. 2010. A quantitative NMR spectroscopic examination of the flexibility of the C-terminal extensions of the molecular chaperones, alphaA- and alphaB-crystallin. *Exp Eye Res*, 91, 691-9.
- TYEDMERS, J., MOGK, A. & BUKAU, B. 2010. Cellular strategies for controlling protein aggregation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11, 777-88.
- USUI, K., HATIPOGLU, O. F., ISHII, N. & YOHDA, M. 2004. Role of the N-terminal region of the crenarchaeal sHsp, StHsp14.0, in thermal-induced disassembly of the complex and molecular chaperone activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 315, 113-8.
- UVERSKY, V. N. & DUNKER, A. K. 2010. Understanding protein non-folding. *Biochim Biophys Acta*, 1804, 1231-64.
- VAN DE KLUNDERT, F. A. & DE JONG, W. W. 1999. The small heat shock proteins Hsp20 and alphaB-crystallin in cultured cardiac myocytes: differences in cellular localization and solubilization after heat stress. *Eur J Cell Biol*, 78, 567-72.
- VAN DEN, I. P., WHEELOCK, R., PRESCOTT, A., RUSSELL, P. & QUINLAN, R. A. 2003. Nuclear speckle localisation of the small heat shock protein alpha B-crystallin and its inhibition by the R120G cardiomyopathy-linked mutation. *Exp Cell Res*, 287, 249-61.

- VAN MONTFORT, R., SLINGSBY, C. & VIERLING, E. 2001a. Structure and function of the small heat shock protein/alpha-crystallin family of molecular chaperones. *Adv Protein Chem*, 59, 105-56.
- VAN MONTFORT, R. L., BASHA, E., FRIEDRICH, K. L., SLINGSBY, C. & VIERLING, E. 2001b. Crystal structure and assembly of a eukaryotic small heat shock protein. *Nat Struct Biol*, 8, 1025-30.
- VAN RIJK, A. E., STEGE, G. J., BENNINK, E. J., MAY, A. & BLOEMENDAL, H. 2003. Nuclear staining for the small heat shock protein alphaB-crystallin colocalizes with splicing factor SC35. *Eur J Cell Biol*, 82, 361-8.
- VEINGER, L., DIAMANT, S., BUCHNER, J. & GOLOUBINOFF, P. 1998. The small heat-shock protein IbpB from Escherichia coli stabilizes stress-denatured proteins for subsequent refolding by a multichaperone network. *J Biol Chem*, 273, 11032-7.
- VICART, P., CARON, A., GUICHENEY, P., LI, Z., PREVOST, M. C., FAURE, A., CHATEAU, D., CHAPON, F., TOME, F., DUPRET, J. M., PAULIN, D. & FARDEAU, M. 1998. A missense mutation in the alphaB-crystallin chaperone gene causes a desmin-related myopathy. *Nat Genet*, 20, 92-5.
- VOS, M. J. 2009. *Small heat shock proteins; implications for neurodegeneration and longevity*.
- VOS, M. J., CARRA, S., KANON, B., BOSVELD, F., KLAUKE, K., SIBON, O. C. & KAMPINGA, H. H. 2016. Specific protein homeostatic functions of small heat-shock proteins increase lifespan. *Aging Cell*, 15, 217-26.
- WANG, L., COLODNER, K. J. & FEANY, M. B. 2011. Protein misfolding and oxidative stress promote glial-mediated neurodegeneration in an Alexander disease model. *J Neurosci*, 31, 2868-77.
- WANG, X., OSINSKA, H., KLEVITSKY, R., GERDES, A. M., NIEMAN, M., LORENZ, J., HEWETT, T. & ROBBINS, J. 2001. Expression of R120G-alphaB-crystallin causes aberrant desmin and alphaB-crystallin aggregation and cardiomyopathy in mice. *Circ Res*, 89, 84-91.
- WATERS, E. R. 2013. The evolution, function, structure, and expression of the plant sHSPs. *J Exp Bot*, 64, 391-403.
- WEEKS, S. D., BARANOVA, E. V., HEIRBAUT, M., BEELEN, S., SHKUMATOV, A. V., GUSEV, N. B. & STRELKOV, S. V. 2014. Molecular structure and dynamics of the dimeric human small heat shock protein HSPB6. *J Struct Biol*, 185, 342-54.
- WEEKS, S. D. & BOUCKAERT, J. 2014. Small-angle X-ray scattering to obtain models of multivalent lectin-glycan complexes. *Methods Mol Biol*, 1200, 511-26.
- WEEKS, S. D., DRINKER, M. & LOLL, P. J. 2007. Ligation independent cloning vectors for expression of SUMO fusions. *Protein Expr Purif*, 53, 40-50.
- WEHMEYER, N. & VIERLING, E. 2000. The expression of small heat shock proteins in seeds responds to discrete developmental signals and suggests a general protective role in desiccation tolerance. *Plant Physiol*, 122, 1099-108.
- WHELAN, S. & GOLDMAN, N. 2001. A general empirical model of protein evolution derived from multiple protein families using a maximum-likelihood approach. *Mol Biol Evol*, 18, 691-9.

- WHITE, H. E., ORLOVA, E. V., CHEN, S., WANG, L., IGNATIOU, A., GOWEN, B., STROMER, T., FRANZMANN, T. M., HASLBECK, M., BUCHNER, J. & SAIBIL, H. R. 2006. Multiple distinct assemblies reveal conformational flexibility in the small heat shock protein Hsp26. *Structure*, 14, 1197-204.
- WU, C. 1984. Activating protein factor binds in vitro to upstream control sequences in heat shock gene chromatin. *Nature*, 311, 81-4.
- XU, Y., DIAO, Y., QI, S., PAN, X., WANG, Q., XIN, Y., CAO, X., RUAN, J., ZHAO, Z., LUO, L., LIU, C. & YIN, Z. 2013. Phosphorylated Hsp27 activates ATM-dependent p53 signaling and mediates the resistance of MCF-7 cells to doxorubicin-induced apoptosis. *Cell Signal*, 25, 1176-85.
- YANG, H., HUANG, S., DAI, H., GONG, Y., ZHENG, C. & CHANG, Z. 1999. The Mycobacterium tuberculosis small heat shock protein Hsp16.3 exposes hydrophobic surfaces at mild conditions: conformational flexibility and molecular chaperone activity. *Protein Sci*, 8, 174-9.
- YU, J., PACIFICO, S., LIU, G. & FINLEY, R. L., JR. 2008. DroID: the Drosophila Interactions Database, a comprehensive resource for annotated gene and protein interactions. *BMC Genomics*, 9, 461.
- ZAMPARINI, A. L., DAVIS, M. Y., MALONE, C. D., VIEIRA, E., ZAVADIL, J., SACHIDANANDAM, R., HANNON, G. J. & LEHMANN, R. 2011. Vreteno, a gonad-specific protein, is essential for germline development and primary piRNA biogenesis in Drosophila. *Development*, 138, 4039-50.
- ZAVIALOV, A., BENNDORF, R., EHRNSPERGER, M., ZAV'YALOV, V., DUDICH, I., BUCHNER, J. & GAESTEL, M. 1998. The effect of the intersubunit disulfide bond on the structural and functional properties of the small heat shock protein Hsp25. *Int J Biol Macromol*, 22, 163-73.
- ZHAI, B., VILLEN, J., BEAUSOLEIL, S. A., MINTSERIS, J. & GYGI, S. P. 2008. Phosphoproteome analysis of Drosophila melanogaster embryos. *J Proteome Res*, 7, 1675-82.
- ZHANG, D., KE, L., MACKOVICOVA, K., VAN DER WANT, J. J., SIBON, O. C., TANGUAY, R. M., MORROW, G., HENNING, R. H., KAMPINGA, H. H. & BRUNDEL, B. J. 2011a. Effects of different small HSPB members on contractile dysfunction and structural changes in a Drosophila melanogaster model for Atrial Fibrillation. *J Mol Cell Cardiol*, 51, 381-9.
- ZHANG, J., MARSHALL, K. E., WESTWOOD, J. T., CLARK, M. S. & SINCLAIR, B. J. 2011b. Divergent transcriptomic responses to repeated and single cold exposures in Drosophila melanogaster. *J Exp Biol*, 214, 4021-9.
- ZHANG, K., EZEMADUKA, A. N., WANG, Z., HU, H., SHI, X., LIU, C., LU, X., FU, X., CHANG, Z. & YIN, C. C. 2015. A novel mechanism for small heat shock proteins to function as molecular chaperones. *Sci Rep*, 5, 8811.
- ZHAO, Y., SUN, H., LU, J., LI, X., CHEN, X., TAO, D., HUANG, W. & HUANG, B. 2005. Lifespan extension and elevated hsp gene expression in Drosophila caused by histone deacetylase inhibitors. *J Exp Biol*, 208, 697-705.
- ZHOU, Q., SHI, X., ZHANG, K., SHI, C., HUANG, L. & CHANG, Z. 2016. The Function of Ile-X-Ile Motif in the Oligomerization and Chaperone-Like Activity of Small Heat Shock Protein AgsA at Room Temperature. *Protein J*.

- ZIMMERMANN, G., FURLONG, E. E., SUYAMA, K. & SCOTT, M. P. 2006. Mes2, a MADF-containing transcription factor essential for Drosophila development. *Dev Dyn*, 235, 3387-95.
- ZOU, S., MEADOWS, S., SHARP, L., JAN, L. Y. & JAN, Y. N. 2000. Genome-wide study of aging and oxidative stress response in Drosophila melanogaster. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 13726-31.

Annexe : Matériel et methods

A.1 Clonage, mutagenèse dirigée expression et purification des vecteurs

La séquence codante de *Drosophila melanogaster* Hsp27 (DmHsp27) est clonée avec le kit Gibson Assembly (NEB) en utilisant les enzymes de restriction KpnI et XhoI (NEB) dans le plasmide pETHSUK conçu pour l'expression protéique et qui nous a été gracieusement fournies par le Dr. S.Weeks (KU Leuven, Belgique). Le plasmide de fusion pETHSUK contient le gène d'intérêt, le promoteur fort de l'ARN polymérase T7, des séquences régulatrices permettant une expression optimale de la protéine d'intérêt et un gène de résistance à l'ampicilline pour la sélection (Figure A.1 a). La présence d'une protéine de fusion (SUMO) pour small ubiquitin-related modifier avec 6 histidines en amont augmente de manière significative l'expression des protéines et facilite la purification par la présence de cette étiquette de 6 histidines qui peut lier des billes de nickel. En plus, la disponibilité d'une SUMO protéase (SUMO-hydrolase), qui élimine spécifiquement et efficacement la protéine de fusion SUMO présente un avantage pour l'utilisation de ce plasmide.

De la même façon, la séquence codante de DmHsp27 est également clonée dans le plasmide pcDNA3.1+ (Thermo Fisher scientific) qui est optimisé pour l'expression au sein des cellules de mammifères (Figure A.1 b)

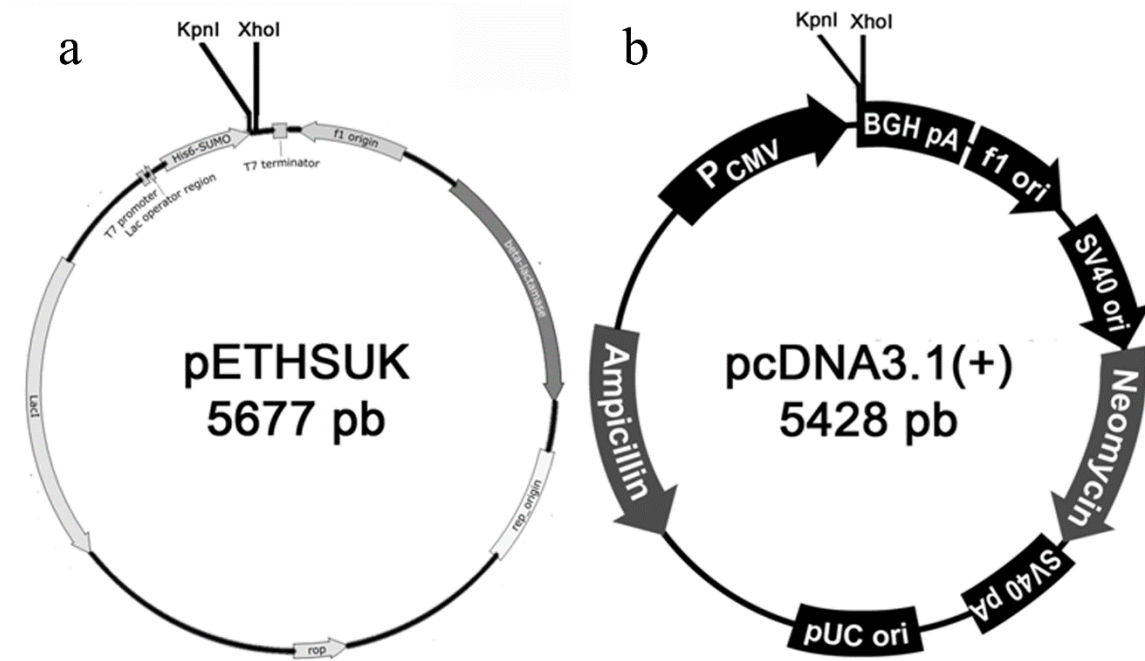


Figure A.2: Carte des vecteurs.

(A) pETHSUK et (B) pcDNA3.1(+). Deux vecteurs possèdent un multisite de clonage contenant les sites de restriction KpnI et XhoI

Les mutations ponctuelles ont été introduites par mutagenèse dirigée à l'aide de la réaction en chaîne par polymérase (PCR) en utilisant la polymérase à haute-fidélité Q5 (NEB). En gros trois réactions de PCR ont été réalisées voir Figure A.2. La première PCR consiste à muter la séquence codante de DmHsp27 à l'aide de l'oligonucléotide pETHSUKDmHsp27_{fwd} ou pcDNADmHsp27_{fwd}, qui contient le site de liaison à l'ATG de DmHsp27 et un site complémentaire au vecteur pETHSUK ou pcDNA3.1+ digérée avec l'enzyme de restriction KpnI en amont du site d'initiation de la transcription, jumelé à l'oligonucléotide mutation_{rev} complémentaire contenant la mutation désirée. La deuxième PCR effectuée en utilisant cette fois l'oligonucléotide pETHSUKDmHsp27_{rev} ou pcDNADmHsp27_{rev}, qui se lie au codon-stop de DmHsp27 et contient un site complémentaire au vecteur pETHSUK ou pcDNA3.1(+) digéré avec l'enzyme de restriction XhoI jumelé à l'oligonucléotide mutation_{fwd} complémentaire contenant la mutation désirée (Tableau 3.1). Une troisième PCR est alors effectuée en utilisant,

comme ADN de départ, les fragments obtenus grâce aux deux premières réactions. Les amorces utilisées pour cette dernière amplification sont pETHSUKDmHsp27_{fwd} ou pcDNADmHsp27_{fwd} et pETHSUKDmHsp27_{rev} ou pcDNADmHsp27_{rev} (Figure A.2) les mutants de délétion sont aussi produits de la même façon que les mutations ponctuelles. L'utilisation du protocole à trois étapes nous a permis d'éliminer les feux positifs en éliminant la contamination avec le plasmide contenant DmHsp27 sauvage servi comme modèle lors du protocole classique de la mutagenèse à partir du plasmide.

Le produit final obtenu après la troisième PCR est inséré dans les plasmides pETHSUK ou pcDNA3.1(+).

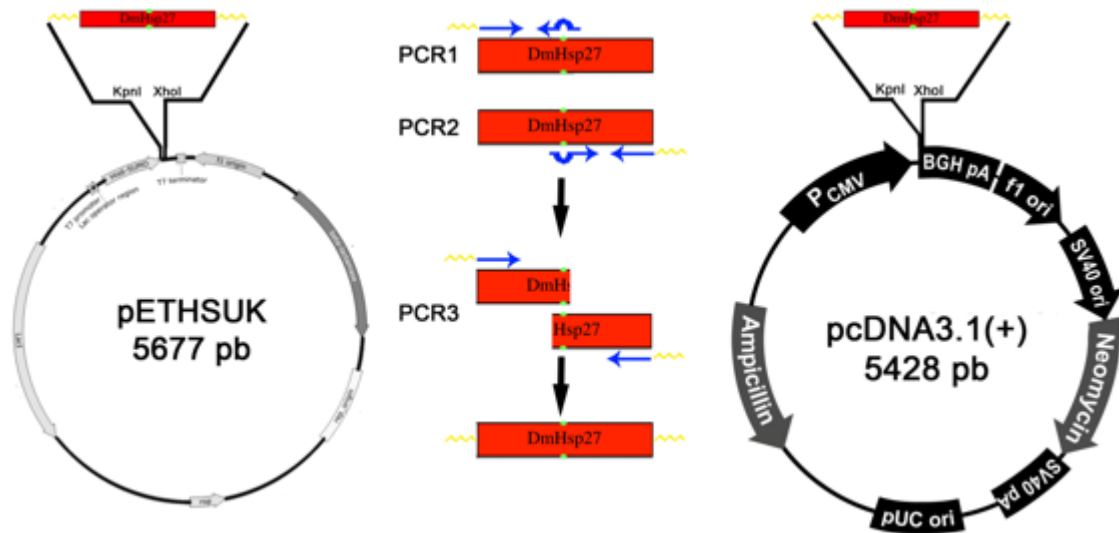


Figure A.3: Stratégie de mutagenèse de DmHsp27WT.

La région	La mutation	L'amorce
	pETHSUK DmHsp27Fwd	5'-AGATTGGTGGTACCATGTCAATTATAACCACTGC-3'
	pETHSUK DmHsp27Rev	5'-AGCAGAAGCTTCTTACTTGCTAGTCTCCATTTTC-3'
	pcDNA DmHsp27Fwd	5'-AAACTTAAGCTTGGTACATGTCAATTATAACCACTGC-3'
	pcDNA DmHsp27Rev	5'-CGGGCCCTCTAGACTTACTTGCTAGTCTCCATTTTC-3'
NTR	pETHSUK DmHsp27Del-NTRFwd	5'-GAACAGATTGGTGGTACAATGAAAGATGGCTTCCAG-3'
	pcDNA DmHsp27Del-NTRFwd	5'-TAAACTTAAGCTTGGTACATGAAAGATGGCTTCCAG-3'
	DmHsp27Del29-32Fwd	5'-GGAGGATGACGTCCATGCCACGATCTGTTCC-3'
	DmHsp27Del29-32Rev	5'-GGGCATGGACGTCATCTCCAGCAAATGCCCCC-3'
	DmHsp27F29AFwd	5'-GAGGATGACGCCGTTTTTGGCGTCCATGCCTAT-3'
	DmHsp27F29ARev	5'-GACGCCAAAAGCGGTCATCTCCAGC-3'
	DmHsp27F29YFwd	5'-GAGGATGACTACGGTTTTTGGCGTCCATGCCTAT-3'
	DmHsp27F29YRev	5'-GACGCCAAAAGCGTAGTCATCTCCAGC-3'
	DmHsp27G30AFwd	5'-GAGGATGACTTCGTTTTTGGCGTCCATGCC-3'

	DmHsp27G30A _{Rev}	5'- GAC GCC AAA AGC GAA GTC ATC CTC CAG C -3'
	DmHsp27G30F _{wd}	5'- GAG GAT GAC TTC CGT TTT GGC GTC CAT GCC -3'
	DmHsp27G30R _{Rev}	5'- GAC GCC AAA ACG GAA GTC ATC CTC CAG C -3'
	DmHsp27F31A _{Fwd}	5'-GAGGATGACTTCGGTGTGGCGTCCATGCC-3'
	DmHsp27F31A _{Rev}	5'-GACGCCAGCACCGAAGTCATCTCCAGC-3'
	DmHsp27F31Y _{Fwd}	5'-GAGGATGACTTCGGTTATGGCGTCCATGCC-3'
	DmHsp27F31Y _{Rev}	5'-GACGCCATAACCGAAGTCATCTCCAGC-3'
	DmHsp27G32A _{Fwd}	5'-GACTTCGGTTTTGCCGTCCATGCCACG-3'
	DmHsp27G32A _{Rev}	5'-GGCATGGACGGCAAAAACCGAAGTCATCC-3'
	DmHsp27G32R _{wd}	5'-GACTTCGGTTTTCCGCGTCCATGCCACG-3'
	DmHsp27G32R _{ev}	5'-GGCATGGACGCGAAAACCGAAGTCATCC-3'
	S58A _{Fwd}	5'-CGTCGTCGCTATGCGCCGTACGAGAGG-3'
	S58A _{Rev}	5'-CCTCTCGTACGGCGCATAGCGACGCGACC-3'
	S58D _{Fwd}	5'-CGTCGTCGCTATGACCCGTACGAGAGG-3'
	S58D _{Rev}	5'-CCTCTCGTACGGGTCATAGCGACGCGACC-3'
	S75A _{Fwd}	5'-CACGTCGCGCGGGGAGGTCCAAACG3-'
	S75A _{Rev}	5'-CGTTTGGACCTCCGCGCGGACGTG-3'
	S75D _{Fwd}	5'-CACGTCGCGCGGACGAGGTCCAAACG3-'
	S75D _{Rev}	5'-CGTTTGGACCTCCGTCCGCGGACGTG-3'
ACD	DmHsp27R122G _{Fwd}	5'-AAGCACGAGGAGGGCGAGGACGGCCATGG-3'
	DmHsp27R122G _{Rev}	5'-ATGGCCGTCCTGCCCTCCTCGTGTCC-3'
	DmHsp27R131G _{Fwd}	5'-GGAATGATCCAGGGTCACTTTGTGCGC-3'
	DmHsp27R131G _{Rev}	5'-GCACAAAGTGACCTGGATCATTCC-3'
	DmHsp27R135G _{Fwd}	5'-CGTCACTTTGTGGGCAAGTATACCCTGCC-3'
	DmHsp27R135G _{Rev}	5'-GGGCAGGGTATACTTGCCACAAAGTGACG-3'

Tableau A-1: Amorces utilisées lors du clonage et mutagenèse des différents mutants DmHsp27.

Les bactéries *E. coli* thermo-compétentes DH5 α (NEB) sont transformées avec ces plasmides, suivant la recommandation du fournisseur ; la désorganisation des lipides bactériens, sous l'effet de la chaleur, permet la formation de pores et l'entrée d'un plasmide contenant le gène d'intérêt. Dans un premier temps, une sélection sur milieu solide LB agar contenant 100 μ g/ml d'ampicilline (Biobasic Canada) est réalisée durant toute la nuit à 37 °C. Les clones d'intérêts sont ensuite repiqués dans un milieu LB liquide, en présence de l'ampicilline, et mis en culture à 37 °C pendant 16 heures avec agitation.

L'extraction des plasmides est réalisée à l'aide du kit Plasmid Miniprep (Qiagen). Le principe de cette technique repose sur une lyse alcaline des bactéries, suivie d'une

purification de l'ADN plasmidique sur une colonne de silice, se terminant par l'élution des plasmides. Une fois purifiés, les plasmides sont séquencés par 454 GS FLX Titanium afin de confirmer la présence de la mutation d'intérêt.

A.2 Expression et extraction des protéines recombinantes.

La souche bactérienne choisie pour l'expression de l'ensemble des protéines recombinantes est *E. coli* BL21 (DE3) (NEB). La transformation des bactéries est effectuée avec le même protocole pour les *E.coli* DH5 α . Les bactéries transformées sont mises en pré-cultures dans 10 ml de milieu de culture Luria-Bertani (LB) broth miller (EMD Millipore) contenant 100 μ g/ml d'ampicilline à 37 °C toute la nuit, sous agitation. Les pré-cultures bactériennes au 1 :50 dans 500 ml de milieu LB avec 100 μ g/ml d'ampicilline à 37 °C jusqu'à obtention d'une densité optique autour de 0.6 à 600 nm. L'expression protéique est alors induite par 0.1 mM d'isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), 5 h à 30 °C, sous agitation. L'induction est vérifiée par gel SDS-PAGE . DmHsp27 sans délétion a un poids est de 35.91 kDa, alors que la délétion de la région N-terminal donne un produit un induit de 26.32 kDa et le poids de la courte délétion FGFG (29-32) est de 35.50 kDa (Figure A.3). Les bactéries sont collectées par centrifugation, lavées deux fois avec le tampon de liaison 5 mM Imidazole, 500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8) et enfin le culot cellulaire sec est stocké à -80 °C jusqu'au jour de la purification.

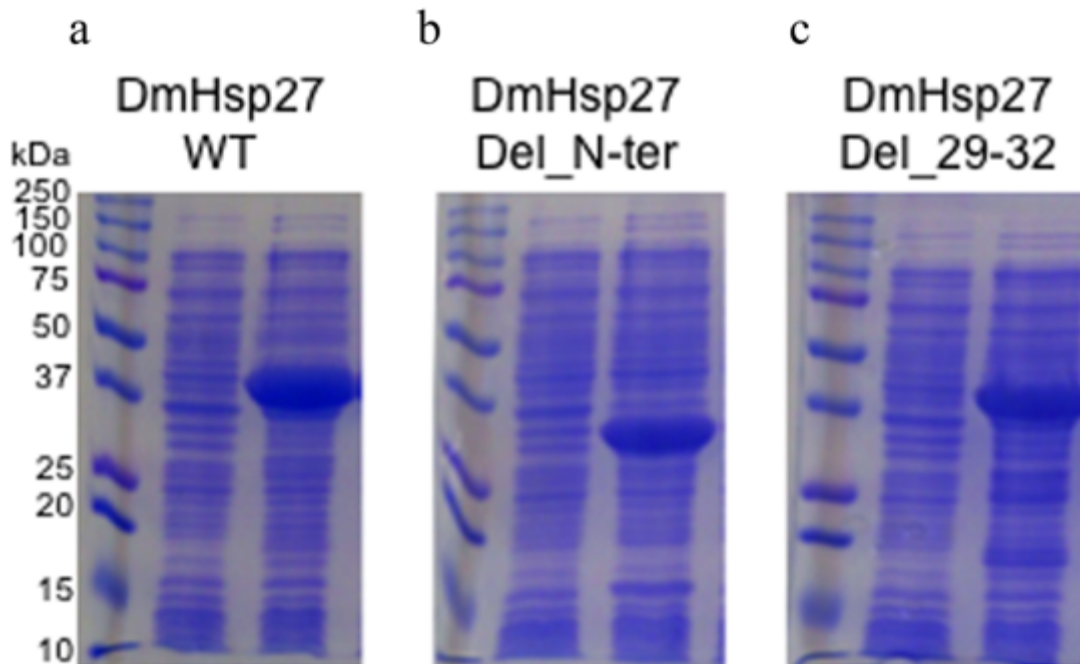


Figure A.4: Test d'inductibilité des mutants.

Piste 1 marqueur de poids moléculaire. Piste 2 : extrait bactérien non induit. Piste 3 : Extrait bactérien induit.

La lyse bactérienne s'est faite par reprise de culot bactérien dans 10 ml de tampon de liaison, auquel est ajouté 0.01 mg/ml de DNase et 4 mM de phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF). Les cellules sont lysées mécaniquement par la presse de FRENCH[®] (Aminco FRENCH[®] pressure cell press) dans la chambre froide (+7 °C). Les débris cellulaires et les cellules non lysées sont éliminées par centrifugation 10 .000 g à 4 °C pour 30 min. La chromatographie d'affinité s'est effectuée en condition native avec sur une colonne contenant des billes de nickel agarose, Ni-NTA agarose (Qiagen) pour la liaison par interaction ionique de l'étiquette His6-SUMO de la construction selon le protocole recommandé par Qiagen. La fraction soluble est incubée avec 1 ml de billes de nickel agarose. La colonne est lavée par la suite avec 30 ml du tampon de lavage (Lavage) (60 mM Imidazole, 500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8). La protéine liée a été éluée avec un tampon d'éluion (500 mM Imidazole, 500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8) (Figure A.4 a et b). L'éluat est soumis à des dialyses séquentielles pour le retrait de

l'imidazole avec du tampon de dialyse (20 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM DTT). Les protéines sont concentrées par centrifugation à l'aide de filtres (Amicon® Ultra-2ml, Merck Milipore) pour un poids moléculaire minimal de 10 kDa et la concentration déterminée par la méthode de Bradford (Bio-Rad protein Assay) (Figure A.5 a et b).

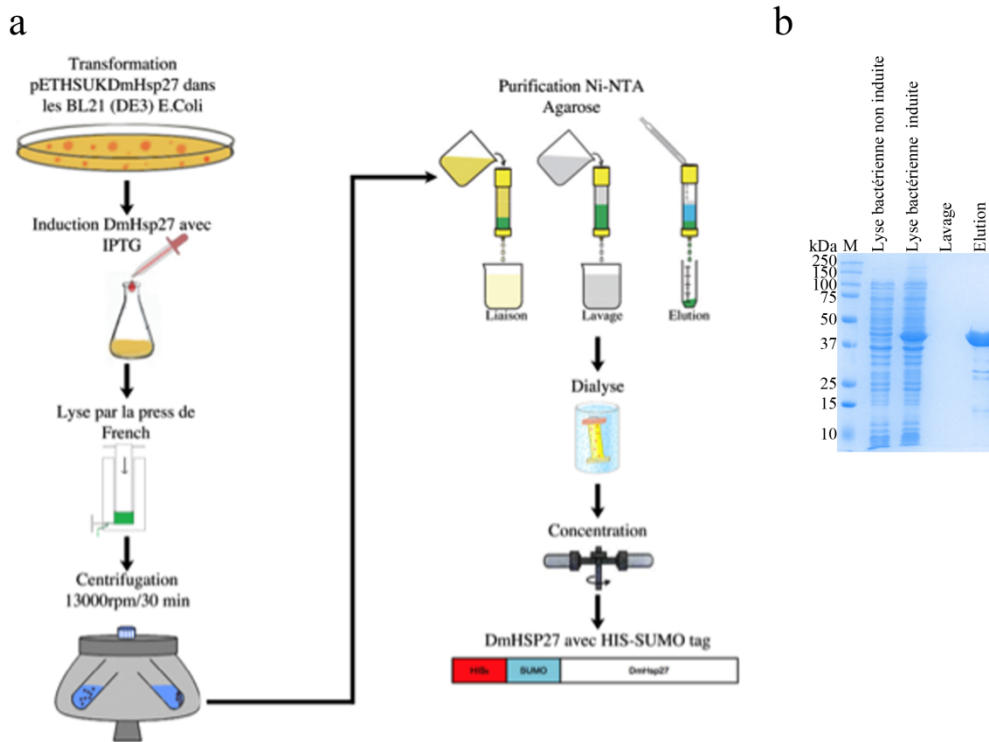


Figure A.5: Les différentes étapes de purification de DmHsp27.

Une fois les protéines purifiées et concentrées, l'étiquette His6-SUMO a été enlevée par une incubation une heure à 30 °C avec de la SUMO-hydrolase recombinante, qui possède elle aussi un étiquette-His6 (Figure A.5). Par la suite, une purification supplémentaire par chromatographie d'exclusion (SEC) sur une colonne Superose 6 10/300 column (GE lifesciences) équilibrée avec le tampon de dialyse nous a permis de séparer les protéines non digérées, l'étiquette His6-SUMO et de la SUMO-hydrolase-His6 de la protéine d'intérêt sans étiquette. Les fractions obtenues par SEC sont vérifiées par gel SDS-PAGE suivie d'une coloration bleue de coomassie ou par western blot en utilisant un anticorps spécifique (#2C8E11) contre DmHsp27 (Michaud et al., 2008). Les fractions pures

présentant DmHsp27 sont regroupées et concentrées en utilisant par centrifugation comme décrit précédemment (Figure A.5, Fraction pure).

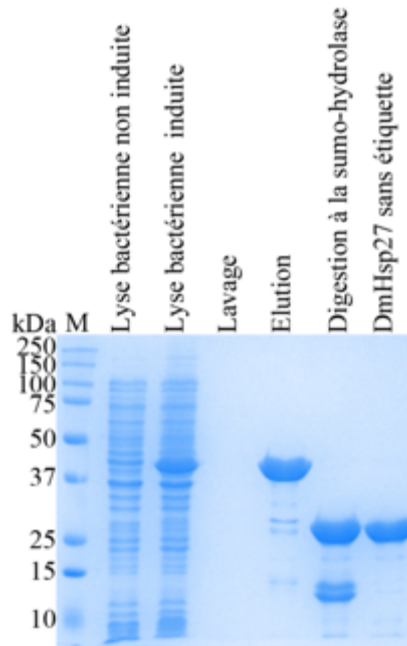


Figure A.6: Gel SDS 12% pour contrôle des différentes étapes de purification.

A.3 Séparation et analyse par chromatographie d'exclusion (ou SEC pour Size Exclusion Chromatography)

La SEC consiste à faire migrer les constituants à séparer sur une phase stationnaire immobile (billes poreuses) à l'aide d'une phase mobile liquide (tampon). Les molécules suffisamment petites pour passer par les pores des billes seront ralenties dans leur progression, alors que les molécules trop grosses pour entrer dans les billes progresseront rapidement en passant entre les billes. Les expériences ont été effectuées à température pièce ($\approx 22^\circ\text{C}$) et j'ai utilisé un système de chromatographie (ÄKTA pure 25, GE, Healthcare) sur une colonne Superose 6, 10/300 GL (GE lifesciences) avec une résolution optimale de 20 à 5000 kDa équilibrée avec le tampon de dialyse. Les standards de poids moléculaires utilisés sont immunoglobuline M (IGM) du sérum bovine (900 kDa)

(Sigma), thyroglobuline (669 kDa), ferritine (440 kDa), aldolase (158 kDa), conalbumine (75 kDa) et ovalbumine (44 kDa) et le bleu de dextran pour déterminer le volume mort V_0 (GE, Healthcare, Life Sciences). Ils sont utilisés pour la formation d'une courbe standard et l'estimation du poids moléculaire selon le volume d'élution des échantillons. La SEC est utilisée pour purification de DmHsp27 de l'étiquette et de la SUMO-hydrolase (comme décrits dans le paragraphe précédent) et aussi pour une analyse comparative des différents mutants. Pour les essais, le débit était de 0.5 ml par min, la lecture à 280 nm selon des unités arbitraires (mAU) et les fractions récupérées était de 0.5 ml et analysées sur gel SDS-PAGE coloré avec le bleu de coomassie. La SEC a l'avantage de séparer les molécules seulement selon la taille, ce qui permet de déterminer approximativement le poids moléculaire. Les inconvénients portent plus sur la complexité de la préparation de la colonne, la consommation du temps, la dilution de l'échantillon à la sortie de la colonne et l'obligation de charger l'échantillon dans un petit volume pour une résolution adéquate. Cela peut être problématique pour des protéines qui précipitent à des concentrations élevées.

A.4 SDS-PAGE électrophorèse et western blot

Les échantillons sont solubilisés dans le tampon d'échantillon (150 mM Tris HCl pH 6.8, 1.2% SDS, 30% glycérol, 15% β -mercaptoéthanol et 0.018 mg/ml de bleu de bromophénol), chauffés 5 min à 100 °C, centrifugés 5 min à 10.000 g. Les protéines sont déposées et séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (12%) en condition dénaturante (SDS-PAGE) en appliquant un courant électrique de 30 mA par gel. Le marqueur de poids moléculaire utilisé est le BIORAD (250 kDa, 150 kDa, 100 kDa, 75 kDa, 50 kDa, 37 kDa, 25 kDa, 20 kDa, 15 kDa et 10 kDa). La migration a lieu en utilisant tampon d'électrophorèse (25 mM Tris-base, 190 mM glycine, 0,1% SDS). Les gels sont incubés dans une solution de bleu de Coomassie (0,04 % bleu de coomassie brillant R250, 5 % méthanol, 10 % acide acétique) pendant 30 min à température ambiante sous agitation. Le gel est ensuite décoloré dans une solution de décoloration (5 % méthanol, 10 % acide acétique) jusqu'à ce qu'il soit transparent. Les gels sont ensuite quantifiés en utilisant le logiciel ImageJ version 1.48.

Pour les immunobuvardages, les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose 0,45 µm (BioRad) dans une cuve à transfert contenant du tampon de transfert (25 mM Tris-base, 190 mM glycine, 20% méthanol) à 100 V pendant une heure à 4 °C. Les protéines fixées sur les membranes ainsi que le marqueur de poids moléculaire sont révélés au rouge Ponceau (0.5 % rouge Ponceau (Invitrogen), 1 % acide acétique). Les membranes sont ensuite bloquées pendant une heure à température ambiante, sous agitation dans le blotto contenant (PBS1X, 5 % de lait en poudre). Les membranes sont incubées par la suite pendant une heure à température pièce avec les anticorps primaires appropriés dilués dans le blotto (Voir tableau 3.2), suivi par trois lavages au PBS-Tween 0.1 %. Les membranes sont incubées une heure avec les anticorps secondaires couplés conjugués à une peroxydase la HRP GAM-HRP ou GAR-HRP (Jackson ImmunoResearch Lab) dilués dans le blotto (Voir tableau 3.2) suivi par dernier lavage quatre fois pendant 10 minutes chacun avec du PBS-Tween 0.1 % avant de révéler le signal par le Clarity™ Western ECL Substrate (Bio-Rad Laboratories Inc.) en utilisant le Odyssey® Infrared Imaging System (Li-COR, Biosciences).

Protéine	Anticorps primaire	provenance	Dilution	Anticorps secondaire
Anti-DmHsp27	2C8E11	Laboratoire R.M Tanguay	1 :50	GAM-HRP
Anti-sentrine	21-98-P4	Laboratoire R.M Tanguay	1 :100	GAR-HRP

Tableau A-2: Caractéristiques des anticorps utilisés en western blot.

A.5 Électrophorèse native

Le gel natif (Novex® 4–12 % Tris-Glycine Mini Gels, Thermo Fisher scientific) est un gel de polyacrylamide avec gradient 4-12 % non dénaturant. Le mélange de molécules est soumis à un champ électrique ce qui entraîne leur migration dans une forme native en fonction de leur charge et leur masse. La résolution de ce gel est entre 20 et 2000 kDa. La structure quaternaire de DmHsp27 et ses mutants étaient définis par

migration de 25 µg d'échantillons dans un gel natif Novex® 4–12 % Tris-Glycine dans un système Mini-cell (Mini-Cell electrophoresis system, XCell SureLock, Life Technology). Le marqueur de poids moléculaire utilisé est le Novex native Marker (1236 kDa, 1048 kDa, 720 kDa, 480 kDa, 242 kDa, 146 kDa, 66 kDa et 20 kDa). Les gels sont migrés à 150 V pendant une heure et demie. Après électrophorèse, les complexes de protéines ont été colorés avec du bleu de Coomassie.

Les avantages de l'électrophorèse native résident principalement sur la rapidité (possibilité d'analyser 10 échantillons sur le même gel), la grande résolution et nécessite une faible concentration de l'échantillon. Le seul inconvénient est la séparation des échantillons selon la taille et la charge ce qui pourrait être difficile à interpréter dans le cas de mutants avec gain ou perte de charge.

A.6 Essais in vitro de prévention d'agrégation de substrats

A.6.1 Les conditions de stress thermique

Suite à un stress thermique, les protéines perdent leur conformation native et exposent les surfaces hydrophobes ce qui amène à la formation d'agrégats. Les sHsps fonctionnellement actives lient les substrats non natifs et empêchent l'agrégation par la formation de complexe (réservoirs) sHsps/substrat (Figure A.6).

Les essais chaperon ont été effectués essentiellement tel que décrit par (Morrow et al., 2006). La luciférase (0.09 mg/ml, Promega) est dénaturée par le stress thermique à 42 °C pendant 30 min. L'agrégation est déterminée par la diffusion de la lumière à 340 nm à l'aide spectrophotomètre avec des cellules thermostatées (Varian Cary 100, Montreal, Quebec, Canada) avec des cuvettes semi-micros en acrylique (Sarstedt). L'incubation du substrat seul a permis d'établir le pourcentage relatif d'agrégation en fonction du temps. Le pourcentage d'agrégation du substrat en présence des différents mutants est calculé par la moyenne de 3 essais différents \pm la déviation standard (SD). DmHsp27WT utilisées comme contrôle positif (Morrow et al. 2006) et de l'albumine sérique bovine (BSA) comme contrôle négatif.

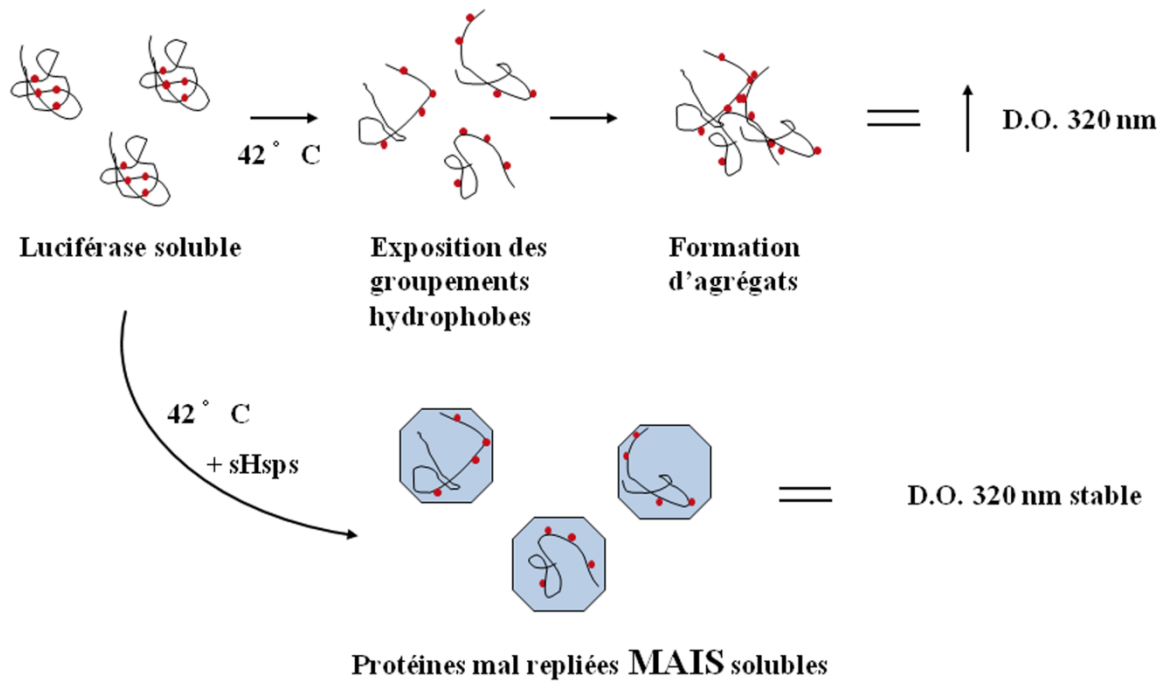


Figure A.7: Principe de la prévention d'agrégation par les sHsps de la luciférase induite par la chaleur *in vitro*.

A.6.2 Les conditions de stress réductifs

L'activité chaperon est déterminée aussi par agrégation d'insuline comme résultat de la réduction des ponts disulfures (Holmgren, 1979) (Figure A.7). Pour ce faire, 0.3 mg/ml d'insuline (Sigma) dans un tampon 10 mM potassium phosphate, 100 mM NaCl (pH 8) été incubé seul ou en présence de la même concentration de DmHsp27 ou les mutants pendant 30 min à 20 °C. La réaction est démarrée par l'addition de dithiothreitol (DTT) jusqu'à une concentration finale de 20 mM. L'agrégation de l'insuline a été suivie d'une augmentation de la densité optique à 340 nm sur un spectrophotomètre. Les données sont représentatives de 3 essais différents et exprimés par la moyenne \pm la déviation standard (SD).

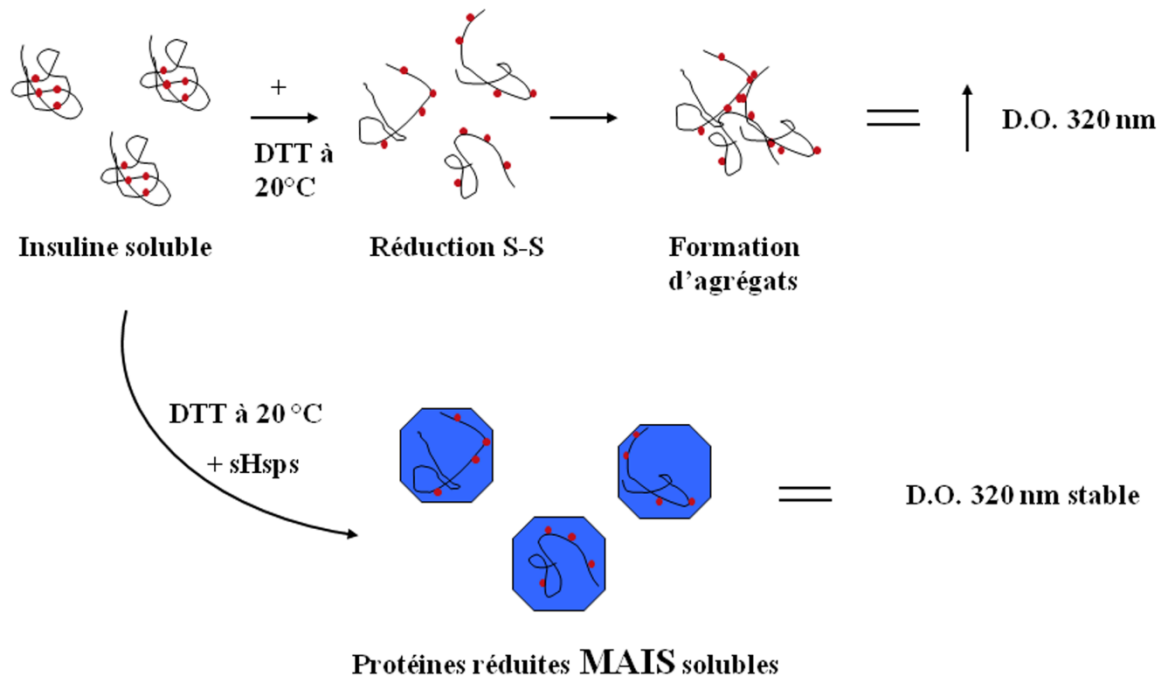


Figure A.8: Principe de la prévention d'agrégation par les sHsps de l'insuline induite par la réduction des ponts disulfures *in vitro*.

A.7 La spectroscopie de fluorescence

La spectroscopie de fluorescence appelée aussi spectrofluorométrie s'appuie sur le phénomène de fluorescence. Après l'excitation par une onde électromagnétique, le rayonnement émis par des molécules revient à leur niveau d'énergie inférieur, ce qui se traduit par une émission très rapide de la lumière. Les fluorescences sont divisées en deux catégories selon leur origine : extrinsèques et intrinsèques. La fluorescence intrinsèque de tryptophane est utilisée pour caractériser les mutants et aussi pour analyser les changements conformationnels induits par la température de DmHsp27 et de ses mutants. Celle-ci est mesurée à 20 °C dans un tampon de fluorescence (20 mM HEPES-KOH pH 8) à une concentration de protéine égale à 0.2 mg/ml. Les spectres de fluorescence ont été mesurés en utilisant une longueur d'onde d'excitation de 295 nm (largeur de fente 5 nm) et enregistrés dans l'intervalle de 300 à 400 nm (largeur de fente 5 nm) sur un Varian Cary Eclipse spectrofluoromètre avec des cuvettes standard, UV grade en polyméthylméthacrylate (VWR).

Dans ce cas, 0.2 mg/ml de DmHsp27 dans un tampon de fluorescence est chauffé à une vitesse constante de 1 °C/min de 20 à 90 °C et refroidi à nouveau à la même vitesse. Le tryptophane a été excité à 297 nm (largeur de fente 5 nm) et la fluorescence enregistrée à 332 nm (largeur de fente 5 nm). Cette technique a l'avantage d'être rapide avec une très grande sensibilité de détection (plus sensible que le détecteur UV-Visible) et une facilité d'acquisition des données qui repose sur la fluorescence intrinsèque et aucune modification éventuelle des structures.

A.8 La diffusion dynamique de la lumière (ou DLS pour Dynamic Light Scattering)

La DLS nous permet de déterminer les tailles et les pourcentages de polydispersité des macromolécules en solution. Ces macromolécules sont soumises à des mouvements aléatoires appelés mouvements browniens ce qui cause des fluctuations de l'intensité de la lumière diffusée dépendamment du temps. La mesure de ces fluctuations sur des courts intervalles de temps peut être directement corrélée à la mobilité des molécules en solution. Les petites molécules plus mobiles produisent des signaux qui fluctuent rapidement, alors que les grosses molécules moins mobiles engendrent des signaux qui fluctuent lentement.

L'appareil utilisé pour la DLS est un DynaPro (Wyatt Technology Corp., Santa Barbara, CA). La source incidente est un laser de 830 nm de longueur d'onde et la lumière diffusée est recueillie à 90 ° par une fibre optique jusqu'à un détecteur relié à un corrélateur et un ordinateur. La visualisation et le traitement des données sont faits via le programme Dynamic version 6 et consiste à calculer le rayon hydrodynamique (R_h) et le pourcentage de polydispersité (% Pd). La concentration des échantillons est ajustée à 2 mg/ml. Tous les échantillons sont passés à travers des filtres 0.22 μm . Le volume d'échantillon était de 80 μl , le temps de corrélation τ est de 0,5 μs et le temps d'acquisition était de 10 s pour une mesure totale pouvant aller jusqu'à une heure. La température de l'échantillon a été contrôlée par une cellule à effet Peltier avec une précision de 0.1 °C. L'intensité diffusée (I_s) a été enregistrée pour l'ensemble des échantillons sur une période de une heure pour chaque température. Les principaux avantages de la DLS sont sa

rapidité d'exécution, la non-altération du matériel biologique, et l'économie, car elle nécessite un faible volume de produit et ne requiert aucun réactif. Parmi les inconvénients je peux citer la grande sensibilité de l'appareil, car la présence de microbulles ou poussières fausse la mesure.

A.9 Modélisation moléculaire par homologie

La modélisation par homologie a pour principe de partir d'une séquence protéique connue et de rechercher des séquences homologues dont la structure tridimensionnelle connue. Les protéines homologues ont pour caractéristique d'avoir des structures secondaires et tertiaires relativement bien conservées même si au niveau de la séquence primaire cette conservation est beaucoup moins importante. Les séquences du domaine alpha cristallin (ACD) de DmHsp27 de *D.melanogaster* et HspB1 de l'humain (PDB : 4MJH) présentent 70% de similarité et 53% d'identité ce qui présente des conditions appropriées pour construire par homologie le modèle tridimensionnel du domaine ACD de DmHsp27. La modélisation est menée avec SWISS-MODEL (Biasini et al., 2014). Dans un premier temps, un alignement de la séquence dont la structure tridimensionnelle est connue et la séquence à modéliser est utilisé comme entrée pour générer des modèles atomiques pour la séquence cible à l'aide ProMod-II. Le meilleur modèle est choisi par le contrôle de qualité par calcul d'une note « QMEAN » via une comparaison de la force et des caractéristiques géométriques du modèle (distances atomiques, les angles de torsion, accessibilité du solvant). La visualisation du modèle est réalisée avec le logiciel PyMOL (<http://pymol.org/>).

A.10 Culture cellulaire et transfection

La lignée cellulaire HeLa (lignée cellulaire humaine provenant de métastases d'un cancer du col de l'utérus) et L929 (lignée cellulaire adipeuse de la souris) sont cultivées dans le milieu DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) et RMPI (Roswell Park Memorial Institute medium) additionné de glutamax (4 mM) de Invitrogen, de Pénicilline (100 unités/ml) de Invitrogen et de Streptomycine (50 pg/ml) de Invitrogen et de sérum

de bovin fœtal (FBS) pour une concentration finale de 10 %. Les cellules sont incubées à 37 °C et 5 % CO₂. Les lignées cellulaires sont passées deux à trois fois par semaine en décollant les cellules avec de la trypsine (500 ng/ml).

Pour la transfection, les cellules sontensemencées sur des lamelles (18 mm x 18 mm), et transfectées 24 h plus tard à une confluence de 70 % avec un mélange de liposomes commercial (Lipofectamine 2000; Invitrogen) selon les recommandations du fabricant, en utilisant 2 µg d'ADN plasmidique à un ratio ADN:liposome de 1:3. Les cellules sont incubées 4 heures avec le mélange ADN/liposome, lavées 2 fois avec du milieu de culture sans antibiotique et incubées à différents temps avant l'immunofluorescence indirecte.

A.11 Immunofluorescence indirecte

Les cellules transfectées sont incubées à 37 °C. Différents temps après la transfection comme indiquée dans les résultats, les cellules sont lavées deux fois avec le PBS1X froid, puis sont fixées et perméabilisées pendant 10 minutes à -20 °C dans une solution de méthanol. Les lamelles sont ensuite séchées à l'air libre. Après réhydratation dans du PBS1X, les cellules sont incubées pendant une heure à 37 °C avec du PBS1X contenant 5 % d'albumine bovine et Triton 0.1 % afin de bloquer les sites non spécifiques. Les cellules sont ensuite incubées avec l'anticorps primaire dilué dans du PBS contenant 5 % d'albumine bovine et Triton 0.1 % (se référer au tableau 3.3 pour les caractéristiques et dilutions des anticorps) pendant une heure à 37 °C. Les cellules sont lavées trois fois pendant 10 min avec du PBS1X-Tween 0.1 %, pour être ensuite incubées avec l'anticorps secondaire fluorescent approprié : Alexa 488 ou Alexa 594 (Invitrogen) dilués dans du PBS contenant 5 % d'albumine bovine et Triton 0.1 %, pendant 45 min dans l'obscurité. Les préparations sont ensuite lavées trois fois pendant 10 min. Pour la double immunofluorescence, les cellules sont incubées avec un deuxième anticorps primaire en suivant les mêmes étapes citées ci-dessus.

Pour colorer l'ADN, les cellules ont été mises en contact avec le DAPI (Dihydrochlorure de 4',6-diamidino-2-phenylindole, 1 :5000, dilué dans le tampon PBS) pendant 1 minute, rincées deux fois avec du PBS1X. Finalement, les lamelles sont montées sur lames avec

le milieu de montage vectashield mounting medium (Vector Laboratories). Les images sont prises en utilisant un objectif à immersion dans l'huile 63X avec un microscope Axio Observer Z1.