

Université de Montréal

**Les inclusions intranucléaires de la dystrophie  
musculaire oculopharyngée (DMOP)  
Relation entre composition, localisation et expression**

par

Arnaud F. Klein

Programme de Biologie Moléculaire

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Docteur  
en Biologie Moléculaire

Novembre 2007

© Arnaud F. Klein, 2007



QH

506

054

2008

1/06

## AVIS

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

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

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

## NOTICE

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

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

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

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

**Les inclusions intranucléaires de la dystrophie musculaire oculopharyngée (DMOP)**  
Relation entre composition, localisation et expression

présentée par :  
Arnaud F. Klein

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Président-rapporteur	Dr. Muriel Aubry
Directeur de recherche	Dr. Bernard Brais
Membre du jury	Dr Daniel Sinett
Examineur externe	Dr Edward Fon
Représentant du doyen de la faculté de médecine	Dr Muriel Aubry

## Résumé

La dystrophie musculaire oculopharyngée (DMOP) est maladie tardive à transmission autosomique dominante caractérisée par une ptose, une dysphagie et une faiblesse des muscles de la racine des membres. Les mutations causant la maladie ont été identifiées dans le gène codant pour la Poly(A) Binding Protein Nuclear 1 (PABPN1) et consistent en des expansions de séquences (GCN) / polyalanine dans la partie N-terminale de la protéine. Le principal marqueur pathologique de la DMOP est la présence d'inclusions intranucléaires (IINs) dans les fibres des muscles squelettiques. Ces IINs sont fibrillaires avec une structure en palissade et sont riches en PABPN1. Leur rôle dans la pathologie est encore mal connu. Pour étudier ces IINs et leur impact, nous avons développé un modèle cellulaire de la DMOP, en surexprimant PABPN1 à l'aide d'adénovirus. Cette expression induit la formation d'IINs qui partagent de nombreuses caractéristiques des IINs de la DMOP. Ce modèle nous a permis de définir le profil d'expression des cellules en réponse à la surexpression de PABPN1 et à la formation d'IINs. Cette étude a révélé, entre autres, que de nombreux gènes codant pour des protéines nucléaires, en particulier avec un domaine de liaison à l'ARN, étaient surexprimés en réponse à la formation des IINs. L'hypothèse que cette surexpression soit due à la séquestration des protéines dans les inclusions nous a permis d'identifier trois nouveaux constituants des IINs de la DMOP (CUGBP1, SFRS3, FKBP1A). Cependant, l'impact de ces petites expansions du domaine polyalanine n'étant pas clairement établi, nous avons décidé d'étudier les effets de mutations importantes (grandes expansions à plus de 25 alanines ou une délétion du domaine) sur le comportement de PABPN1. Ces études montrent que le domaine polyalanine a une influence sur l'agrégation de PABPN1 et potentiellement sur son transport nucléaire, et soulignent l'importance de la structure N-terminale de la protéine. Par ailleurs, l'observation que de grandes expansions conduisent à une diminution des niveaux de PABPN1 et à une plus grande toxicité sans former d'IINs suggère qu'un mécanisme de perte de fonction pourrait avoir un rôle dans la maladie. Ces études soulignent aussi la particularité de PABPN1 et la DMOP par rapport aux autres maladies à expansion de domaine polyalanine. Pour conclure, les résultats présentés dans cette thèse démontrent que les IINs ont un rôle actif dans la pathologie, mais suggèrent aussi que des mécanismes indépendants des inclusions intranucléaires peuvent jouer un rôle dans la physiopathologie de la DMOP.

**Mots-clés :** polyalanine, PABPN1, polyadénylation, liaison à l'ARN, adénovirus, modèle cellulaire, profil d'expression, polyglutamine,

## Abstract

Oculopharyngeal muscular dystrophy (OPMD) is an autosomic dominant disease with a late onset and characterized by ptosis, dysphagia and proximal muscle weakness, which appear progressively. Disease-causing mutations were identified in the gene encoding the Poly(A) Binding Protein Nuclear 1 (PABPN1) and consist of a (GCN) / polyalanine expansion in the N-terminal part of the protein. The pathological hallmark of OPMD is the presence of intranuclear inclusions (INI) in skeletal muscle fibers. These INIs are composed of tubular filaments arranged in tangles and are PABPN1-rich. The role of the INIs in pathology is still unknown. To understand the impact of such inclusions, we generated a cellular model of OPMD by overexpressing PABPN1 using adenoviruses. The infected cells exhibited the formation of INIs that share many features with OPMD INIs. This adenoviral model allowed us to study the expression profile of cells in response to PABPN1 overexpression and INIs formation. This expression study revealed that a large number of genes coding for nuclear proteins, especially with a RNA-binding activity, were upregulated in cells infected with mutated PABPN1. The hypothesis that these expression modifications were in part due to a protein sequestration in INIs allowed us to identify three new components of OPMD INIs (CUGBP1, SFRS3 and FKBP1A). However, as the impact of these small expansions in PABPN1 polyalanine tract is still largely unclear, we decided to study the consequences of large mutations (e.g. large expansions to a more than 25 alanines tract or deletion of the domain) on PABPN1 behavior. Our studies show that the polyalanine tract has an influence on PABPN1's aggregation and potentially on its nuclear transport. Furthermore, our results stress the importance of the whole N-terminal structure of the protein. In addition, the observation that large expansions led to decreased protein levels and increased toxicity without forming inclusions suggests that a loss of function mechanism should be at play in OPMD and underlines the particularity of PABPN1 and OPMD compared to the other polyalanines diseases. To conclude, the results presented in this thesis bring new evidences that INIs play an active role in OPMD and strongly suggest that INI-independent mechanisms could take part in the physiopathology of OPMD.

**Keywords** : polyalanine, PABPN1, polyadenylation, RNA-binding, adenovirus, cellular model, expression profile, polyglutamine,

# Table des matières

## Chapitre 1 : Introduction à l'étude de la dystrophie musculaire oculopharyngée ..... 1

1.1. La dystrophie musculaire oculopharyngée (DMOP) .....	1
1.1.1. Historique .....	1
1.1.2. Phénotype de la DMOP .....	4
1.1.3. Génétique Moléculaire .....	10
1.2. Poly(A) Binding Protein Nuclear 1 - PABPN1 .....	13
1.2.1. Structure .....	13
1.2.2. Fonctions et localisation cellulaire de la protéine .....	20
1.2.3. Les protéines liant les séquences poly(A) (PABP) .....	25
1.3. Les modèles d'études de la DMOP .....	27
1.3.1. Les modèles cellulaires de la DMOP .....	27
1.3.2. Les modèles animaux de la DMOP .....	32
1.4. Les domaines polyalanines .....	34
1.4.1. Les domaines polyalanines chez l'homme .....	34
1.4.2. Agrégation des polyalanines .....	38
1.4.3. Comparaisons entre les maladies à expansion de domaines polyalanines et polyglutamines .....	41
1.5. Mécanismes physiopathologiques et approche expérimentale .....	45

## Chapitre 2 : La surexpression de PABPN1 entraîne la régulation positive de nombreux gènes codant pour des protéines nucléaires qui sont séquestrées dans les IINs de la DMOP..... 47

Contribution des co-auteurs .....	47
<i>PABPN1</i> overexpression leads to upregulation of genes encoding nuclear proteins that are sequestered in oculopharyngeal muscular dystrophy nuclear inclusions.....	48
Abstract .....	49

Introduction .....	50
Materials and methods .....	53
Results .....	60
Discussion .....	66
Acknowledgements .....	70
<b>Chapitre 3 : La délétion ou de grandes expansions dans le domaine polyalanine de PABPN1 modifient son agrégation et son expression. ....</b>	<b>84</b>
Contribution des co-auteurs .....	84
PABPN1 polyalanine tract deletion and long expansions modify its aggregation pattern and expression .....	85
Abstract .....	86
Introduction .....	87
Material and methods .....	91
Results .....	97
Discussion .....	103
Acknowledgments .....	106
<b>Chapitre 4 : Discussion générale et conclusion .....</b>	<b>117</b>
4.1. Principaux résultats obtenus.....	117
4.2. Impact cellulaire de la formation des IINs et de la surexpression de PABPN1 .....	119
4.2.1. Validation d'un modèle cellulaire de la DMOP .....	119
4.2.2. Modification du profil d'expression .....	121
4.3. Composition des IINs et conséquences possibles de leur formation .....	124
4.3.1. Recrutement des chaperonnes et du système ubiquitine-protéasome .....	124
4.3.2. Les IINs séquestrent des facteurs de maturation des ARNm .....	125
4.3.3. Les IINs séquestrent CUGBP1 .....	128
4.3.4. Composition en ARN messagers des IINs .....	129
4.3.5. Les IINs : toxiques, protectrice ou les deux ? .....	130

4.4. Le domaine polyalanine de PABPN1 .....	131
4.4.1. Impact du domaine polyalanine sur l'agrégation de PABPN1. ....	132
4.4.2. Impact du domaine polyalanine sur la conformation de PABPN1 .....	134
4.4.3. Mécanismes communs : l'effet polyalanine?.....	135
4.5. Conclusion : vers un modèle physiopathologique de la DMOP. ....	138
<b>Bibliographie .....</b>	<b>141</b>
<b>Annexe 1 : Accords des co-auteurs .....</b>	<b>xix</b>
<b>Annexe 2 : Permissions des éditeurs.....</b>	<b>xx</b>

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1:</b> Répartition des symptômes chez les patients atteints de la DMOP.....	5
<b>Tableau 2:</b> Les maladies causées par des expansions de domaine polyalanine.....	36
<b>Table 3:</b> Gene expression changes in cells expressing His-bPABPN1mut 48 h post-infection.....	71
<b>Table 4 :</b> Proteins that colocalize with PABPN1 in the INIs of the adenoviral model and OPMD muscle.....	75

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Caractéristiques cliniques et pathologiques de la DMOP .....	8
<b>Figure 2</b> : Composition des inclusions intranucléaires de la DMOP:.....	9
<b>Figure 3</b> : Génétique moléculaire et répartition géographique de la DMOP .....	12
<b>Figure 4</b> : Localisation et représentation du gène <i>PABPN1</i> .....	14
<b>Figure 5</b> : Structure de la protéine PABPN1 et sa conservation entre différentes espèces..	16
<b>Figure 6</b> : Localisation nucléaire de PABPN1 .....	21
<b>Figure 7</b> : Les mécanismes de polyadénylation chez les mammifères .....	23
<b>Figure 8</b> : La surexpression de PABPN1 provoque la formation d'IINs.....	29
<b>Figure 9</b> : Les IINs induites par l'expression de PABPN1 sont dynamiques.....	30
<b>Figure 10</b> : Comparaison des mutations observées dans les maladies à expansions de domaine polyalanine et polyglutamine. ....	44
<b>Figure 11</b> : Schematic representation of the inducible expression cassette of the adenoviral vectors and structure of the <i>PABPN1</i> gene. ....	76
<b>Figure 12</b> : Overexpression of <i>PABPN1</i> in A549tTA cells. ....	77
<b>Figure 13</b> : Characterization of INIs produced by <i>PABPN1</i> expression in A549tTA cells using immunofluorescence microscopy.....	78
<b>Figure 14</b> : Characterization of INIs produced by <i>PABPN1</i> expression in A549tTA cells using electron microscopy.....	79
<b>Figure 15</b> : Expression profile in cells expressing mutant <i>PABPN1</i> .....	80
<b>Figure 16</b> : Analysis of differential frequency of Gene Ontology (GO) terms in microarray data. ....	81
<b>Figure 17</b> : Colocalization of proteins encoded by upregulated genes with PABPN1 in intranuclear inclusions of the adenoviral model. ....	82

<b>Figure 18</b> : Colocalization of proteins encoded by upregulated genes with PABPN1 in intranuclear inclusions of OPMD muscle. ....	83
<b>Figure 19</b> : Graphic representation of PABPN1 and the various expression constructs. ...	107
<b>Figure 20</b> : Expression of large expanded (25-40Ala) hPABPN1 does not lead to INI formation. ....	108
<b>Figure 21</b> : Deletion of the polyalanine tract changes the aggregation of PABPN1 to a perinuclear pattern. ....	109
<b>Figure 22</b> : Deleted PABPN1-0Ala accumulations disturb the nuclear membrane. ....	110
<b>Figure 23</b> : Expansions and deletion of the PABPN1 polyalanine tract lead to decreased protein/mRNA ratios. ....	111
<b>Figure 24</b> : The observed relative decrease in PABPN1 protein levels are likely due to an increase in clearance of the mutated protein. ....	112
<b>Figure 25</b> : Expression of PABPN1 with large or deleted polyalanine tracts reduces cell survival. ....	113
<b>Figure 26</b> : The absence of co-aggregation of polyalanine proteins. ....	114
<b>Figure 27 (Supp. 1)</b> : C-terminal GFP-tagged hPABPN1 forms inclusions in cells. ....	115
<b>Figure 28 (Supp. 2)</b> : Absence of co-aggregation between polyalanine proteins. ....	116
<b>Figure 29</b> : Les IINs séquestrent des protéines nucléaires provenant des complexes RNP au cours de la maturation des ARNm. ....	127
<b>Figure 30</b> : Modèle d'agrégation des protéines qui possèdent un domaine polyalanine. ....	137
<b>Figure 31</b> : Modèle des mécanismes physiopathologiques qui conduisent à la DMOP. ....	140

## Liste des sigles et abréviations

a.a.	Acide aminé
ADN	Acide désoxyribonucléique
Ala	Alanine
Ala	Alanine
AP1G1	Adaptor-related protein complex 1 G1
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARX	Aristaless related homeobox
ATP	Adénosine triphosphate
BHLHB3	Basic helix-loop-helix domain containing, class B, 3
BIG2 / ARFGEF2	ADP-ribosylation factor guanine nucleotide-exchange factor 2 (brefeldin A-inhibited)
bPABPN1	bovine PABPN1
BPES	Blepharophimosis, ptosis, and epicanthus inversus syndrome
BRG1/SMARCA4	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin A4
BUB1B	Budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog beta
CBC	Cap-binding complex
CBP20	Cap-binding protein 20
CBP80	Cap-binding protein 80
CCD	Displagie cléidocraniale
CCHS	Congenital central hypoventilation syndrome
CCNA2	Cyclin A2
CF-Iim	Cliveage Factor 2
CF-Im	Cliveage Factor 1
CMV	Cytomegalovirus
CPSF	Cleavage and polyadenylation specific factor

CstF	Cleavage Stimulation Factor
CTD	C-terminal domain
CUGBP1	(CUG) binding Protein 1
CuO	Cumate operator
DEEPEST/SPAG5	Sperm associated antigen 5
DM	Dystrophie myotonique / Dystrophia Myotonica
DMOP	Dystrophie musculaire ocylopharyngée
DMPK	dystrophia myotonica-protein kinase
DNA	Desoxuribonucleic acid
DRPLA	dentatorubral-pallidoluysian atrophy
EIF4E	Eukaryotic translation initiation factor 4E
EIF4G	Eukaryotic translation initiation factor 4G
EIF5	Eukaryotic translation initiation factor 5
EM	Electronic microscopy
FBS	Fœtal bovine serum
Fig.	Figure
ISH	Fluorescent <i>in situ</i> hybridization
FKBP1A/FKBP12	FK506-binding protein 1A
FOXL2	Forkhead box L2
FOXM1	Forkhead box M1
GFP	Green fluorescent protein
GO	Gene ontology
HD	Huntington disease
HFGS	Hand-foot-genital syndrome
HMGB2	High-mobility group box 2
HNRPA/B	Heterogenous ribonucleoprotein A/B
HNRPA1	Heterogenous ribonucleoprotein A1
HNRPA3	Heterogenous ribonucleoprotein A3
HNRPC	Heterogenous ribonucleoprotein C

HOXA13	Homeobox A13
HOXD13	Homeobox D13
hPABPN1	human PABPN1
HPE5	Holoprocencephaly type 5
HPE5	Holoprocencephalie de type 5
HSP40	Heat shock protein 40
HSPA1B / HSP70	Heat shock protein A1B
IBM	Inclusion body myositis/ Myosite à corps d'inclusions
IIN	inclusion intranucléaire
INI	intranuclear inclusion
ISSX/MR	Infantile spasm syndrom X-linked / Mental retardation
ITCH	Itchy homolog E3 ubiquitin protein ligase
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
LAMP2	Lysosomal-associated membrane protein 2
LMNB1	Lamin B1
MBNL	Muscleblind
MOI	Multiplicity of infection
MRGH	Mental retardation with Grothw hormone deficiency
Mut.	mutated
MYOD1	myogenic differentiation 1
MYOG	myogenin (myogenic factor 4)
NLS	Nuclear localization signal / signal de localisation nucléaire
NMD	Nuclear mRNA decay
NSAP1/SYNCRIP	Synaptotagmin binding, cytoplasmic RNA interacting protein
NUP153	Nucleoporin 153kDa
OD	Oligomerization domain
OPMD	Oculopharyngeal muscular dystrophy
P4HB	Prolyl 4-hydroxylase, beta polypeptide

PABP2	Poly(A) binding protein 2
PABPC1	Poly(A) binding protein cytoplasmic 1
PABPC3	Poly(A) binding protein cytoplasmic 3
PABPC4	Poly(A) binding protein cytoplasmic 4
PABPC5	Poly(A) binding protein cytoplasmic 5
PABPN1	Poly(A) binding protein nuclear 1
PAIP1	Poly(A) binding protein interacting protein 1
PAIP2	Poly(A) binding protein interacting protein 2
PAP	Poly(A) polymérase
pb	Paire de base
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PFA	Paraformaldehyde
pfu	Plaque forming unit
PHOX2B	Paired-like homeobox 2b
PRMT1	protein arginine methyltransferase 1
PRMT3	protein arginine methyltransferase 3
RAB14	RAB14, member RAS oncogene family
RAB2	RAB2, member RAS oncogene family
RAE1	RAE1 RNA export 1
RAN	RAN, member RAS oncogene family
RBM3	RNA binding motif (RNP1, RRM) protein 3
RGG	Arginine/glycine/glycine
RNA	Rinucleic acid
RNAPOL2	RNA polymerase 2
RNP	Ribonucleoprotein
RNU17D/SNHG3	Small nucleolar RNA host gene (non-protein coding) 3
RPL15	Ribosomal protein L15
RPL5	Ribosomal protein L5

RRM	RNA recognition motif
RUNX2	Runt-related transcription factor 2
S100P	S100 calcium binding protein P
SBMA	Spinal and bulbar muscular atrophy, X-linked / Kennedy disease
SCA	Spinocerebellar ataxia
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SERP1	Stress-associated endoplasmic reticulum protein 1
SFRS2 /SC35	Splicing factor, arginine/serine-rich 2
SFRS3	Splicing factor, arginine/serine-rich 3
SGCB	Sarcoglycan Beta
SKIP	Ski-interacting protein
SNW1 / SKIP	SNW containing protein 1
SOX3	SRY (sex determining region Y)-box 3
SPD	Sinpolydactily
TACC3	Transforming, acidic coiled-coil containing protein 3
TBX2	T-box 2
TLE3	Transducin-like enhancer of split 3
TNFSFRS10D	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10d, decoy with truncated death domain
TNPO1	Transportin 1
TSA	Tet-free system approved
tTA	tetracyclin-regulated transactivator
UTR	Untranslated region
wt	Wild-type
YFP	Yellow fluorescent protein
YKT6	YKT6 v-SNARE homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )
ZIC2	Zic family member 2 (odd-paired homolog, <i>Drosophila</i> )
ZNF358	zinc finger protein 358
ZNF9	Zinc finger protein 9

*Je voudrais dédicacer cette thèse à tous les membres de ma famille  
et aux amis que j'ai laissés en France pour venir effectuer mon doctorat, ici, au Québec.  
Même si nos chemins ont été séparés pendant ces quelques années,  
même si nous avons tous un peu changé au fil des saisons passées,  
je reste persuadé que les liens qui nous unissaient alors  
ne pourront être qu'encore plus forts.*

## Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier mon directeur de recherche, le Dr. Bernard Brais, sans qui rien ne serait arrivé. Je le remercie pour son optimisme, son suivi et son soutien au cours de ces années. Je le remercie surtout pour croire en moi en tant que chercheur et pour avoir essayé de m'enseigner tout ce que cela implique. J'espère ne pas avoir été un trop mauvais élève.

Je remercie ensuite toutes les personnes qui ont peuplées mon quotidien dans le laboratoire de neurogénétique et sans qui ma vie d'étudiant aurait été beaucoup plus fade: Marie-Josée D, Louis-Philippe, Anne Marie, Antoine, Isabelle G., Katel, Marie-Josée S., Anik, Martine, Christine, Martin, Josée, Jonathan, Isabelle T., Mitsuru, Elsa, Véronique, Catherine, Maria, Natascha, Céline ainsi que tous les étudiants qui sont venus faire des stages parmi nous.

Je tiens à remercier tout particulièrement Marie-Josée "Madame D" Dicaire, pour tout ce qu'elle a fait pour moi au cours des années que j'ai passé en sa compagnie. Je la remercie pour tout ce qu'elle m'a appris dans le laboratoire, pour sa disponibilité, et pour les discussions que nous avons eu. Je la remercie aussi, en l'associant à Denis et Mathieu, pour les soirées, la piscine, les vacances au Lac, les concerts, la musique, les fêtes en famille pour Noël et la St-Jean ("Saskatchewaaaaann!"), aussi pour la bonne humeur et les bonnes bouffes. Tu seras toujours la bienvenue chez moi.

Je tiens également à remercier Isabelle, Anne Marie, Antoine et Louis-Philippe qui ont été mes premiers compagnons de laboratoire, qui m'ont fait découvrir les références culturelles qu'il me manquait en arrivant au Québec et qui, je l'espère resteront des amis même à un océan de distance. Je remercie également Véronique et Catherine, mes complices des dernières années dont la bonne humeur et le rire me manqueront.

Je profite de ces remerciements pour saluer chaleureusement Angélique et Jean-Sébastien et les remercier pour leur amitié. Je me demande sincèrement ce que nous allons faire sans vous une fois de l'autre côté, une fois les Troupes éloignées. Je remercie aussi toutes les personnes qui nous ont aidé à passer d'agréables moments au Québec et toutes les personnes que nous avons côtoyées au cours de ces cinq années. Nos chemins se recroiseront sûrement.

Pour finir, ces remerciements ne pourraient être complets sans ceux destinés à Marie-Line. Les mots me manquent pour te dire à quel point je suis reconnaissant que tu sois à mes côtés dans l'accomplissement de cette thèse mais aussi, et surtout, dans ma vie. Je n'aurais pu rêver plus parfaite compagne que toi, qui m'a soutenu, encouragé et aimé pendant toutes ces années. Grâce et avec toi, je peux regarder vers l'avant sans craindre ce que l'avenir me réserve.

# Chapitre 1 : Introduction à l'étude de la dystrophie musculaire oculopharyngée

## 1.1. La dystrophie musculaire oculopharyngée (DMOP)

### 1.1.1. Historique

La dystrophie musculaire oculopharyngée (DMOP) est une maladie musculaire avec des symptômes tardifs. Elle est caractérisée par une chute progressive des paupières (ptose), des troubles de la déglutition (dysphagie) ainsi qu'une atteinte fréquente des muscles de la racine des membres. Au niveau pathologique, la DMOP se distingue par la formation d'inclusions intranucléaires (IIN) spécifiques. La forme commune de la DMOP est une maladie à transmission autosomique dominante, mais une forme récessive a aussi été décrite (Brais et al., 1998a). Cette section permet d'établir le contexte chronologique de l'étude de la DMOP en donnant les dates essentielles des découvertes effectuées. Les symptômes cliniques et pathologiques, ainsi que les différents modèles de la maladie sont décrits avec plus d'attention dans les sections suivantes.

#### 1.1.1.1. Les études cliniques et pathologiques (1890 - 1994).

L'étude de la DMOP, et de manière plus générale des myopathies oculaires, a débuté à la fin du 19<sup>ième</sup> siècle par la description de ptoses héréditaires en Allemagne (Fuchs, 1890) puis en France (Dutil, 1892 ; Delord, 1903). La DMOP fut clairement décrite pour la première fois en 1915 par Taylor qui observa, chez quatre membres d'une famille d'origine canadienne-française vivant à Boston, la présence d'une ptose progressive associée à une dysphagie héréditaire (Taylor, 1915). Taylor démontra aussi une transmission autosomique dominante du syndrome. Cette étude ne sera pourtant que peu remarquée de même que d'autres études parues plus tard et rapportant le même phénotype (Amyot, 1948b, 1948a ; Saucier, 1954).

Il fallut attendre 1962 pour que la maladie obtienne le nom de dystrophie musculaire oculopharyngée grâce à l'article de référence de Victor *et al.* (Victor *et al.*, 1962). Dans

cette étude, les auteurs ont cristallisé l'image clinique de la DMOP en décrivant une myopathie autosomique dominante à symptômes tardifs caractérisée par une ptose progressive et une dysphagie. Pour cette étude, les auteurs examinèrent 10 patients dont neuf issus de trois générations d'une même famille juive d'Europe de l'est. Les années suivantes, cette étude donna suite à plusieurs autres contributions dont la plus remarquable sera celle d'André Barbeau (Barbeau, 1965, 1966 ; Letendre *et al.*, 1966 ; Barbeau, 1969). Il identifia la plus large cohorte de patients DMOP au sein de grandes familles canadienne-françaises, ce qui permit d'affiner la description clinique de la maladie et de noter l'apparition fréquente d'une faiblesse des muscles proximaux. Ces études permirent aussi de montrer que le Québec avait probablement le plus haut taux de porteur au monde, suggérant un effet fondateur. Finalement il suggéra qu'un couple de pionniers introduit la maladie au Québec en 1634 (Barbeau, 1966 ; Letendre *et al.*, 1966).

L'étude de la DMOP prit un nouvel essor avec la publication, en 1980, d'un article référence de Fernando M.S. Tomé et Michel Fardeau (Tomé *et al.*, 1980). En utilisant la microscopie électronique, ils ont décrit la présence d'inclusions intranucléaires dans les muscles deltoïdes de trois patients atteints de la DMOP. La présence de ces inclusions, constituées de filaments caractéristiques, a depuis été confirmée chez plusieurs patients atteints de la DMOP provenant de diverses origines et n'a jamais été observée dans d'autres maladies (Tomé *et al.*, 1994 ; Tome *et al.*, 1997). Les IINs devinrent dès lors le marqueur histologique spécifique de la maladie. Les autres marqueurs histologiques incluent une atrophie des fibres de type 1 et la formation de vacuoles bordées, mais ils ne sont pas spécifiques à la DMOP (Dubowitz *et al.*, 1973 ; Tome *et al.*, 1997).

#### **1.1.1.2. L'étude génétique et moléculaire (1995 - À nos jours...)**

La description d'un phénotype homogène, favorable à des études génétiques, dans de grandes familles canadienne-françaises ainsi que la confirmation de la présence d'IINs (Bouchard *et al.*, 1989) ont amené à l'identification du locus de la DMOP dans la région chromosomique 14q11.2-q13 (Brais *et al.*, 1995). Le locus fut ensuite confirmé par d'autres équipes (Porschke *et al.*, 1997b ; Stajich *et al.*, 1997). Les études de liaison génétique suggéraient que la forme dominante de la maladie était homogène au niveau génétique.

Ceci a été confirmé par l'identification de petites expansions (GCN)<sub>8-13</sub> dans le gène *Poly(A) Binding Protein Nuclear 1 (PABPN1)*, anciennement appelé *PABP2* ou *PAB2* pour tous les cas dominants de la maladie (Brais et al., 1998a). Ces mutations provoquent l'expansion du domaine polyalanine dans la région N-terminale de la protéine PABPN1. Le domaine qui contient 10 alanines dans sa forme normale passe à 12-17 alanines dans sa forme mutée. La mutation la plus fréquente au Québec est une expansion de 3 alanines. L'identification des mutations pour les formes dominantes de la maladie permet d'établir un test diagnostique par PCR, rapide, fiable et non invasif.

La découverte des mutations dominantes de la DMOP dans le gène *PABPN1* a ouvert la voie à l'étude des mécanismes moléculaires de la maladie. En 2000, Calado *et al.* ont observé la présence de la protéine PABPN1 dans les IINs des patients atteints de la DMOP (Calado *et al.*, 2000c). Cette étude clé, confirmée par deux autres études réalisées la même année (Becher *et al.*, 2000 ; Uyama *et al.*, 2000), fut rapidement suivie par la description d'un modèle cellulaire de la maladie qui montre la formation d'IINs dans les cellules exprimant une forme mutée de PABPN1 (13 alanines) fusionnée à la GFP (Shanmugam *et al.*, 2000). Les modèles cellulaires publiés par la suite servirent à mettre en relation l'expression de PABPN1, la formation d'IINs et la toxicité cellulaire (Bao *et al.*, 2002 ; Abu-Baker *et al.*, 2003 ; Wang *et al.*, 2005b ; Verheesen *et al.*, 2006). En 2004, l'étude de la DMOP franchit un nouveau cap avec la publication d'un premier modèle animal de la DMOP (Hino *et al.*, 2004) qui fut suivi par les premiers essais thérapeutiques effectués chez les souris transgéniques (Davies *et al.*, 2005 ; Davies *et al.*, 2006b).

Les travaux présentés dans le cadre de cette thèse de doctorat s'inscrivent l'étude des aspects moléculaires et cellulaires de la DMOP. Le projet mis en place cherche à identifier l'impact de la formation des IINs sur le comportement cellulaire ainsi qu'à mieux définir le rôle du domaine polyalanine et de sa mutation dans l'évolution de la maladie.

## 1.1.2. Phénotype de la DMOP

### 1.1.2.1. Symptômes cliniques

La DMOP est une maladie tardive qui débute habituellement après 50 ans et qui se manifeste par deux symptômes majeurs qui apparaissent progressivement : la chute des paupières (ptose) et la dysphagie. Avec l'évolution de la maladie ou dans les cas les plus sévères, une faiblesse des muscles de la racine des membres est souvent observée (Tableau 1) (Brais, 2003 ; Ruegg *et al.*, 2005). Dans la majorité des cas, la ptose est le premier symptôme. Elle est toujours bilatérale et souvent asymétrique (Fig. 1A). Pour compenser l'affaissement des muscles élévateurs de paupières et la réduction du champ de vision, les patients contractent leurs muscles frontaux et mettent la tête en arrière dans une position dite de Hutchinson ou de l'astrologue. Si une correction chirurgicale n'est pas effectuée, la ptose conduit à une fermeture complète des paupières. Initialement, la DMOP n'affecte que les muscles élévateurs de paupières, mais avec l'évolution de la maladie, elle atteint tous les muscles extra-oculaires. La chirurgie correctrice consiste en la résection des tendons du muscle élévateur de paupières ou la suspension frontale des paupières dans le cas où le muscle n'a plus ou peu d'activité fonctionnelle (Rodrigue *et al.*, 1997).

La dysphagie est remarquée dans un premier temps pour la nourriture solide. Plus tard, même les liquides deviennent difficiles à avaler. La dysphagie est due à une faiblesse des muscles pharyngiens qui ne peuvent plus se contracter efficacement et ainsi acheminer le bol alimentaire dans l'œsophage. Elle conduit souvent à une malnutrition et peut provoquer la mort par pneumonie aspiratoire. Le muscle cricopharyngé, qui subit à un moindre degré le processus de dystrophie, devient une obstruction fonctionnelle pour le passage de la nourriture ne s'ouvrant pas complètement à cause de la trop faible contraction du pharynx (Duranceau, 1997). Par ailleurs, la dysphagie serait aggravée par la posture prise par les patients pour contrer les effets de la ptose (de Swart *et al.*, 2006). La chirurgie correctrice consiste en une myotomie du muscle cricopharyngé qui permet de libérer le passage pour la nourriture. La chirurgie permet d'améliorer la condition des patients mais est associée à risques potentiels de complications post-opératoires (Brigand *et al.*, 2007) et n'exclut pas la réapparition des symptômes dans un délai variable après la chirurgie (Coiffier *et al.*, 2006).

**Tableau 1: Répartition des symptômes chez les patients atteints de la DMOP**

Symptômes	Fréquence par pays					
	Québec (n=72)	Israël (n=117)	Italie (n=18)	Allemagne (n=16)	Pays-Bas (n=16)	France (n=29)
Ptose	100%	98%	100%	100%	100%	97%
Dysphagie	100%	73%	67%	63%	100%	69%
Faiblesse des muscles proximaux	38 / 71%*	20%	61%	56%	81%	52%
Faiblesse des muscles du visage	43%	17%	11%	13%	81%	ns
Trouble de la mobilité oculaire	61%	21%	5%	31%	31%	68%
Atrophie de la langue	82%	ns	ns	ns	ns	ns
Altération de la voix	67%	70%	ns	25%	75%	34%

(\* , respectivement pour les membres supérieurs et inférieurs)

Ces symptômes ainsi que d'autres reliés à la maladie sont résumés dans le tableau 1. La plupart des patients vont développer une altération de la voix, une atrophie des muscles du visage (Fig. 1A) et, chez une forte proportion de patients, une faiblesse des muscles proximaux supérieurs et inférieurs pouvant conduire à une incapacité à la marche. La sévérité de la maladie est très variable même au sein des patients d'une même famille portant la même mutation (Bouchard *et al.*, 1997 ; Blumen *et al.*, 1999 ; Brais, 2003). Dans quelques cas, la DMOP est associée à une neuropathie sensitivomotrice (Schmitt *et al.*, 1981 ; Probst *et al.*, 1982 ; Hardiman *et al.*, 1993 ; Porschke *et al.*, 1997a ; Mirabella *et al.*, 2000 ; Muller *et al.*, 2001 ; Schober *et al.*, 2001 ; Boukriche *et al.*, 2002). Cependant, le lien entre la DMOP et les neuropathies n'est pas clairement établi puisque celles-ci pourraient être dues à une maladie indépendante de la DMOP ou aux effets du vieillissement (Ruegg *et al.*, 2005).

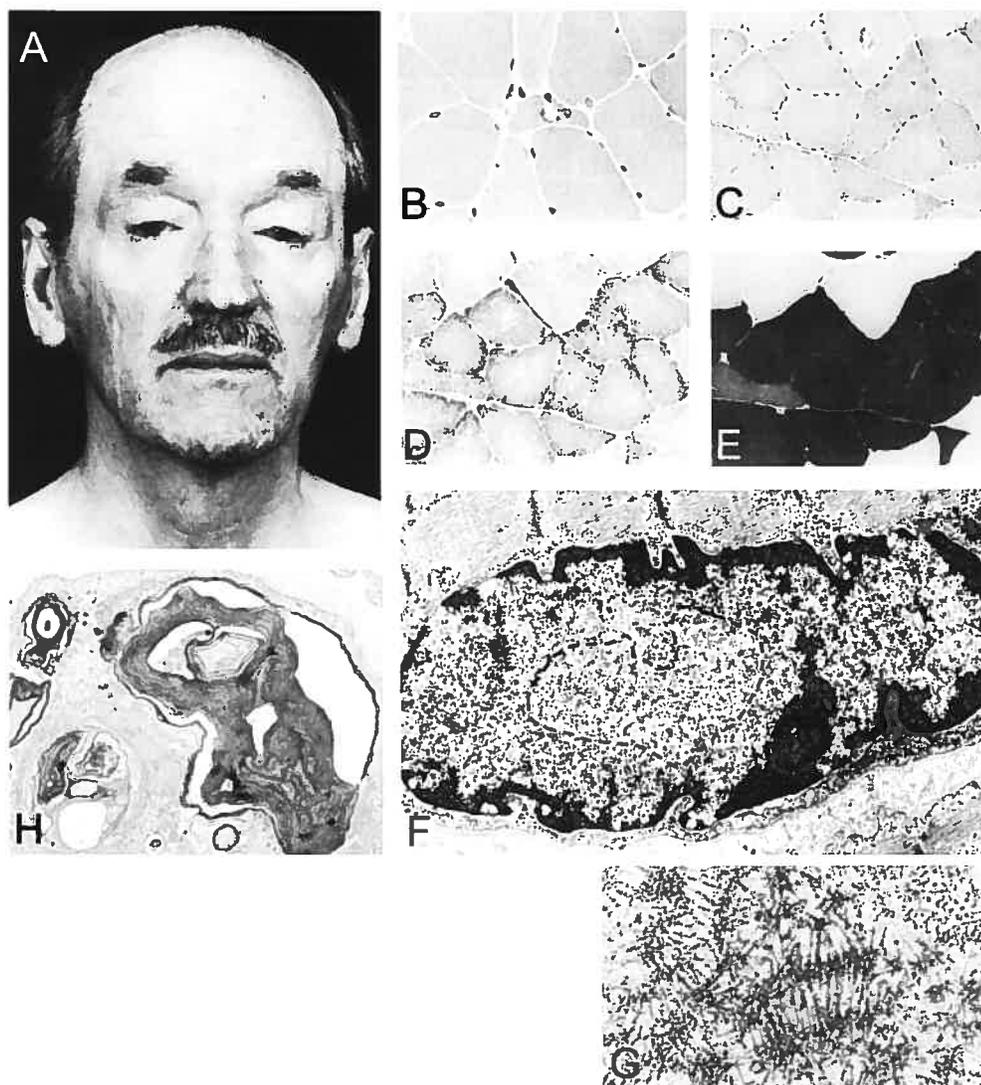
#### 1.1.2.2. Histologie et marqueurs pathologiques

Les changements histologiques observés dans les muscles varient selon l'état d'avancement de la maladie ou le muscle étudié. Même s'il semble que tous les muscles squelettiques soient touchés dans la DMOP, les muscles extra-oculaires, pharyngiens, de la langue et du diaphragme sont le plus sévèrement atteints (Rebeiz *et al.*, 1969 ; Schmitt *et al.*, 1981 ; Little *et al.*, 1982). Ces muscles montrent des changements communs à plusieurs dystrophies musculaires comme une plus grande variabilité dans la taille des fibres, une augmentation du nombre de noyaux et la présence de noyaux centraux, suggérant des cycles de dégénération-régénération (Fig. 1B-E). Une étude sur 29 patients français atteint de la DMOP a montré, en plus de la présence des IINs, une prédominance des fibres de type 1, une faible occurrence de fibres nécrotiques, la présence de fibres angulaires atrophiques et de vacuoles bordées dans la plupart des biopsies (Fig. 1B-E) (Bouchard *et al.*, 1989 ; Bouchard *et al.*, 1997 ; Tome *et al.*, 1997). La présence occasionnelle de fibres rouges déchiquetées (*red ragged fibers*) a aussi été observée. Cependant ces fibres ne sont pas caractéristiques de la DMOP mais pourraient être représentatives de l'âge avancé des patients (Rowland *et al.*, 1997).

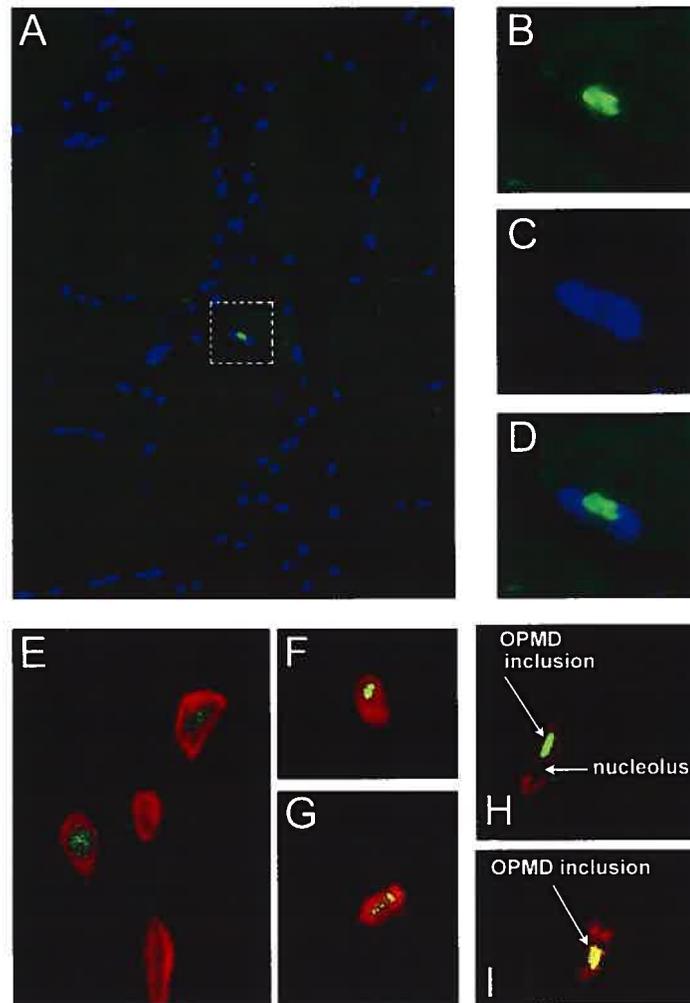
#### 1.1.2.2.1. Inclusions intranucléaires

Le principal marqueur pathologique de la maladie est la présence d'inclusions intranucléaires dans les muscles atteints chez tous les patients (Fig. 1F). Ces IINs sont constituées de filaments tubulaires de 8,5nm de diamètre externe et de 3nm de diamètre interne (Tomé *et al.*, 1980). Ces filaments sont souvent rectilignes, pouvant atteindre 0,25µm de longueur et disposés en strie formant des structures dites en palissade (Fig. 1G). Ces IINs ne sont retrouvées que dans les noyaux musculaires et n'ont jamais été observées dans les noyaux des cellules avoisinantes (cellules satellites, fibroblastes, cellules endothéliales, ...). Leur volume peut varier considérablement allant de 1% à 100% de volume nucléaire sur une section (Tome *et al.*, 1997). La fréquence par coupe des IINs dans les noyaux de 29 patients varie de 2% à 5% (moyenne à 4%) (Tome *et al.*, 1997 ; Brais, 2003). Le taux le plus élevé a été observé chez deux patients homozygote pour la mutation (GCG)<sub>9</sub> avec une fréquence de 9,4% (Blumen *et al.*, 1999). Ces études ont été principalement effectuées sur des biopsies de muscles deltoïdes. Les études du muscle crycopharyngé et de l'élévateur de paupière ont toujours été plus limitées, car ces muscles sont déjà très modifiés au moment des chirurgies. La présence d'IINs est aussi observée dans d'autres maladies telles que la myosite à corps d'inclusions (*Inclusion Body Myositis*, IBM) (Askanas *et al.*, 1995). Dans l'IBM, les inclusions formées sont nucléaires et cytoplasmiques. Elles sont constituées de filaments de diamètre externe allant de 16 à 18nm, mais ne montrent pas une organisation spécifique comme pour la DMOP. Cependant des inclusions de type IBM ont déjà été observées chez quelques patients DMOP mais leur fréquence est beaucoup moins élevée que chez les patients atteints d'IBM (Coquet *et al.*, 1990).

Suite à la découverte, en 1998, de la mutation causant la DMOP (Brais *et al.*, 1998a), plusieurs études ont identifié PABPN1 comme un constituant majeur des IINs (Fig. 2A-D) (Becher *et al.*, 2000 ; Calado *et al.*, 2000c ; Uyama *et al.*, 2000). Des études d'immunofluorescence ont aussi permis d'identifier que les IINs ne contiennent pas d'ADN et excluent la protéine SFSRS2 (anciennement appelé SC35, marqueur des *speckles* nucléaires) (Spector *et al.*, 1991 ; Lamond *et al.*, 2003). De plus, les IINs furent montrées comme incluant des composants du système ubiquitine-protéasome, comme l'ubiquitine et



**Figure 1 : Caractéristiques cliniques et pathologiques de la DMOP.** A - Visage caractéristique d'un patient atteint de la DMOP affecté d'une ptose et d'une atrophie des muscles du visage (figure extraite de Bouchard *et al.* 1997). B-E - Coupes faites au cryostat montrant des vacuoles bordées, la variabilité de la taille de fibres et la présence de petites fibres angulaires. Les coupes sont marquées à l'hématoxyline-éosine (B), au trichrome de Gomori (C), au NADH-tetrazolium reductase (D) et à l'ATPase myofibrillaire (E). F - image de microscopie électronique montrant un noyau de fibre musculaire. Une zone plus claire au centre du noyau (délimitée par une ligne en pointillés) indique la présence d'une inclusion intranucléaire (x16500). G - Agrandissement de l'IIN, observée dans la figure F, qui montre la présence de filaments tubulaires enchevêtrés (x150000). H- Image de microscopie électronique montrant une vacuole bordée (x21000).



**Figure 2 : Composition des inclusions intranucléaires de la DMOP.** A – Observation d'une IIN dans un coupe de quadriceps d'un patient homozygote pour la DMOP avec un marquage anti-PABPN1 (vert). Les noyaux sont marqués grâce à une coloration Hoechst (bleu). B à D – Agrandissement de la région encadrée dans la figure A. Les couleurs sont séparées afin d'observer l'inclusion riche en PABPN1 (B), l'absence d'ADN marqué au Hoechst au niveau de l'IIN (C) et une juxtaposition des deux images (D). E à G – Les IINs contiennent des protéines du système ubiquitine-protéasome (vert) révélées par un marquage anti-ubiquitine (E), ou contre la sous-unité 20S du protéasome (F et G). L'ADN est marqué au to-pro (rouge). H et I – Les IINs contiennent de l'ARN poly(A) (vert) marqué avec une sonde poly(T). Les IINs excluent l'ADN (H, To-Pro, rouge) et colocalisent avec PABPN1 (I, anti-PABPN1, rouge) (Les Fig. E à I sont extraites de Calado *et al.* 2000a).

la sous-unité 20S (Fig. 2E-G) (Calado *et al.*, 2000c), les chaperonnes moléculaire HSP70 et HSP40 (Bao *et al.*, 2002 ; Bao *et al.*, 2004) et le co-facteur de transcription HNRPA1 (Fan *et al.*, 2003a). Des études d'hybridation *in situ* ont permis de déterminer que les IINs contenaient également de larges quantités d'ARN poly(A) (Calado *et al.*, 2000c) (Fig. 2H et I). Toutefois, le rôle ou l'impact des IINs dans l'évolution de la maladie est encore inconnu. La présence des protéines du système ubiquitine-protéasome et des chaperonnes laissent supposer qu'un problème de conformation de la protéine serait à l'origine de la formation des IINs (Calado *et al.*, 2000a ; Brais, 2003).

#### 1.1.2.2.2. Vacuoles bordées

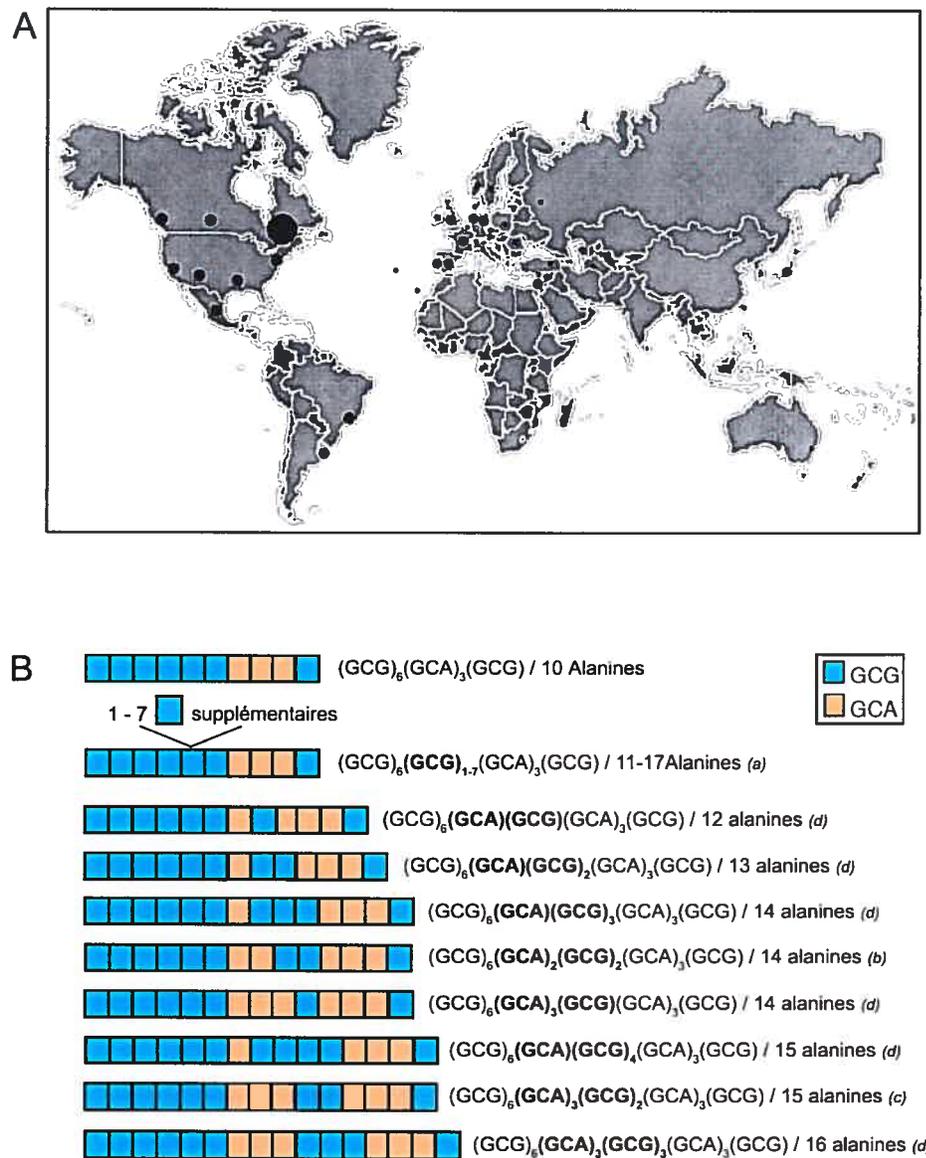
Les vacuoles bordées furent décrites pour la première fois chez des patients DMOP en 1973 (Dubowitz *et al.*, 1973). Ces vacuoles sont observées dans le cytoplasme des fibres musculaires chez la plupart des patients atteints de la DMOP, même si certains patients n'en ont aucune (Tome *et al.*, 1997) (Fig. 1B et C). Quand elles sont présentes, elles sont relativement rares, avec une présence dans 0,6% des fibres musculaires en moyenne. Leur taille ainsi que leur forme est variable. Elles contiennent divers débris membranaires, cytoplasmiques et myéloïdes (Leclerc *et al.*, 1993 ; Tome *et al.*, 1997) (Fig. 1H). Parfois des filaments de type IBM sont observés dans les vacuoles ou à leur proximité (Coquet *et al.*, 1990). Ces vacuoles sont observées dans de nombreuses autres myopathies et ne constituent donc pas un marqueur spécifique de la maladie (Dubowitz *et al.*, 1973). Néanmoins, elles ont longtemps participé à l'établissement du diagnostic pathologique. Plusieurs études suggèrent que les vacuoles bordées sont de natures autophagiques (Tome *et al.*, 1997 ; Suzuki *et al.*, 2002).

### 1.1.3. Génétique Moléculaire

Les mutations causant la DMOP, décrites en 1998 par l'équipe du Dr Rouleau, consistent en des expansions de triplets (GCN) dans le premier exon du gène *PABPN1* (Brais *et al.*, 1998a). La maladie a été rapportée dans plus de 33 pays (Fig. 3A) (Mirabella *et al.*, 2000 ; Hill *et al.*, 2001 ; Brais, 2003 ; Robinson *et al.*, 2005 ; Rodriguez *et al.*, 2005 ; Muller *et al.*, 2006 ; Bae *et al.*, 2007). Cependant la DMOP est particulièrement prévalente

au Québec (1:1000), dans une population juive du Bukhara (1:600), ainsi qu'au Nouveau-Mexique (Blumen *et al.*, 1996 ; Brais *et al.*, 1997 ; Becher *et al.*, 2001). Dans sa forme normale, la séquence codante pour le domaine de 10 alanines consécutives dans PABPN1 est : (GCG)<sub>6</sub>(GCA)<sub>3</sub>GCG (Fig. 3B). Chez la plupart des patients DMOP, la séquence (GCG)<sub>6</sub> est augmenté à (GCG)<sub>8-13</sub>. Le domaine polyalanine passe alors de 12 à 17 alanines. La mutation la plus fréquente au Québec est la forme (GCG)<sub>9</sub> qui correspond à un domaine de 13 alanines. Cependant, plusieurs études ont montré que certains patients présentent des mutations différentes dites "cryptiques" (Fig. 3B) (Scacheri *et al.*, 1999 ; Nakamoto *et al.*, 2002 ; van der Sluijs *et al.*, 2003 ; Robinson *et al.*, 2005). Ces études ont suggéré que les mutations causant la DMOP pouvaient être causées non seulement par de petites duplications par glissement mais aussi par des recombinaisons asymétriques provoquant une insertion de triplets (GCN) non identiques codant pour une séquence polyalanine (Nakamoto *et al.*, 2002 ; van der Sluijs *et al.*, 2003 ; Robinson *et al.*, 2005).

L'âge d'apparition des symptômes ainsi que l'évolution de la maladie sont très variables chez les patients atteints de la DMOP. Cependant, aucune relation entre la taille de la mutation et la sévérité de la maladie n'a pu être clairement établie. Une étude a démontré une sévérité plus importante de la maladie pour les patients homozygotes (Blumen *et al.*, 1999), avec un âge moyen d'apparition des symptômes 18 ans plus précoce. De plus, des études sur une grande cohorte canadienne-française portant la mutation (GCG)<sub>9</sub> ont montré que 15 à 20% de ces patients avaient un phénotype plus sévère. Parmi eux, 20% étaient des hétérozygotes composés et portaient la mutation dominante (GCG)<sub>9</sub> associée à un polymorphisme (GCG)<sub>7</sub>. Ce polymorphisme est présent dans 1 à 2% de la population (Brais *et al.*, 1998a ; Lavoie *et al.*, 2003). Cette forme plus sévère chez les patients homozygotes et chez les hétérozygotes composés suggèrent fortement un effet de dose du gène sur l'évolution de la maladie (Brais, 2003). Par ailleurs, une forme récessive de la DMOP a également été décrite chez des patients homozygotes pour la mutation (GCG)<sub>7</sub>. Le phénotype clinique est le même que celui de la forme dominante, mais avec un âge d'apparition des symptômes plus tardifs (Brais *et al.*, 1998a ; Hebbar *et al.*, 2007).



**Figure 3 : Génétique moléculaire et répartition géographique de la DMOP.** **A** - Représentation de la répartition de la DMOP dans le monde. La taille des ronds noirs représente la prévalence relative de la DMOP dans chaque pays. La DMOP a été observée dans plus de 33 pays (Brais *et al.* 2003). **B** - Représentation graphique des mutations publiées causant la DMOP. La séquence codant pour le domaine polyanaline de PABPN1 est  $(GCG)_6(GCA)_3(GCG)$ . Les mutations décrites sont soit des expansions pures (GCG) soit des mutations dites cryptiques. Les données présentées sont issues de: <sup>(a)</sup> Brais *et al.* 1998, <sup>(b)</sup> Van der Sluijs *et al.* 2003, <sup>(c)</sup> Nakamoto *et al.* 2002 et <sup>(d)</sup> Robinson *et al.* 2005. (Représentation adaptée de Brown et Brown 2004).

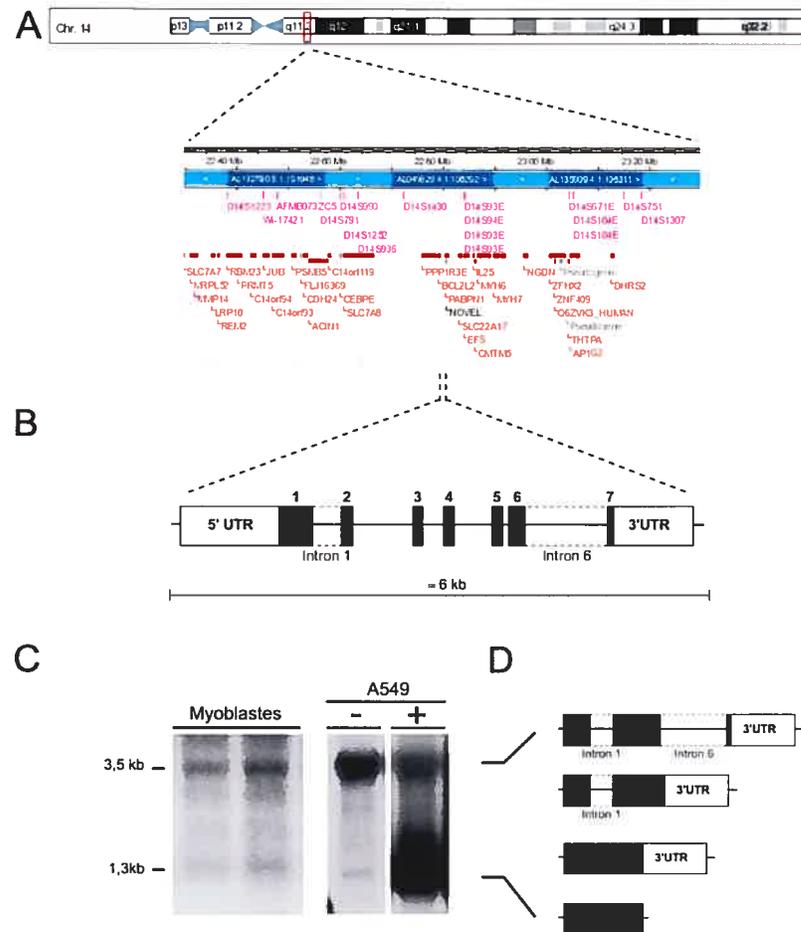
## 1.2. Poly(A) Binding Protein Nuclear 1 - PABPN1

### 1.2.1. Structure

#### 1.2.1.1. PABPN1 : Gène et transcrits

Le gène *PABPN1* se trouve dans la région chromosomique 14q11.2 à q13 et possède une séquence génomique d'environ 6 kb (Fig. 4A et B) (Brais et al., 1998a). Le gène a d'abord été cloné chez le bovin (Nemeth *et al.*, 1995) puis chez l'homme (Brais et al., 1998a). Le gène est composé de 7 exons et 6 introns, accompagnés des régions non codantes (UTR) en 5' et 3' de sa séquence (Fig. 4B). La séquence codante est fortement conservée chez l'humain, le bovin et la souris. La séquence est moins bien conservée chez les espèces inférieures, en particulier la partie 5' du gène. La région promotrice ne contient pas de séquence consensus de type boîte TATA et aucun mécanisme de régulation de l'expression de *PABPN1* n'a pu être identifié à ce jour. La séquence de polyadénylation AAUAAA de *PABPN1* se trouve dans la région 3' UTR, soit 894 pb après le codon stop.

*PABPN1* est essentiellement exprimé sous la forme de deux transcrits majeurs de 1,1kb et 3,5kb (Fig. 4C et 4D) (Nemeth et al., 1995 ; Brais et al., 1998a ; Corbeil-Girard et al., 2005) qui correspondent, respectivement, à la forme totalement épissée et à la forme partiellement épissée contenant les introns 1 et 6 en plus de la région 3'UTR. Les études de Northern blot suggèrent que plusieurs variants entre ces deux formes existent avec, entre autres, l'apparition fréquente de la forme contenant l'ensemble des exons et le 3'UTR (Nemeth *et al.*, 1995)(Fig. 4C et 4D). *PABPN1* a une expression ubiquitaire. Une étude a montré une expression différentielle de *pabpn1* chez la souris, avec une expression plus forte dans le cerveau, le thymus et les testicules (Lee *et al.*, 2000). Toutefois, aucune étude similaire, spécifique à PABPN1, n'a encore été publiée chez l'homme.



**Figure 4: Localisation et représentation du gène *PABPN1*.** **A** – Représentation de la région chromosomique au locus 14q11.1 où se situe le gène *PABPN1*. **B** – Représentation schématique de la structure du gène *PABPN1*. Le gène est composé de 7 exons et 6 introns en plus de régions non traduites (UTR) en 5' et en 3' (figure adaptée de Brais *et al.* 1998). **C** – Visualisation des transcrits de *PABPN1* révélés par Northern blot dans des myoblastes primaires et des cellules A549 : Cellules non infectées (-) ou infectées pour exprimer la forme sauvage de *PABPN1* (+). **D** - Représentation schématique de la structure des principaux transcrits de *PABPN1*.

### 1.2.1.2. PABPN1 : la protéine

PABPN1 a été identifiée en 1991 par le Dr. Wahle comme étant un nouveau facteur essentiel à la polyadénylation des ARN messagers (Wahle, 1991). PABPN1 est une protéine de 306 acides aminés avec un poids moléculaire prédit de 33 kDa, mais un poids moléculaire apparent d'environ 50 kDa d'après des études de Western blot (Nemeth et al., 1995 ; Brais et al., 1998a ; Corbeil-Girard et al., 2005). La protéine possède plusieurs domaines fonctionnels (Fig. 5) : un domaine de liaison à l'ARN et un domaine de type *coil-coiled* qui sont très bien conservés entre les espèces, un domaine C-terminal basique, riche en arginine incluant un signal de localisation nucléaire et un domaine N-terminal acide contenant une région riche en proline et le domaine polyalanine. De manière générale, PABPN1 est une protéine qui a une forte tendance à l'agrégation et qui, en conséquent, est donc difficile à purifier ou manipuler (Fan *et al.*, 2001 ; Kuhn *et al.*, 2003 ; Scheuermann *et al.*, 2003).

#### 1.2.1.2.1. Domaine de liaison à l'ARN (a.a.161 à 257)

Le domaine de liaison à l'ARN de PABPN1 est le motif le plus conservé dans les protéines homologues identifiées chez les autres espèces (Fig. 5B)(Kuhn *et al.*, 2003). Il s'agit d'un domaine de type RNP (aussi appelé domaine de type RRM pour *RNA recognition motif*). Ce type de domaine, d'une longueur d'environ 90 a.a., est caractérisé par un enchaînement de structure secondaire  $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ . Pour PABPN1, deux motifs consensus, appelés RNP-1 et RNP-2, sont fortement conservés au sein des espèces (Fig. 5B). Ce domaine reconnaît spécifiquement les adénosines et les acides aminés 175 et 215 sont essentiels à la fonction de liaison à l'ARN. Il est à noter que la liaison à l'ARN se fait en coopération avec la région C-terminale du domaine RNP. Cette région, riche en arginines (Smith *et al.*, 1999), est indispensable à la liaison à l'ARN, même si elle ne reconnaît pas spécifiquement les adénosines. La région C-terminale ressemble en de nombreux points à des domaines de liaison à l'ARN de type RGG (arginine/glycine/glycine) de part sa fonction et sa structure (Kuhn *et al.*, 2003). De nombreuses molécules de PABPN1 se lient à la queue poly(A) des ARN messagers sur une longueur de 11 nucléotides par molécule (Meyer *et al.*, 2002).



#### 1.2.1.2.2. *Signal de localisation nucléaire (a.a. 289-306)*

Le signal de localisation nucléaire de PABPN1 a été défini pour la première fois par l'équipe du Dr Carmo-Fonseca en 2000 (Calado *et al.*, 2000b). Il fut mis en évidence par la localisation aussi bien nucléaire que cytoplasmique d'une protéine de fusion GFP-PABPN1 sans domaine C-terminal ( $\Delta$ 257-306). Le domaine C-terminal (257-306) qui est défini par la présence de nombreuses arginines (Smith *et al.*, 1999) permet une localisation exclusivement nucléaire de la GFP, quand il y est fusionné (Calado *et al.*, 2000b). En 2005, une autre étude a permis d'affiner la taille nécessaire pour la fonction de localisation nucléaire à un segment de 18 acides aminés (289- 306) (Abu-Baker *et al.*, 2005). Le rôle de ce domaine n'est pas clairement établi puisqu'il est aussi essentiel à la liaison à l'ARN et l'auto-agrégation de PABPN1 (Kuhn *et al.*, 2003).

#### 1.2.1.2.3. *Domaine coil-coiled (a.a. 119-147)*

Le domaine de type *coil-coiled* fut identifié pour la première fois dans la séquence homologue de PABPN1 chez la drosophile (Benoit *et al.*, 1999). Ce domaine est bien conservé entre les différentes espèces. Une étude a montré que ce domaine était essentiel à la stimulation de la poly(A) polymérase (PAP) lors de la formation du complexe ternaire comprenant PABPN1, PAP et le facteur de polyadénylation Clivage and Polyadenylation Specific Factor (CPSF) (Kerwitz *et al.*, 2003). Les auteurs ont observé que les acides aminés hydrophobes de ce motif étaient importants pour la stimulation de la PAP, en particulier la tyrosine en position 136. Le domaine *coil-coiled* n'est pas essentiel à l'interaction de PABPN1 avec la PAP et n'est pas suffisant pour induire seul la stimulation de la PAP (Kerwitz *et al.*, 2003). Cependant, il semble que le domaine C-terminal de PABPN1 soit aussi nécessaire à cette activation. De plus, du fait de sa structure en hélices  $\alpha$ , le domaine *coil-coiled* participe à la structure secondaire globale de PABPN1 avec le domaine de liaison à l'ARN (Kerwitz *et al.*, 2003 ; Scheuermann *et al.*, 2003). Récemment, plusieurs études ont montré qu'une perturbation du domaine *coil-coiled*, par mutagenèse ou par ciblage à l'aide d'anticorps spécifiques, empêchait la formation d'agrégats dans des modèles cellulaires de la DMOP (Tavanez *et al.*, 2005 ; Verheesen *et al.*, 2006 ; Messaed *et al.*, 2007).

#### 1.2.1.2.4. Domaines d'oligomérisation (a.a. 155-294 et 264-306)

En 2001, l'équipe du Dr Rouleau a confirmé par études de doubles hybrides chez la levure que PABPN1 pouvait interagir avec lui-même (Fan *et al.*, 2001). En utilisant plusieurs constructions contenant des délétions différentes, les auteurs ont réussi à identifier deux domaines d'oligomérisation appelés OD1 (155-294) et OD2 (264-306). Ces domaines permettent l'oligomérisation de PABPN1 sans la présence d'ARN. Deux segments semblent critiques pour cette interaction : les régions a.a. 213-220 pour OD1 et a.a. 301-306 pour OD2. Les délétions de ces segments empêchent la formation d'agrégats dans un modèle cellulaire (Fan *et al.*, 2001). Il est important de noter que ces deux domaines chevauchent en grande partie le domaine de liaison à l'ARN et le signal de localisation nucléaire, dont le rôle sur l'agrégation de la protéine fut confirmé par la suite (Figure 5A)(Nemeth *et al.*, 1995 ; Kuhn *et al.*, 2003)

#### 1.2.1.2.5. Domaine polyalanine (a.a 2-11)

Le domaine polyalanine est bien conservé chez les mammifères mais est absent chez les espèces inférieures comme la drosophile et le nématode (Fig. 5B). Le domaine polyalanine se trouve juste après la première méthionine et est composé de 10 alanines consécutives (Nemeth *et al.*, 1995 ; Brais *et al.*, 1998a). Ce domaine est directement suivi d'une glutamine puis de 2 alanines supplémentaires. L'étude des séquences polyalanines *in vitro* et *in silico* a montré qu'elles pouvaient former des structures en hélices  $\alpha$  ou en feuillets  $\beta$  selon le nombre d'alanines (ces études sont présentées de manière plus approfondies à la section 4.2.1.) (Blondelle *et al.*, 1997). Néanmoins, l'impact d'une telle structure sur la conformation globale de PABPN1 n'est pas encore connu. Une étude a montré que la partie N-terminale de PABPN1 (a.a. 1-160), contenant le domaine polyalanine, est capable de former des structures de type amyloïde, *in vitro*. Cette capacité est accrue quand la taille du domaine polyalanine est augmentée à 17 alanines, suggérant un rôle du domaine polyalanine sur l'agrégation de la protéine (Scheuermann *et al.*, 2003 ; Lodderstedt *et al.*, 2007)

#### 1.2.1.2.6. Modifications post-traductionnelles

Plusieurs types de modifications post-traductionnelles peuvent affecter la structure des protéines liant l'ARN ainsi que leurs interactions. Ces modifications incluent la phosphorylation, la glycosylation et la méthylation (Liu *et al.*, 1995). Une seule modification a été clairement établie pour PABPN1, la méthylation des arginines. Les 13 résidus arginines présents dans la partie C-terminale de PABPN1 sont méthylés de manière asymétriques par les méthyl-transférases PRMT1 et PRMT3 (Smith *et al.*, 1999). Toutefois, l'impact de ces méthylations n'est pas connu, même si une étude a montré qu'elle n'avait pas d'influence sur l'efficacité de la liaison à l'ARN (Kuhn *et al.*, 2003)

#### 1.2.1.2.7. Partenaires d'interactions

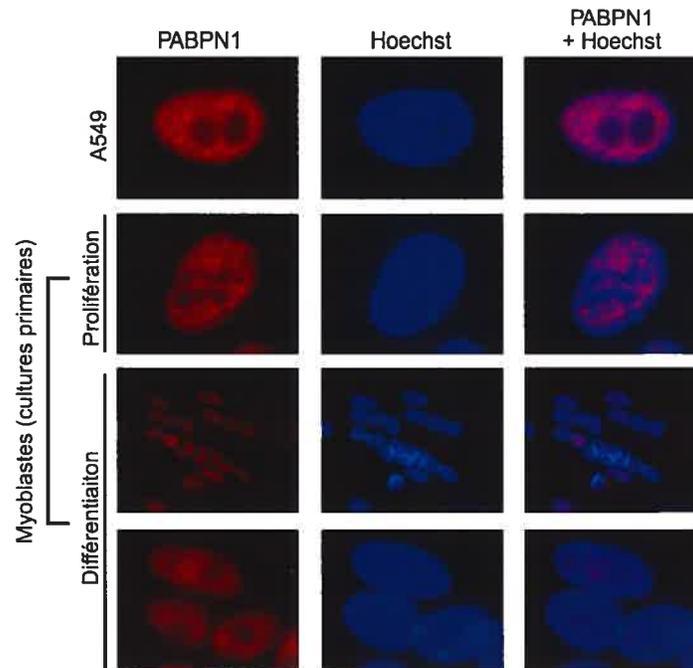
Plusieurs études ont essayé de trouver des partenaires d'interaction de PABPN1. Dans le cadre de sa fonction dans la polyadénylation, PABPN1 interagit avec le CPSF et la PAP en présence d'ARN poly(A) (Wahle, 1995 ; Kerwitz *et al.*, 2003). Grâce à des études de double hybrides chez la levure, plusieurs équipes ont mis en évidence que PABPN1 interagissait avec les co-facteurs de transcription HNRPA1 (Heterogenous Ribonucleoprotein A1), HNRPA/B (Fan *et al.*, 2003a), avec la sous-unité 30K de CPSF (Chen *et al.*, 1999), avec le facteur de transcription SNW1 (SNW domain containing 1, anciennement appelé SKIP), la chaperonne HSP40 (Heat Shock Protein 40) et le facteur SMARCA4 (SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin A4, anciennement appelé BRG1) (Kim *et al.*, 2001). Les zones d'interaction avec ces facteurs se situent essentiellement au niveau de la partie C-terminale de PABPN1 (Fan *et al.*, 2001 ; Fan *et al.*, 2003a ; Kuhn *et al.*, 2003). Par ailleurs, plusieurs études ont montré grâce à des expériences d'immuno-précipitation que PABPN1 interagissait avec TNPO1 (aussi appelée Karyopherin- $\beta$ 2 ou Transportin)(Calado *et al.*, 2000b), avec la RPOLII (RNA polymérase II) (Bear *et al.*, 2003), avec le co-facteur de transcription HNRPC (Calapez *et al.*, 2002) et avec les protéines du complexe CBC (Cap-binding Complex) incluant les protéines CBP20 (Cap Binding Protein 20), CBP80 et EIF4G (Eukaryotic translation Initiation Factor 4G) (Ishigaki *et al.*, 2001).

## 1.2.2. Fonctions et localisation cellulaire de la protéine

### 1.2.2.1. Localisation cellulaire et transport de PABPN1

PABPN1 est une protéine ubiquitaire, exprimée dans toutes les cellules de l'organisme. Au niveau cellulaire, PABPN1 est essentiellement nucléaire avec une disposition généralement diffuse et une accumulation plus marquée au niveau des *speckles* nucléaires ou granules d'inter-chromatine (Fig. 6) (Krause *et al.*, 1994). Ces granules contiennent des pré-ARN messagers associés à divers co-facteurs de transcription et des facteurs d'épissage. Le principal marqueur de ces granules est le facteur d'épissage SFRS2 (anciennement appelé SC35) (Spector *et al.*, 1991 ; Misteli *et al.*, 1997). PABPN1 est localisé dans ces granules uniquement en présence d'ARNm poly(A). Par conséquent, si l'interaction avec la queue poly(A) de l'ARNm n'est pas fonctionnelle, PABPN1 se retrouve diffus dans le noyau (Calado *et al.*, 2000a).

Plusieurs études ont montré que PABPN1 faisait la navette entre le noyau et le cytoplasme (Chen *et al.*, 1999 ; Calado *et al.*, 2000b). PABPN1 serait suffisamment petit pour passer passivement à travers les pores nucléaires, mais il apparaît que l'importation de PABPN1 dans le noyau et l'export vers le cytoplasme sont deux mécanismes actifs, sensibles à la température et médiés par des protéines-cargos (Calado *et al.*, 2000b). Le transport vers le noyau se fait grâce à l'interaction de PABPN1 avec TNPO1 via un mécanisme dépendant de RAN-GTP. L'export vers le cytoplasme est indépendant de la transcription, même si une association passive avec l'ARNm n'est pas à exclure (Calado *et al.*, 2000b). En effet, la mobilité intranucléaire de PABPN1 semble être divisée en deux catégories, une forme libre qui diffuse passivement et une forme liée à l'ARNm et aux complexes ribonucléoprotéiques dont le transport est dépendant de l'ATP et sensible à la température (Calapez *et al.*, 2002). Par ailleurs, une étude chez le xénope a montré que PABPN1 est associée à la RNA polymérase II, avant ou dès le début de la transcription. De sorte qu'il accompagne l'ARNm nouvellement formé jusqu'à sortie du noyau (Bear *et al.*, 2003).



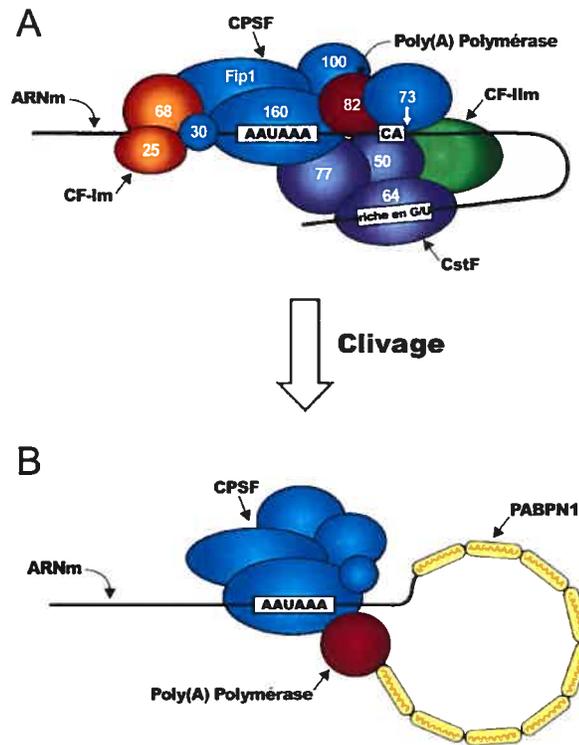
**Figure 6: Localisation nucléaire de PABPN1.** Des cellules A549 et des myoblastes primaires, en prolifération ou différenciés, sont marqués avec un anticorps polyclonal dirigé contre PABPN1. La protéine est essentiellement nucléaire et localisé en partie dans les *speckles* nucléaires. Dans les myoblastes différenciés, PABPN1 est plus diffus dans l'ensemble du noyau.

### 1.2.2.2. Fonctions de PABPN1

#### 1.2.2.2.1 Les mécanismes de polyadénylation

À ce jour, la seule fonction connue de PABPN1 est son rôle dans la maturation en 3' des ARN messagers (Wahle, 1991). Chez les eucaryotes, cette maturation se fait par l'ajout d'une queue poly(A) d'environ 250 nucléotides au transcrit nouvellement formé. Cette queue poly(A) est importante pour l'initiation de la traduction. Elle permet, grâce à une interaction entre les protéines qui la recouvrent, la coiffe en 5' et la protéine EIF4G, le recrutement de la sous-unité ribosomale 40S sur l'ARN messager (Kuhn *et al.*, 2004). De plus, la queue poly(A) est impliquée dans la stabilité des ARNm, puisque le processus de dégradation nécessite une dépolyadénylation avant de pouvoir se faire (Chang *et al.*, 2007). Par ailleurs, les études sur le transport de PABPN1, du noyau vers le cytoplasme, laissent supposer un rôle de la queue poly(A) dans le transport de l'ARNm (Calado *et al.*, 2000a ; Calado *et al.*, 2000b).

La maturation en 3' des ARNm est un processus en deux étapes (Fig. 7) : le clivage du nouveau transcrit et l'ajout de la queue poly(A). Ces deux étapes sont fortement liées *in vivo*, mais les deux mécanismes peuvent être dissociés *in vitro* (Wahle *et al.*, 1999). La polyadénylation suit immédiatement le clivage de l'ARNm si bien que le fragment 5' coupé sans queue poly(A) n'est quasiment pas détectable. Pour que le clivage soit effectué, l'ARNm doit contenir le signal de polyadénylation AAUAAA suivi d'une région riche en (GU). Le site de clivage se situe entre les deux séquences, souvent après un (CA) localisé entre 10 et 30 nucléotides en aval de la séquence AAUAAA (Dominski *et al.*, 2007). La séquence AAUAAA permet l'interaction du CPSF, un complexe protéique de 5 sous-unités (Fig. 7A)(Kaufmann *et al.*, 2004). La séquence riche en (GU) permet la liaison du CstF (Cleavage Stimulation factor) à l'ARNm. Les deux complexes protéiques interagissent ensemble stabilisant leur interaction respective avec l'ARN. Plusieurs autres complexes, essentiels au processus, viennent se rajouter (Fig. 7A) : les facteurs de clivage (CF-Im et CF-IIIm), la poly(A) polymérase (PAP) et le domaine C-terminal (CTD) de l'ARN polymérase II. Le clivage est effectué par la sous-unité CPSF-73 (Ryan *et al.*, 2004 ; Mandel *et al.*, 2006), qui contient un domaine métallo- $\beta$ -lactamase, caractéristique de plusieurs nucléases et qui utilise des ions zinc pour l'hydrolyse (Dominski, 2007).



**Figure 7: Les mécanismes de polyadénylation chez les mammifères.** Représentation graphique des deux étapes de la polyadénylation. Le clivage du nouveau transcrit (**A**) est assuré par l'association des protéines CPSF, CstF, CF-I $\alpha$ , CF-I $\beta$ , la poly(A) polymérase et la sous-unité CTD de l'ARN polymérase II. Le CPSF lie la séquence de polyadénylation AAUAAA, le CstF lie une séquence riche en GU et le clivage est effectué par la CPSF-73. La localisation de certains de ces complexes n'a pas été confirmée expérimentalement et le CTD n'est pas représenté. L'étape de polyadénylation (**B**) est effectuée par la poly(A) polymérase en association avec le CPSF et PABPN1 qui permet la stimulation de la PAP jusqu'à l'ajout de 250 nucléotides et qui recouvre le queue poly(A) nouvellement formée. (Les modèles sont adaptés de Kuhn et Wahle 2004, Proudfoot 2001 et Dominski et Marzluff 2007)

Suite à la coupure de l'ARN messager, la poly(A) polymérase (PAP) permet l'ajout d'adénosines au groupe OH en 3' du fragment restant. L'activation de la PAP nécessite la présence du CPSF (Fig. 7B). La PAP est alors capable d'ajouter une dizaine de nucléotides, mais cette réaction est lente et distributive, la PAP se dissociant à chaque nucléotide. L'interaction de PABPN1 avec la queue nouvellement formée permet de stimuler la PAP (Wahle, 1991) et ainsi permet l'ajout rapide d'une séquence poly(A) d'environ 250 nucléotides (Bienroth *et al.*, 1993). Cette longueur atteinte, la réaction est de nouveau distributive et lente.

PABPN1 permet donc la stimulation de la poly(A) polymérase en l'attachant à l'ARNm. D'ailleurs, l'interaction de PABPN1 avec la PAP ne se fait qu'en présence d'ARN (Kerwitz *et al.*, 2003). Son rôle est indépendant de la fonction du CPSF même si PABPN1 semble interagir avec la sous-unité CPSF-30 (Chen *et al.*, 1999). L'autre fonction de PABPN1 serait le contrôle de la longueur de la queue poly(A). Des études ont montré que PABPN1 se lie à la queue poly(A) nouvellement formée, avec un monomère de PABPN1 recouvrant une dizaine de nucléotides (Meyer *et al.*, 2002). Une étude *in vitro* a montré que PABPN1 lié à des séquences poly(A) pouvait former des structures filamenteuses de 7nm de diamètre ou des particules sphériques d'un diamètre maximal de 21nm. La transition entre les deux formes dépend de la concentration ionique. Cependant, la forme sphérique semble prédominante quand la séquence poly(A) est comprise entre 200 et 300 résidus (Keller *et al.*, 2000). Comme la taille de ces séquences correspond à la longueur moyenne de la queue poly(A) des ARNm, il est tentant de croire que la structure sphérique imposée à l'ARN par PABPN1 représente un marqueur moléculaire de la longueur de la queue poly(A) (Kuhn *et al.*, 2004).

#### 1.2.2.2. Autres fonctions possibles de PABPN1

Bien que le rôle de PABPN1 dans la régulation de la longueur de la queue poly(A) soit indéniable, quoique encore mal compris, les interactions connues de PABPN1 laissent présager d'autres fonctions pour la protéine. Dans une étude cherchant à identifier les protéines associées au processus de dégradation des ARN messagers (nonsense-mediated decay – NMD), des expériences d'immunoprécipitation ont identifié PABPN1 comme interagissant avec les protéines du complexe CBC et les facteurs Upf2 et Upf3 (Ishigaki *et*

*al.*, 2001). PABPN1 participerait à une première étape de traduction servant à surveiller la qualité des ARNm et occuperait ainsi la fonction physiologique de la Poly(A) Binding Protein Cytoplasmic 1 (PABPC1). Étant donné la fonction de PABPC1 dans la circularisation cytoplasmique de l'ARNm avant la traduction (c.f. section suivante), on peut supposer que PABPN1 pourrait aider à la formation d'un cercle précurseur, dans le noyau, en interagissant avec CBP80/20 et EIF4G dès la fin de la transcription (Chang *et al.*, 2007). Ces études ont aussi permis de montrer qu'une grande partie de la dégradation des ARNm incorrects se faisait dans le noyau ou peu de temps après sa sortie (Wilkinson *et al.*, 2002). Or la dégradation des ARNm commence par une dépolyadénylation. PABPN1 pourrait donc servir à réguler cette dégradation en assurant une stabilisation des ARNm, rôle supposé de PABPC1 dans le cytoplasme (Kuhn *et al.*, 2004 ; Chang *et al.*, 2007).

En 2001, Kim *et al.* ont montré, dans une lignée musculaire stable de souris (C2), que PABPN1 aurait une influence sur la myogenèse en augmentant le taux de différenciation des cellules. Les auteurs ont ainsi montré que l'expression des facteurs myogéniques MYOD1 et MYOG est augmentée dans ces clones exprimant plus de PABPN1 et que cette augmentation était en partie due à l'interaction de PABPN1 avec SNW1 (Kim *et al.*, 2001).

### 1.2.3. Les protéines liant les séquences poly(A) (PABP)

Les queues poly(A) sont attachées de manière permanente à presque tous les ARNm chez les eucaryotes et de manière transitoire à presque tous les ARNm chez les procaryotes. Leur séquence homopolymérique unique leur permet d'être couvertes entièrement par des protéines spécifiques dite *Poly(A) Binding Protein* (PABP) (Mangus *et al.*, 2003 ; Kuhn *et al.*, 2004). Il existe deux types de protéines PABP que l'on retrouve chez tous les eucaryotes : les cytoplasmiques, découvertes dès 1973 (Blobel, 1973) et PABPN1 (Wahle, 1991). Cette section est dédiée à la description de la structure et des fonctions des PABP cytoplasmiques.

### 1.2.3.1. Structure des PABPC

Les PABP cytoplasmiques (PABPC) sont des protéines ubiquitaires d'environ 70 kDa, qui possèdent 4 domaines de liaison à l'ARN de type RRM en N-terminal. Ces domaines sont bien conservés entre les espèces. Ces quatre domaines semblent fonctionner par paire (RRM1 et RRM2 puis RRM3 et RRM4) et ne semblent pas agir de la même manière. La paire RRM1 / RRM2 a une grande affinité pour les séquences poly(A) et est essentielle à la liaison avec la queue poly(A) alors que la paire RRM3 / RRM4 a une moins grande affinité pour les poly(A) et ont été supposé interagir avec une autre molécule d'ARN (Kuhn *et al.*, 2004). Les PABPC contiennent un domaine C-terminal bien conservé qui est composé de 4 à 5 motifs en hélice  $\alpha$ . Ce domaine serait une région d'interaction avec d'autres protéines régulatrices comme PAIP1, PAIP2 et eRF3. Chez l'humain, la principale PABPC est la PABPC1 qui est exprimé dans presque tous les types cellulaires. Mais il en existe d'autres formes : la PABPC3 qui s'exprime dans les testicules et qui est encodée par un gène sans intron, la PABPC4 (initialement décrite comme iPABPC) qui est surexprimé pendant l'activation des cellules T et la PABPC5, dont le gène se trouve sur le chromosome X et qui contient les 4 domaines de liaison à l'ARN mais ne contient pas le domaine C-terminal.

### 1.2.3.2. Fonctions des PABPC

Les PABPC ont un rôle important dans la traduction et la dégradation des ARNm (Chang *et al.*, 2007). Plusieurs études ont révélé le rôle de la queue poly(A) dans le processus d'initiation de la traduction, en particulier grâce à l'interaction entre la région 5' et 3' de l'ARNm pour former un structure circulaire. La traduction est initiée par l'association de EIF4G au complexe protéique lié à la coiffe en 5' (dont EIF4E) et ainsi permet de recruter la sous-unité ribosomale 40S. PABPC permet d'améliorer l'association de EIF4G à la sous-unité 40S. La formation du complexe EIF4E, EIF4G et PABPC impose une structure circulaire à l'ARNm. Cette structure serait importante pour la ré-initiation des ribosomes sur le même ARNm.

Les PABPC sont donc essentiellement des protéines cytoplasmiques. Cependant plusieurs études ont montré que PABPC1 faisait la navette entre le cytoplasme et le noyau

(Afonina *et al.*, 1998 ; Hosoda *et al.*, 2006). De plus, PABPC1 a été montré comme interagissant avec la PAP et liant la queue poly(A) des pré-ARNm qui ne sont pas totalement épissés, dans le noyau des cellules. Le rôle de PABPC1 dans le noyau est encore à déterminer, mais les observations laissent présager que PABPC1 pourrait commencer à remplacer le PABPN1 sur la queue poly(A) avant la sortie de l'ARNm dans le cytoplasme (Hosoda *et al.*, 2006).

Les PABPC sont aussi suspectées de jouer un rôle dans la dégradation des ARNm avant et après la traduction. Cette dégradation se fait en deux étapes : en premier, la dépolyadénylation de l'ARNm, qui est l'étape limitante, puis l'hydrolyse de la structure 7-méthyl-guanosine suivie d'une dégradation en 5' grâce à une réaction exonucléase. Comme les PABPC se trouvent directement liées à la queue poly(A) des ARNm, leur rôle dans la dépolyadénylation semble évident. La nature de ce rôle (protecteur, régulateur ou activateur de la dégradation) reste encore à déterminer. (Wilkinson *et al.*, 2002 ; Kuhn *et al.*, 2004 ; Chang *et al.*, 2007).

### **1.3. Les modèles d'études de la DMOP**

Depuis la découverte de la mutation causant la DMOP dans le gène *PABPN1*, de nombreux modèles de la maladie ont été générés pour tenter de découvrir les mécanismes physiopathologiques menant à la formation des inclusions intranucléaires, la mort cellulaire et ultimement, au phénotype musculaire spécifique observé dans la DMOP. Ces modèles ont aussi été créés pour trouver des thérapies afin de diminuer les symptômes ou empêcher l'apparition du phénotype chez les patients. Plusieurs types de modèles cellulaires ou animaux ont été publiés avec différentes mutations et différents niveaux d'expression de PABPN1.

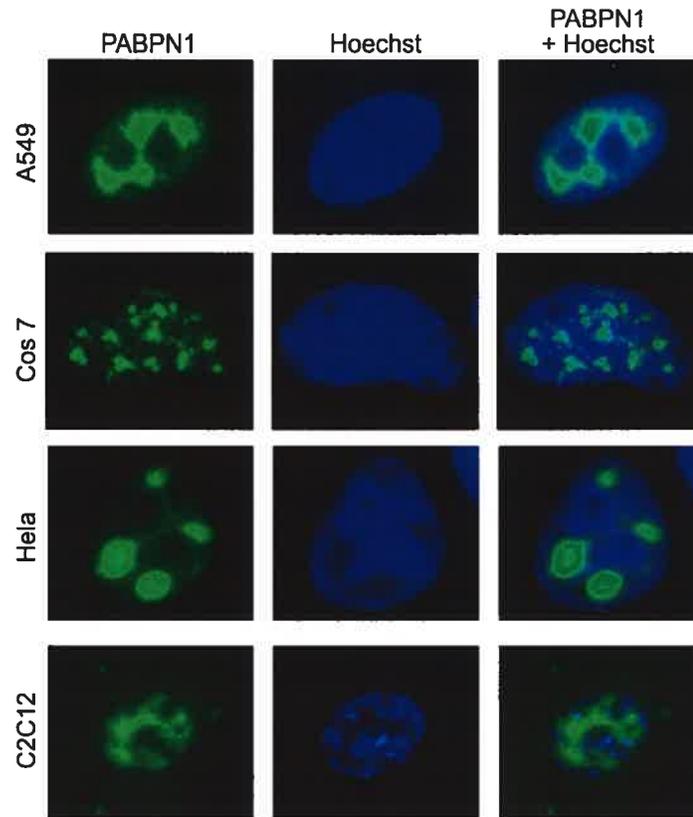
#### **1.3.1. Les modèles cellulaires de la DMOP**

##### **1.3.1.1. Les modèles d'expression**

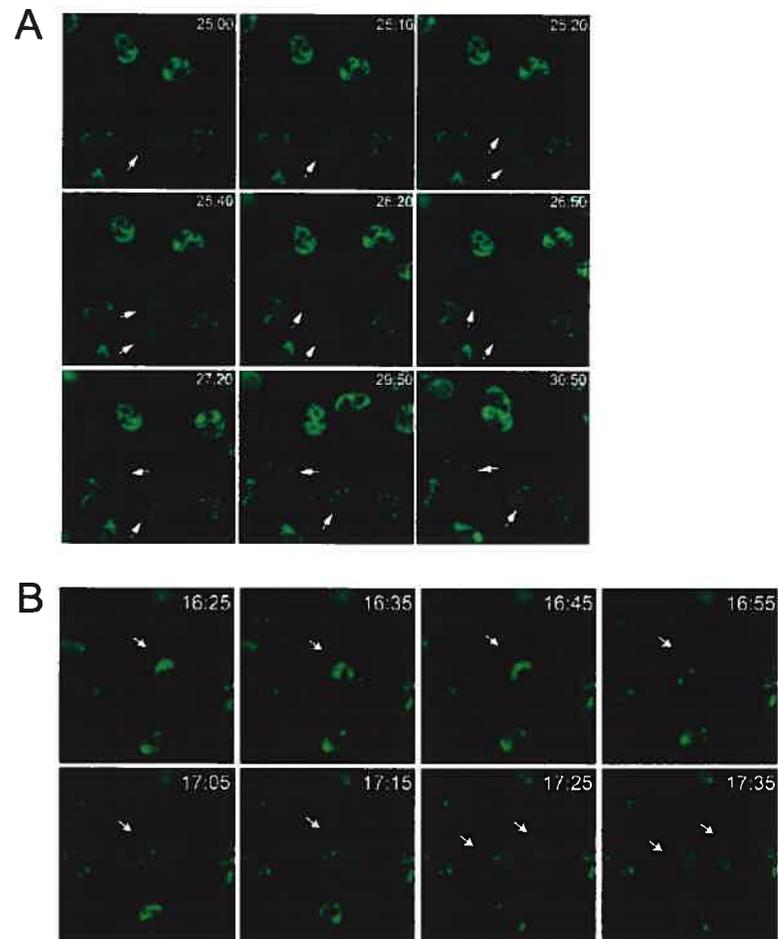
Le premier modèle cellulaire de la DMOP a été publié peu de temps après la confirmation de la présence de PABPN1 dans les IINs de la maladie (Calado *et al.*, 2000c ;

Shanmugam *et al.*, 2000). Ce modèle, comme ceux qui suivirent par la suite, fut généré par l'expression de PABPN1 sous le contrôle d'un promoteur fort de type CMV dans des cellules en culture. L'expression de PABPN1 dans des cellules de différentes origines provoque la formation d'IINs qui partagent plusieurs caractéristiques avec les IINs de la maladie (Fig. 8). Elles sont riches en PABPN1 (Shanmugam *et al.*, 2000), elles excluent l'ADN, elles sont positives pour l'ubiquitine, la sous-unité 20S du protéasome, les chaperonnes moléculaire HSP70 (Abu-Baker *et al.*, 2003), HSP40 (Bao *et al.*, 2002) et pour de l'ARN poly(A) (Tavanez *et al.*, 2005). De plus, des études de microscopie électronique ont montré que ces IINs possédaient une structure filamentaire (Corbeil-Girard *et al.*, 2005), même si l'organisation de ces filaments n'est pas aussi structurée que dans la maladie. Ces IINs ressemblent aux inclusions de type B obtenues dans un modèle de myoblastes innervés (Tomé *et al.*, 1989)(voir section 3.1.2.). De plus, plusieurs études ont montré que l'expression de PABPN1 mutée et la formation d'IINs étaient associées à une augmentation de la mort cellulaire (Bao *et al.*, 2002 ; Abu-Baker *et al.*, 2003 ; Bao *et al.*, 2004 ; Abu-Baker *et al.*, 2005). Cette augmentation apparaît de manière significative après 3 jours post-transfection. La toxicité observée après l'expression de PABPN1 est diminuée par l'utilisation de drogues anti-amyloïdes ou de chaperonnes moléculaires (Bao *et al.*, 2002 ; Abu-Baker *et al.*, 2003 ; Bao *et al.*, 2004 ; Wang *et al.*, 2005b).

Des études sur le dynamisme de formation des IINs ont montré que la protéine était d'abord répartie de manière diffuse dans le noyau puis se concentrait en petits granules qui vont s'agrandir pour former des IINs de taille variables. Celles-ci vont continuer à se déplacer dans le noyau pour s'associer à d'autres IINs (Fig. 9)(Sasseville *et al.*, 2006). Par ailleurs, une autre étude a montré que PABPN1, sauvage ou mutée, n'était pas séquestrée de manière irréversible dans les IINs mais pouvait se déplacer entre les inclusions et le reste du noyau (Tavanez *et al.*, 2005). Malgré la présence d'IINs, les cellules peuvent se diviser en culture. Les inclusions contenues dans le noyau se désagrègent, partiellement ou totalement, et PABPN1 apparaît de manière diffuse dans la cellule. Après la reformation de la membrane nucléaire, PABPN1 est relocalisée dans le noyau et de nouvelles IINs se forment rapidement. Par ailleurs cette étude a confirmé qu'une importante population de PABPN1 restait soluble dans la cellule même en présence de larges IINs (Sasseville *et al.*, 2006).



**Figure 8: La surexpression de PABPN1 provoque la formation d'IIS.** Plusieurs types cellulaires sont transfectées pour exprimer une forme mutante de PABPN1: les cellules A549 avec PABPN1-13 alanines, les cellules Cos7 avec PABPN1-13 alanines fusionné en N-terminal avec un GFP, les cellules Hela avec PABPN1 17 alanines fusionné en C-terminal avec un GFP et les cellules C2C12 avec PABPN1 17 alanines. La surexpression de PABPN1 (vert) induit la formation d'IIS qui excluent l'ADN (en bleu).



**Figure 9 : Les IINs induites par l'expression de PABPN1 sont dynamiques.** **A** – À la suite d'une division, PABPN1 a une localisation diffuse dans la cellule. Après la formation de la membrane nucléaire, elle s'accumule en de petits foci nucléaires, pour devenir des granules qui vont grossir et fusionner pour devenir des inclusions. Les flèches représentent les deux cellules filles après la division. **B** – Les IINs formées par l'expression de PABPN1 (en vert) sont totalement ou partiellement désassemblées au cours de la division cellulaire. Les molécules de PABPN1 reformeront des IINs dans le noyau des cellules filles (identifiées par les flèches). (Illustrations tirées de Sasseville *et al.* 2006).

La plupart de ces études ont été réalisées avec la forme mutée de PABPN1. Toutefois, plusieurs expériences ont démontré que la surexpression de la forme sauvage de PABPN1, dans les mêmes conditions, amenait aussi à la formation IINs (Corêeil-Girard *et al.*, 2005 ; Tavanez *et al.*, 2005). Des données contradictoires ont été publiées quant aux différences observées suite à l'expression des deux formes. Néanmoins, il semble que la taille du domaine polyalanine ne modifie pas la capacité à former des IINs dans ces modèles. Par contre des mutations touchant le domaine coil-coiled ou la partie C-terminale empêchent la formation d'IINs dans le noyau (Abu-Baker *et al.*, 2005 ; Tavanez *et al.*, 2005 ; Messaed *et al.*, 2007).

### 1.3.1.2. Les cultures primaires de myoblastes

Les cultures primaires musculaires ou culture de myoblastes sont dérivées des cellules satellites humaines. Dans le muscle squelettique, les cellules satellites sont les cellules précurseurs qui assurent la croissance pré- et post-natal du muscle squelettique et sa régénération suite à une blessure (Moss *et al.*, 1971). Les cultures de myoblastes sont alors de bons modèles pour l'étude des maladies musculaires puisqu'elles permettent d'étudier les mécanismes pathologiques dans des conditions plus physiologiques que dans des modèles de surexpression (Furling *et al.*, 2001). La population cellulaire mise en culture est relativement pure et peut croître avec un potentiel prolifératif (nombre de division avant la sénescence proliférative) limité dépendant de l'âge du donneur (Decary *et al.*, 1997). Dans un environnement approprié, ces cellules peuvent fusionner et se différencier en myotubes qui peuvent, ultimement se contracter de manière spontanée.

Les cultures de myoblastes isolés du muscle cricopharyngé de patients atteints de la DMOP, ont un taux de myogénicité faible (rapport entre le nombre de myoblastes et de fibroblastes contaminants dans une même culture) et une diminution rapide du potentiel répliatif par rapport aux cellules contrôles. Ce phénotype pourrait être dû à une augmentation du nombre de cellules qui ne se divisent pas (Perie *et al.*, 2006). Cependant, la principale observation est l'absence d'inclusion dans le noyau des cellules mises en culture. La formation d'IINs fut uniquement observée dans des co-cultures de myoblastes différenciés et d'explants provenant de moelle épinière de rats de 12 à 14 jours avec les ganglions de la racine dorsale. Les IINs observées ont été décrites comme étant de type B.

Ces inclusions sont composées de filaments qui ont la même taille que ceux observés dans la DMOP mais avec une structure moins organisée (Tomé *et al.*, 1989).

### **1.3.2. Les modèles animaux de la DMOP**

#### **1.3.2.1. Les modèles murins**

Depuis 2004, trois modèles murins de la DMOP ont été décrits dans la littérature (Hino *et al.*, 2004 ; Davies *et al.*, 2005 ; Dion *et al.*, 2005). Même si ces modèles ont tous été créés grâce à l'expression d'une forme mutée de PABPN1 dans les cellules de l'organisme, ils diffèrent quant à la spécificité du promoteur et du niveau d'expression de la protéine.

Le premier modèle murin publié fait état de l'expression de la protéine PABPN1 humaine sous le contrôle d'un promoteur fort et ubiquitaire de type CAG (Hino *et al.*, 2004). L'expression de PABPN1 mutée (13 alanines), bien que n'étant pas létal au niveau embryonnaire induit une faiblesse musculaire importante mais aussi une mortalité précoce (après 3 semaines) et un retard de croissance. Au niveau histologique, les muscles squelettiques présentent une augmentation de la variabilité de la taille des fibres, une augmentation du nombre de noyaux centraux, une prolifération accrue du tissu conjonctif, la présence occasionnelle de vacuoles bordées et une augmentation du nombre de cellules apoptotiques. Les auteurs observent aussi la formation d'inclusions intranucléaires filamenteuses dans les fibres musculaires.

En 2005, le groupe du Dr Rubinsztein a décrit un modèle murin de la DMOP par surexpression de la forme bovine de PABPN1 sauvage ou mutée (17 alanines) sous le contrôle du promoteur de l'actine squelettique humaine (promoteur fort et spécifique au muscle squelettique) (Davies *et al.*, 2005). L'expression de PABPN1 mutée dans le muscle squelettique induit une faiblesse musculaire progressive observable dès six mois après la naissance sans augmentation notable de la mortalité à 15 mois. L'expression de PABPN1 conduit aussi à la formation d'inclusions filamenteuses dans les noyaux des fibres musculaires. Ils observent aussi l'augmentation du nombre de cellules apoptotiques, de noyaux centraux ainsi que l'apparition de vacuoles .

L'équipe du Dr Rouleau a publié une étude effectuée sur un modèle de souris transgéniques exprimant PABPN1 mutée (17 alanines) sous le contrôle de son promoteur natif (Dion *et al.*, 2005). Les souris exprimant la forme mutée de PABPN1 montrent une faiblesse musculaire relative et des troubles de coordination. Même si aucune IIN n'a été observée dans les muscles squelettiques, des inclusions intranucléaires riches en PABPN1 ont été identifiées dans les tissus neuronaux (neurones et cellules de Purkinje).

Dans ces modèles, si la faiblesse musculaire ou la formation d'inclusions est significative pour l'expression de la forme mutée, la compréhension de la maladie est moins claire avec les résultats de l'expression de la forme sauvage. Deux études ont montré que la surexpression de PABPN1 sauvage conduisait à la formation d'IINs riches en PABPN1, à une fréquence plus faible qu'avec la forme mutée, sans avoir une influence sur la force musculaire (Davies *et al.*, 2005 ; Dion *et al.*, 2005). La présence d'IINs chez un animal non transgénique a d'ailleurs été confirmée par la découverte d'inclusions de type DMOP dans des neurones sécréteurs hyper-activés chez la souris. Les IINs identifiées, qui sont riches en PABPN1 et qui ont une structure organisée, sont formées pendant le pic d'activité des neurones sécréteurs, puis sont désassemblées par la suite (Berciano *et al.*, 2004).

#### 1.3.2.2. Le modèle drosophile

Un modèle de la DMOP a été généré chez la drosophile en surexprimant la forme humaine de PABPN1, sauvage (10Ala) ou mutée (0Ala et 17Ala) sous le contrôle d'un promoteur spécifique aux muscles (essentiellement les muscles des ailes) (Chartier *et al.*, 2006). Une expression spécifique au muscle a été choisie car l'expression ubiquitaire de la forme humaine de PABPN1 chez la drosophile induit la mort de l'organisme dès le stade embryonnaire. Par ailleurs, l'utilisation de la forme humaine permet d'observer l'influence du domaine polyalanine puisque la Pabp2 endogène (homologue de PABPN1 chez la drosophile) n'en possède pas (Benoit *et al.*, 1999 ; Benoit *et al.*, 2005) (Fig. 5B). L'expression de PABPN1 induit un phénotype musculaire, caractérisé par une mauvaise posture des ailes et une incapacité de voler. De plus, l'expression de PABPN1-17Ala conduit à la formation d'IINs filamenteuses de type DMOP dans les muscles observés. Grâce à ce modèle les auteurs démontrent que, chez la drosophile, le domaine polyalanine

n'est pas essentiel à l'agrégation, mais que le domaine de liaison à l'ARN est indispensable (Chartier *et al.*, 2006).

D'autres études dans des modèles transgéniques ont aussi montrés que PABPN1 était essentiel au développement et à la survie de l'embryon chez la drosophile (Benoit *et al.*, 2005).

## **1.4. Les domaines polyalanines**

### **1.4.1. Les domaines polyalanines chez l'homme**

#### **1.4.1.1. Caractérisation**

Depuis 1996, l'étude des maladies à expansion de triplets répétés a pris un nouvel essor avec la description de maladies causées par des expansions de triplets (GCN)/polyalanine comme la synpolydactylie (SPD1) (Akarsu *et al.*, 1996) et la DMOP (Brais *et al.*, 1998a). Depuis, la description de maladies dues à des mutations dans des domaines polyalanines n'a cessé d'augmenter (Amiel *et al.*, 2004 ; Brown *et al.*, 2004 ; Albrecht *et al.*, 2005). Des études récentes ont montré que, chez l'homme, environs 500 protéines se partagent plus de 600 domaines polyalanines contenant plus de quatre alanines. Parmi ces protéines, presque 120 possèdent un domaine de plus de 7 alanines consécutives (Lavoie *et al.*, 2003 ; Albrecht *et al.*, 2004). Même si les séquences polyalanines sont relativement stables, mitotiquement et méiotiquement, les séquences codant pour ces domaines sont fréquemment polymorphiques et sont ainsi des candidats de premier ordre pour les maladies héréditaires (Lavoie *et al.*, 2003). De manière générale, les domaines polyalanines sont plus courts que les domaines polyglutamines. En effet, le plus long domaine a été identifié dans la protéine PHOX2B avec 20 alanines consécutives chez l'humain (Amiel *et al.*, 2003), alors que les domaines polyglutamines peuvent atteindre jusqu'à 40 résidus de suite (Butland *et al.*, 2007). La taille et la localisation du domaine polyalanine sont fortement conservées au sein des mammifères ce qui suggère une pression fonctionnelle et structurale durant l'évolution. Peu d'informations sont connues au sujet du rôle de ces domaines, cependant une forte proportion des protéines qui en contiennent (36%) sont des facteurs de transcription (Lavoie *et al.*, 2003). Ces domaines sont à l'extérieur des domaines connus des protéines dont ils font partie et leur position dans la

structure, bien que souvent localisés en N-terminal, peut être très variable (Amiel *et al.*, 2004)

#### 1.4.1.2. Les maladies à expansion de domaine polyalanine

En plus des mutations découvertes dans la DMOP, huit autres maladies ont été décrites dans la littérature comme étant causées par des expansions de domaine polyalanine (Tableau 2) : la synpolydactylie (SPD1) est une maladie autosomique dominante congénitale qui provoque la fusion des doigts (syndactylie) et la présence de doigts surnuméraires (polydactylie)(Muragaki *et al.*, 1996). Les mutations causant cette maladie sont des expansions de domaines polyalanines dans la protéine HOXD13 (Homeobox D13) (Akarsu *et al.*, 1996). Le domaine normal a une longueur de 15 alanines. Il existe une bonne corrélation entre la taille de l'expansion et la sévérité de la maladie (Goodman *et al.*, 1997). Plusieurs études suggèrent que la mutation provoque un effet dominant négatif (Brown *et al.*, 2004) et, potentiellement, la séquestration de la protéine dans le cytoplasme (Albrecht *et al.*, 2004).

Le syndrome main-pied-utérus (HFGS) est une maladie autosomique dominante provoquant un raccourcissement des orteils, la fusion des os des mains et des pieds ainsi que diverses malformations génitales, en particulier de l'utérus (Mortlock *et al.*, 1997). Les mutations causant la maladie ont été découvertes dans le gène codant pour HOXA13 (Homeobox A13) et conduisent souvent à la formation de protéines tronquées. Ce facteur de transcription contient trois domaines polyalanines (d'une longueur de 14, 12 et 18 alanines respectivement) et des expansions ont été décrites pour chacun de ces domaines. Ces mutations induisent le même phénotype que celui décrit pour les autres mutations dites "à perte de fonction" suggérant que l'expansion du domaine polyalanine conduit également à une perte de fonction de la protéine (Goodman *et al.*, 2000).

L'holoprocéphalie de type 5 (HPE5) est un syndrome sévère qui provoque des malformations importantes dans l'architecture du cerveau au cours de l'embryogenèse (Brown *et al.*, 1998). Les mutations conduisant à la maladie ont été trouvées dans le gène codant pour le facteur de transcription ZIC2 (Zic Family Member 2) et conduisent à un effet de perte de fonction de la protéine. Plusieurs patients démontrent une expansion de la

**Tableau 2:** Les maladies causées par des expansions de domaine polyalanine

Maladie	Nom	OMIM	Gène	Domaine polyalanine	Mutations	Mécanisme supposé
DMOP	Dystrophie musculaire oculopharyngée	164300	<i>PABPN1</i>	10 Ala	11 - 17 Ala	Multi-mécanismes: gain et perte de fonction en parallèle
HPES	Holoproencéphalie de type 5	609637	<i>ZIC2</i>	15 Ala	25 Ala	Perte de fonction
SPD1	Sympolydactylie, 1	186000	<i>HOXD13</i>	15 Ala	22 - 29 Ala	Dominant négatif
HFGS	Syndrome Main-Pieds-Uterus	140000	<i>HOXA13</i>	14 Ala 12 Ala 18 Ala	24 Ala 12-18 Ala 24-30 Ala	Dominant négatif, Perte de fonction partielle
CCD	Dysplasie cleidocraniale	119600	<i>RUNX2</i>	17 Ala	27 Ala	Perte de fonction
BPES	Syndrome blepharophimosis/ptosis/epicanthus inversus	110100	<i>FOXL2</i>	14 Ala	22, 24 Ala	Perte de fonction partielle
CCHS	Syndrome d'hypoventilation alvéolaire centrale congénitale / Syndrome d'Ondine	209880	<i>PHOX2B</i>	20 Ala	25-33 Ala	Perte de fonction
ISSX/MR	Retard mental lié au chromosome X / syndromes de West (WS) / syndrome de Partington (PRTS)	308350 309510	<i>ARX</i>	16 Ala 12 Ala	18, 23 Ala 20 Ala	Perte de fonction partielle
MRGH	Syndrome de retard mental et de déficience en hormone de croissance lié au chromosome X	300123	<i>SOX3</i>	15 Ala	26 Ala	Inconnu

séquence codant pour le domaine polyalanine de la protéine (passant de 15 alanines à 24 alanines). Ce type de mutation induit le même phénotype que les délétions ou les autres mutations à perte de fonction, suggérant ainsi que l'expansion du domaine polyalanine conduit aussi à un effet de perte de fonction de la protéine (Brown *et al.*, 2001).

La dysplasie cléidocraniale (CCD) est une maladie autosomique dominante provoquant des malformations du squelette, particulièrement au niveau du crâne, des clavicules et des dents (Mundlos *et al.*, 1997). Des mutations causant la maladie ont été trouvées dans le gène codant pour RUNX2 (Runt-related Transcription Factor 2). Quelques patients présentent une duplication de 30pb provoquant une expansion du domaine polyalanine de 17 à 27 alanines. Le phénotype de ces patients est légèrement différent de celui observé chez les patients qui ont des mutations à perte de fonction. Ces observations suggèrent que l'expansion pourrait ajouter un effet gain-de-fonction. Cependant, ce type de mutation reste très rare pour la maladie. Par ailleurs, des délétions de 18pb dans ce domaine sont des polymorphismes fréquents dans la population générale, ce qui suggère que le domaine polyalanine devient important uniquement quand il est trop long (Mundlos, 1999 ; Otto *et al.*, 2002).

Le syndrome blepharophimosis/ptosis/epicanthus inversus (BPES) est une maladie héréditaire dominante provoquant des malformations faciales diverses notamment au niveau des paupières (Crisponi, 2001). Les mutations causant la maladie ont été découvertes dans le gène codant pour FOXL2 (Forkhead Box L2). Parmi ces mutations, les plus fréquentes sont des expansions du domaine polyalanine, dont la longueur normale est 14 alanines. Comme ces expansions provoquent le même phénotype que les autres mutations à perte de fonction décrites, cela suggère que l'expansion du domaine polyalanine provoque une perte de fonction au moins partielle de la protéine (Cocquet *et al.*, 2002 ; De Baere *et al.*, 2003 ; Beysen *et al.*, 2005).

Le syndrome d'hypoventilation alvéolaire centrale congénitale (CCHS ou syndrome d'Ondine) est une maladie provoquant des problèmes de développement du système nerveux autonome (Amiel *et al.*, 2003 ; Sasaki *et al.*, 2003). Les patients atteints de cette maladie ont des réponses respiratoires imparfaites suite à une hypercapnie (augmentation du taux de CO<sub>2</sub> dans le sang) ou à une hypoxémie (diminution du taux d'oxygène dans le sang). Les mutations causant la maladie ont été identifiées dans le gène codant pour

PHOX2B (Paired-like Homeobox 2B). Ces mutations consistent en des expansions dans un des deux domaines polyalanines de la protéine. Le domaine en question est, par ailleurs le plus long domaine polyalanine observé chez l'humain (20 alanines consécutives) et une mutation identifiée dans ce domaine en fait le plus long domaine polyalanine jamais observé chez l'humain (33 alanines) (Matera *et al.*, 2004 ; Trochet *et al.*, 2005).

Des expansions dans deux des quatre domaines polyalanines de la protéine ARX (Aristaless Related Homeobox) ont été décrites dans des familles présentant un retard mental lié au chromosome X (ISSX/MR) ou présentant des syndromes de West (WS) ou Partington (PRTS) (les deux syndromes incluent des retards mentaux de modérés à sévères, des spasmes infantiles pour le WS et des mouvements dystoniques pour le PRTS). Les études semblent suggérer que les mutations provoquent une perte de fonction au moins partielle de ARX (Bienvenu *et al.*, 2002 ; Stromme *et al.*, 2002).

Une recherche de mutations dans une grande famille ayant un syndrome de retard mental et de déficience en hormone de croissance lié au chromosome X (MRGH) a permis d'identifier une expansion de domaine polyalanine responsable de la maladie dans le facteur de transcription SOX3 (*Sex Determining Region Y- Box 3*) (Laumonnier *et al.*, 2002). Des délétions du domaine polyalanine de SOX3 furent aussi identifiées chez deux patients avec un retard mental, mais sans qu'une corrélation puisse être effectuée avec le phénotype de la première famille.

#### **1.4.2. Agrégation des polyalanines**

Plusieurs études *in vivo* suggèrent que les interactions entre de nombreuses séquences polyalanines assurent la force de tension des fibres de la soie des araignées et que les séquences polyalanines participent en plus à la formation des coquilles et tendons des mollusques (Simmons *et al.*, 1996 ; Tirrell, 1996 ; Qin *et al.*, 1997). L'étude des propriétés biophysiques et de l'agrégation des séquences polyalanines peuvent aider à une meilleure compréhension des maladies dues à une expansions de ces domaines.

#### 1.4.2.1. Les études *in silico* et *in vitro*

Des études *in vitro* ont montré que les domaines polyalanines pouvaient former spontanément des structures en feuillet- $\beta$ . Ces structures sont très résistantes à la dégradation enzymatique et la dénaturation chimique (Forood *et al.*, 1995 ; Blondelle *et al.*, 1997 ; Shinchuk *et al.*, 2005). La transition d'une structure aléatoire en hélice- $\alpha$  à une structure organisée et insoluble en feuillets- $\beta$  varie en fonction du nombre d'alanines consécutives, des résidus qui encadrent cette séquence, de la concentration ionique et du pH (Shinchuk *et al.*, 2005 ; Giri *et al.*, 2007). Cette transition est médiée par des interactions hydrophobes entre les groupes méthyles des alanines. Un minimum de 7 alanines consécutives est nécessaire pour la transition. Cependant les peptides de plus de 10 alanines sont capables de former des structures fibrillaires et ainsi favoriser la formation de liens covalents entre les différents peptides (Giri *et al.*, 2007). Par ailleurs, de nombreuses études de simulations *in silico* se servent des domaines polyalanines comme modèle pour tester les transition d'hélice- $\alpha$  à feuillets- $\beta$ . Ces études ont permis de confirmer les résultats obtenus expérimentalement, de mieux appréhender les forces mises en jeu et de vérifier qu'une structure en feuillets- $\beta$  peut être le site de nucléation pour la formation de structures organisées (Ma *et al.*, 2002 ; Nguyen *et al.*, 2004, 2005, 2006 ; Soto *et al.*, 2006).

#### 1.4.2.2. Les études de l'agrégation dans des modèles cellulaires

##### 1.4.2.2.1. Agrégation des séquences polyalanines

Afin d'étudier la capacité d'agrégation des polyalanines, plusieurs équipes ont exprimé de manière transitoire des domaines polyalanines de différentes tailles couplés à des marqueurs fluorescents dans des modèles cellulaires (Rankin *et al.*, 2000 ; Oma *et al.*, 2004). L'équipe du Dr Rubinsztein a comparé les expressions de séquences polyalanines, d'une longueur comprises entre 10 et 29 alanines, couplées à la GFP. Ils observèrent alors que les molécules contenant plus de 19 alanines pouvaient former des agrégats cytoplasmiques, que la formation de ces agrégats était reliée à de la toxicité cellulaire (Rankin *et al.*, 2000 ; Ravikumar *et al.*, 2002 ; Berger *et al.*, 2006a ; Berger *et al.*, 2006b) et qu'ils étaient dégradés par des processus d'autophagie (Ravikumar *et al.*, 2002). Les travaux de Oma *et al.* publiés entre 2004 et 2007 ont montré, entre autres, que l'expression de 70

alanines couplées à la YFP (Yellow Fluorescent Protein) induisait dans 80% des cas la formation d'agrégats (Oma *et al.*, 2004) et que l'expression de domaines polyalanines était associée à une toxicité cellulaire modérée (Oma *et al.*, 2005). Les divergences entre les résultats obtenus par les deux équipes laissent présager que l'agrégation des polyalanines dans des modèles cellulaires est dépendante d'autres facteurs que la longueur du domaine.

#### 1.4.2.2.2. Agrégation des protéines contenant un domaine polyalanine

Dans un contexte où seule PABPN1 était connue pour former des inclusions *in vivo* et *in vitro*, et où l'étude de l'agrégation des domaines polyalanines donnaient des résultats contradictoires, plusieurs équipes ont montré que toutes les protéines impliquées dans des maladies à expansion de domaines polyalanines pouvaient former des inclusions dans des modèles cellulaires. En 2004, les travaux publiés par Albrecht *et al.* montrent que la surexpression de formes mutées de HOXA13, HOXD13, SOX3 et RUNX2 conduisait à la formation d'inclusions dans le cytoplasme des cellules transfectées (Albrecht *et al.*, 2004). Cette étude fut suivie par trois autres publications montrant que l'expression de formes mutées de PHOX2B, FOXL2 et ARX pouvait aussi induire la formation d'inclusions nucléaires (Caburet *et al.*, 2004 ; Nasrallah *et al.*, 2004 ; Bachetti *et al.*, 2005). Dans l'ensemble, les inclusions formées par ces protéines sont peu caractérisées. Les inclusions formées par ARX sont nucléaires, proches de la membrane et ont une structure fibrillaire. De plus, elles contiennent, comme les inclusions induites par l'expression de PHOX2B, des protéines du système ubiquitine-protéasome, suggérant un problème de conformation (Nasrallah *et al.*, 2004 ; Bachetti *et al.*, 2006). Il est aussi intéressant de constater que la forme sauvage de ARX induit la formation d'agrégats nucléaires et que l'expansion du 2<sup>ème</sup> domaine polyalanine induit aussi la production d'inclusions qui sont à la fois cytoplasmiques et nucléaires (Shoubridge *et al.*, 2007). Finalement, Brown *et al.* ont montré que la forme mutée de ZIC2 (25 alanines) ne formait pas d'inclusions. Toutefois, une forme contenant un domaine de 35 alanines (qui n'a jamais été observé chez l'humain) pouvait former de petits agrégats à la fois nucléaires et cytoplasmiques (Brown *et al.*, 2005). Ces études confirment donc le potentiel agrégatif des domaines polyalanines dans un contexte protéique et dans des modèles cellulaires. Cependant l'éventuelle présence

d'agrégats de ce type chez les patients atteints de ces maladies n'a pas été confirmée. Seule une étude sur un modèle souris de SPD1 montre un marquage anormal de HOXD13 dans le cytoplasme des cellules observées (Albrecht *et al.*, 2004).

Pour plusieurs de ces protéines (HOXA13, HOXD13, RUNX2, SOX3, ARX et PHOX2B), les auteurs ont aussi montré que l'augmentation de la taille du domaine polyalanine corrèle avec une relocalisation de la protéine du noyau vers le cytoplasme où elle agrège. L'expansion, au-delà d'un seuil d'environ 23-25 alanines, conduirait à la relocalisation et l'agrégation (Albrecht *et al.*, 2004 ; Bachetti *et al.*, 2005 ; Shoubridge *et al.*, 2007). Ces observations, ajoutées à celles obtenues dans les études de domaines polyalanines fusionnés à un marqueur fluorescent, suggèrent que l'agrégation de grandes séquences polyalanines, ou des protéines qui en contiennent, seraient préférentiellement cytoplasmiques et dû à une propriété intrinsèque du domaine.

### **1.4.3. Comparaisons entre les maladies à expansion de domaines polyalanines et polyglutamines**

#### **1.4.3.1. Les maladies à expansion de domaines polyglutamines**

Les maladies à expansion de domaines polyglutamines représentent un groupe de neuf maladies génétiquement distinctes qui sont causées par des expansions de triplets codants (GAC). Ces maladies incluent : la maladie de Huntington (HD), la *dentatorubral-pallidolusyan atrophy* (DRPLA), la maladie de Kennedy (SBMA) et six ataxies spino-cerebelleuses (SCA1, -2, -3, -6, -7 et -17) (Gatchel *et al.*, 2005 ; Orr *et al.*, 2007). Ces maladies sont caractérisées par la dégénérescence d'une population neuronale spécifique à chaque maladie, bien que les protéines mutées soient exprimées de manière ubiquitaire au sein du système nerveux central. Pour toutes ces maladies, les symptômes apparaissent à l'âge adulte, mais l'atteinte sélective de certaines régions du cerveau conduit à des phénotypes cliniques et pathologiques différents pour chaque condition. La caractéristique pathologique commune à toutes ces maladies est la formation d'agrégats dans le noyau ou le cytoplasme des neurones atteints (Michalik *et al.*, 2003). La formation de ces inclusions est très probablement due à un effet de gain de fonction provoqué par l'expansion du domaine polyglutamine. Les domaines polyglutamines peuvent former des structures

secondaires en feuillets- $\beta$  s'organisant en filaments. Les protéines mutées sont les principaux constituants de ces inclusions même si on y retrouve aussi des protéines du système ubiquitine-protéasome, des chaperonnes moléculaires, et d'autres protéines comme des facteurs et co-facteurs de transcriptions (Michalik *et al.*, 2003).

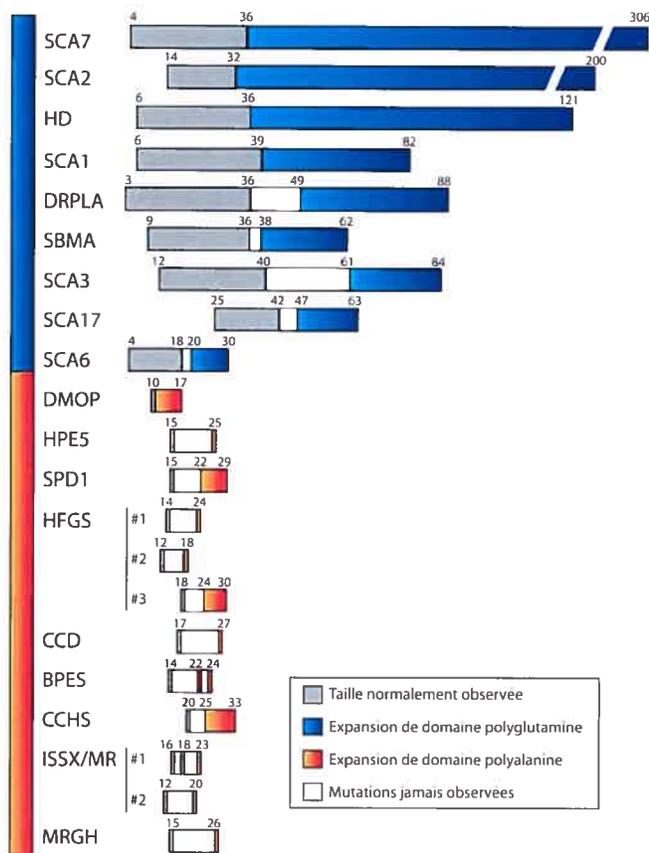
Le rôle de ces agrégats dans les mécanismes pathologiques est encore très controversé dans la communauté scientifique. L'hypothèse la plus acceptée actuellement est que les agrégats formés induiraient la neuro-dégénérescence. Cette hypothèse est fortement appuyée par l'effet protecteur induit par l'addition de chaperonnes moléculaires (Comme HSPA1B et HSP40) ou de drogues anti-amyloïdes (comme le Congo-Red et la doxycycline) qui réduisent la formation d'agrégats et la toxicité cellulaire. Les inclusions pourraient être pathogéniques en bloquant le système ubiquitine-protéasome ou en séquestrant d'autres protéines, comme des partenaires d'interactions de la protéine mutée et d'autres protéines possédant un domaine polyglutamine. Mais la relation entre la formation d'agrégats et la toxicité cellulaire reste incertaine, du fait des nombreux résultats contradictoires obtenus avec les différents modèles cellulaires. Cependant, plusieurs études montrent que les inclusions formées pourraient avoir un rôle protecteur en protégeant la cellule des effets néfastes de la forme soluble de la protéines mutée. Cette hypothèse est appuyée par des études montrant une survie plus importante des cellules arborant des inclusions comparées aux cellules qui montrent une expression diffuse de la protéine mutée et d'autre part, par l'absence occasionnelle d'inclusions dans les régions du cerveau atteintes par la dégénérescence.

#### **1.4.3.2. Comparaison entre la DMOP et les maladies à expansion de domaine polyalanine ou polyglutamine.**

Dans le champ des maladies à expansion de domaine polyalanine, la DMOP fait office d'exception, puisque toutes les autres maladies de ce groupe sont congénitales et impliquent des facteurs de transcriptions. La DMOP est une maladie aux symptômes tardifs et impliquant un facteur ubiquitaire de polyadénylation. De plus, la DMOP est la seule maladie à polyalanine où la formation d'inclusions pathologiques a été observée *in vivo*. Par conséquent, la DMOP se rapproche plus des maladies à expansion de domaine polyglutamine où l'expression de protéines mutées est associée à la formation d'inclusions

et à de la toxicité neuronale au cours de la vie adulte. Les IINs produites dans la DMOP et ses différents modèles ont beaucoup de points communs avec les agrégats produits par les expansions de domaines polyglutamines : la présence de composants du système ubiquitine-protéasome, la présence de chaperonnes, la structure fibrillaire et aussi leur rôle contesté dans les mécanismes pathologiques. De plus une étude a montré que les inclusions observées chez les patients DMOP étaient marquées par l'anticorps 1C2, spécifique des inclusions formées dans les maladies polyglutamines (Michalik *et al.*, 2003 ; Sugaya *et al.*, 2003).

La plus grande différence observée, entre les maladies polyalanine et polyglutamine, est la taille des domaines impliqués ainsi que celle des mutations. En comparant la taille des expansions de domaines polyalanines et polyglutamines causant des maladies (Fig. 10), on remarque que les expansions de domaine polyalanine causant des pathologies sont plus courtes que pour les maladies à polyglutamine. Les expansions de domaine polyalanine varient de 1 et 14 alanines. La plus petite mutation observée pour une maladie à polyglutamine est une addition de 9 résidus supplémentaires dans SCA6. La plus grande mutation observée dans une maladie polyalanine a été identifiée dans la protéine HOXD13 avec une addition de 14 alanines qui amène le domaine à 29 alanines consécutives et le plus long domaine polyalanine pathologique a été décrit dans PHOX2B avec 33 alanines consécutives observées chez des patients CCHS (addition de 13 alanines) (Brown *et al.*, 2004). Par ailleurs, la DMOP se démarque encore des autres maladies à polyalanines par la taille du domaine polyalanine de sa protéine mutée. PABPN1 est la protéine qui a le domaine polyalanine le plus court avec 10 alanines et qui a aussi la plus petite mutation causant une maladie : l'ajout de deux alanines induit la forme dominante de la DMOP (Fig. 10). De plus, l'ajout d'un seul résidu conduit à la forme récessive de la maladie ou une forme plus sévère, si cette mutation est associée à une mutation dominante (Brais *et al.*, 1998a).



**Figure 10: Comparaison des mutations observées dans les maladies à expansions de domaine polyalanine et polyglutamine.** Représentation graphique des mutations observées dans les maladies à expansion de domaine polyglutamine et polyalanines. La taille du domaine normal (gris), l'ensemble des mutations observées dans ces maladies (bleu pour polyglutamine, orange pour polyalanine) ainsi que les mutations qui ne sont jamais observées (blanc) sont représentés. De manière générale, les domaines polyalanines et leurs expansions sont plus courts que les domaines polyglutamines et leurs expansions, à l'exception de SCA6 (Figure adaptée du mémoire de maîtrise de H. Lavoie, données issues de Gatchel et Zoghbi 2005, Orr et Zoghbi 2007).

### 1.5. Mécanismes physiopathologiques et approche expérimentale

Plusieurs observations laissent supposer que la mutation dans la DMOP provoque un effet "gain de fonction" pour PABPN1. Cette hypothèse est appuyée par l'observation d'une taille normale des queues poly(A) des ARNm dans les cellules provenant de patients hétérozygotes ou homozygotes atteints de la DMOP (Calado *et al.*, 2000c). En plus, compte tenu de la nature essentielle et ubiquitaire de la protéine pour le métabolisme cellulaire (Wahle, 1991 ; Benoit *et al.*, 2005), l'occurrence de patients homozygotes vivants confirme que les fonctions de PABPN1 ne sont pas ou peu affectées par les mutations (Blumen *et al.*, 1999). À ce jour, aucun changement des niveaux d'expression de PABPN1 n'a été observé dans les tissus atteints par la maladie ou dans l'organisme en général.

Le principal argument en faveur d'un effet "gain de fonction" reste la présence d'inclusions pathologiques observée chez les patients atteints de la DMOP. Les mécanismes de formation de ces IINs sont encore mal compris. Les études *in vitro* et les simulations sur des séquences polyalanines (décrites à la section 1.4.2.1.) suggèrent que l'expansion du domaine polyalanine modifierait la conformation adoptée par le domaine, favorisant ainsi l'apparition de structures fibrillaires (Shinchuk *et al.*, 2005 ; Giri *et al.*, 2007). Les études effectuées *in vitro* avec la partie N-terminale de PABPN1 (contenant le domaine polyalanine) confirment cette hypothèse en montrant qu'une expansion de sept alanines permet la formation de structures fibrillaires plus rapidement qu'avec la forme sauvage (Scheuermann *et al.*, 2003 ; Lodderstedt *et al.*, 2007). Même si l'étude de l'agrégation de PABPN1 dans des modèles cellulaires ou animaux suggère que le domaine polyalanine n'est pas essentiel à la formation d'agrégats, l'impact de la mutation sur la formation des IINs est indéniable (Kuhn *et al.*, 2003 ; Tavanez *et al.*, 2005 ; Chartier *et al.*, 2006).

Le rôle des IINs formées dans la DMOP, tout comme celui des inclusions observées dans les maladies à polyglutamines n'est pas clair. Les études réalisées avec les divers modèles publiés de la maladie suggèrent que la formation des IINs est liée à la toxicité observée. En effet, l'utilisation de drogues anti-amyloïdes, de chaperonnes moléculaires (HSPA1B ou HSP40) et de composés favorisant une réponse de type *heat-shock* permet de réduire le nombre d'inclusions formées ainsi que la toxicité observée de manière dose dépendante (Bao *et al.*, 2002 ; Abu-Baker *et al.*, 2003 ; Bao *et al.*, 2004 ; Davies *et al.*,

2005 ; Wang *et al.*, 2005b ; Davies *et al.*, 2006b). Le défi principal, dans le cas où les IINs seraient la cause de la toxicité cellulaire, reste de comprendre les mécanismes amenant à cette toxicité. Une hypothèse serait que les IINs pourraient séquestrer des protéines ou des ARNm spécifiques, importants pour le métabolisme et la survie cellulaire, réduisant ainsi leur disponibilité (Brais, 2003).

Afin d'étudier l'impact de la formation des inclusions intranucléaires sur le comportement cellulaire ainsi que leurs compositions, notre laboratoire a élaboré un modèle cellulaire de la maladie par surexpression de PABPN1. La description de ce modèle ainsi que les résultats obtenus grâce à son utilisation, sont présentés dans le chapitre 2 de cette thèse, sous forme d'un article de recherche publié dans le périodique *Neurobiology of Disease* en 2005.

Les résultats obtenus, par nous et d'autres équipes, sur l'agrégation de la forme sauvage de PABPN1 ont soulevé des questions sur le rôle premier du domaine polyalanine dans les mécanismes physiopathologiques de la DMOP (Corbeil-Girard *et al.*, 2005 ; Tavanez *et al.*, 2005). De plus, les études menées sur les protéines impliquées dans les autres maladies à expansion de domaine polyalanine laissent présager que ces domaines polyalanines pourraient avoir un rôle indépendant de leur contexte protéique. Afin d'éclaircir le rôle du domaine polyalanine dans PABPN1 et son impact sur l'apparition des IINs, notre laboratoire a généré des constructions de PABPN1 arborant différentes mutations: absence du domaine polyalanine ou grande expansion du domaine (entre 25 et 40 alanines). Les résultats obtenus lors de cette étude sont présentés dans le chapitre 3 de cette thèse sous la forme d'un article de recherche soumis à *Experimental Cell research*.

La dernière partie de cette thèse est consacrée à l'interprétation des résultats présentés dans les chapitres 2 et 3 dans le contexte des connaissances actuelles. Les résultats et les hypothèses avancés sont mis en rapport avec les plus récentes études sur la DMOP. Ils sont aussi discutés en fonction des recherches effectuées sur les autres maladies à expansion de domaine polyalanine et polyglutamine. Finalement, ce dernier chapitre étudie les différentes directions possibles pour la continuation du projet en fonction des résultats obtenus.

## **Chapitre 2 : La surexpression de PABPN1 entraîne la régulation positive de nombreux gènes codant pour des protéines nucléaires qui sont séquestrées dans les IINs de la DMOP**

### **Contribution des co-auteurs**

**A.K. Klein** a participé à toutes les étapes du projet. Il a effectué une partie du travail de biologie cellulaire et l'immunohistochimie dans le modèle cellulaire et les tissus de patients. Il a participé à l'analyse préliminaire des études d'expression qui a abouti à l'identification de candidats à tester. Il a contribué largement à l'élaboration des figures et à l'écriture du texte

**L.P. Corbeil Girard** a participé à toutes les étapes du projet, en particulier a été impliqué dans les études d'expression par puce Affymetrix et Northern blot, et dans l'analyse des résultats. Il a contribué largement à l'élaboration des figures et à l'écriture du texte.

**A.M.J. Sasseville** a contribué l'élaboration des adénovirus, à la caractérisation de l'expression de PABPN1 et à la correction du manuscrit.

**H. Lavoie** a été impliqué dans les études préliminaires du projet, en particulier la caractérisation du modèle cellulaire par immunohistochimie.

**M.J. Dicaire** a été impliqué dans l'élaboration, la production, la purification et le titrage des constructions adénovirales. Elle a effectué une partie du travail de biologie cellulaire.

**A. St-Denis** a participé à la production de résultats avec le modèle cellulaire.

**M. Pagé** a participé à la production de résultats avec le modèle cellulaire.

**A. Duranceau** collabore avec nous sur le projet pour l'obtention de biopsies de patient DMOP.

**J.P. Bouchard** collabore avec nous sur le projet pour le recrutement de patients.

**G. Karpati** collabore avec nous sur le projet pour l'immunohistochimie effectuée sur les biopsies de patients

**G.A. Rouleau** : Collabore avec nous sur le projet, notamment dans les phases préliminaires

**B. Massie** collabore avec nous sur le projet pour l'élaboration des constructions adénovirales

**Y. Langelier** a participé à l'élaboration et au suivi du projet. Il a également participé à l'écriture du manuscrit.

**B. Brais** a supervisé toutes les étapes du projet, de l'élaboration du projet et des expériences jusqu'à l'écriture du manuscrit.

***PABPN1* overexpression leads to upregulation of genes encoding nuclear proteins that are sequestered in oculopharyngeal muscular dystrophy nuclear inclusions**

Louis-Philippe Corbeil-Girard<sup>1\*</sup>, Arnaud F. Klein<sup>1\*</sup>, A. Marie-Josée Sasseville<sup>1,8</sup>, Hugo Lavoie<sup>1</sup>, Marie-Josée Dicaire<sup>1</sup>, Anik Saint-Denis<sup>1</sup>, Martin Pagé<sup>1</sup>, André Duranceau<sup>2</sup>, François Codère<sup>3</sup>, Jean-Pierre Bouchard<sup>4</sup>, George Karpati<sup>3</sup>, Guy A. Rouleau<sup>3</sup>, Bernard Massie<sup>5,6,7</sup>, Yves Langelier<sup>6,8</sup> and Bernard Brais<sup>1,8†</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire de Neurogénétique, Centre de Recherche du CHUM, Université de Montréal, Montréal, Québec, H2L 4M1, Canada;

<sup>2</sup> Service de chirurgie thoracique, CHUM, Université de Montréal, Montréal, Québec, H2L 4M1, Canada;

<sup>3</sup> McGill Health Center, McGill University, Montréal, Québec, H3G A14, Canada;

<sup>4</sup> CHA-Hôpital Enfant-Jésus, Université Laval, Québec, Québec, G1J 1Z4, Canada;

<sup>5</sup> Institut de Recherche en Biotechnologie, Conseil National de Recherche du Canada, Montréal, Québec, H4P 2R2, Canada;

<sup>6</sup> Département de microbiologie et immunologie, Université de Montréal, Montréal, Québec, H3C 3J7, Canada;

<sup>7</sup> INRS-IAF Université du Québec, Laval, Québec, H7V 1B7, Canada;

<sup>8</sup> Centre de Recherche du CHUM, Université de Montréal, Montréal, Québec, H2L 4M1, Canada.

\* The first two authors should be regarded as joint First Authors.

¶ Corresponding author:

Bernard Brais MD, MPhil, PhD  
Centre de recherche du CHUM, M4211-L3  
Hôpital Notre-Dame-CHUM  
1560 Sherbrooke est  
Montréal, Québec  
H2L 4M1, Canada  
Tel: 1-514-890-8000 Ext.: 25560  
Fax: 1-514-412-7525

## Abstract

Oculopharyngeal muscular dystrophy (OPMD) is an adult-onset disease caused by expanded (GCN)<sub>12-17</sub> stretches encoding the N-terminal polyalanine domain of the poly(A) binding protein nuclear 1 (PABPN1). OPMD is characterized by intranuclear inclusions (INIs) in skeletal muscle fibers, which contain PABPN1, molecular chaperones, ubiquitin, proteasome subunits and poly(A)-mRNA. We describe an adenoviral model of PABPN1 expression that produces INIs in most cells. Microarray analysis revealed that PABPN1 overexpression reproducibly changed the expression of 202 genes. 60% of upregulated genes encode nuclear proteins, including many RNA and DNA binding proteins. Immunofluorescence microscopy revealed that all tested nuclear proteins encoded by eight upregulated genes colocalize with PABPN1 within the INIs: CUGBP1, SFRS3, FKBP1A, HMG2, HNRPA1, PRC1, S100P and HSP70. In addition, CUGBP1, SFRS3 and FKBP1A were also found in OPMD muscle INIs. This study demonstrates that a large number of nuclear proteins are sequestered in OPMD INIs, which may compromise cellular function.

*Keywords:* muscular dystrophy, OPMD, PABPN1, polyalanine, intranuclear inclusion

## Introduction

Oculopharyngeal muscular dystrophy (OPMD, MIM 164300) is an autosomal dominant disease of late onset characterized by progressive eyelid drooping (ptosis), swallowing difficulties (dysphagia) and proximal limb weakness. OPMD has a worldwide distribution and is particularly frequent among French Canadians due to a founder effect (Brais, 2003). The OPMD locus was mapped to chromosome 14q11.1 by linkage analysis (Brais *et al.*, 1995) and the mutation responsible for the disease was found to be within the polyadenylate-binding protein nuclear 1 (*PABPN1*) gene (Brais *et al.*, 1998a). In dominant OPMD, a (GCN)<sub>10</sub> repeat coding for a polyalanine domain at the N-terminal part of the protein is expanded to a (GCN)<sub>12-17</sub> repeat (Brais, 2003). The pathological hallmark of the disease is the presence of intranuclear inclusions (INIs) in skeletal muscle fibers (Tomé *et al.*, 1980). These inclusions contain tubular filaments that are generally arranged in palisades or tangles. They were shown to contain PABPN1, along with molecular chaperones (HSP40, HSP70) and components of the proteasome-ubiquitin pathway (ubiquitin and 20S proteasomal subunit) (Calado *et al.*, 2000c ; Bao *et al.*, 2004). *In situ* hybridization with a poly(T) probe further revealed that INIs contained large amounts of poly(A)-RNA (Calado *et al.*, 2000c).

PABPN1 plays a major role in the polyadenylation of all mRNAs. PABPN1, in conjunction with CPSF, stimulates poly(A) polymerase (PAP) to promote the elongation of the poly(A) tail (Kerwitz *et al.*, 2003 ; Kuhn *et al.*, 2004). In addition, PABPN1 has been shown to bind nascent mRNA transcripts, to act as a regulator of the poly(A) tail length (Wahle, 1991 ; Bienroth *et al.*, 1993 ; Wahle, 1995) and to shuttle between the nucleus and the cytoplasm bound to the poly(A) tail of mRNAs (Calado *et al.*, 2000b). PABPN1 has in its C-terminal region an RNA binding motif (RNP-type) (Kuhn *et al.*, 2003), a nuclear localization signal (NLS) (Calado *et al.*, 2000a) and two oligomerization domains (Fan *et al.*, 2001). A few PABPN1 interacting proteins have been identified: HNRPA/B, HNRPA1 (Fan *et al.*, 2003a), HNRPC (Calapez *et al.*, 2002), HSP40 (DNAJ) and BRG1 (Kim *et al.*, 2001). PABPN1 when overexpressed by transfection, has been shown to interact with SKIP and to stimulate muscle-specific gene expression by upregulating both myogenin and MyoD levels and stimulating E-box mediated transcription (Kim *et al.*, 2001). Of all these

proteins, only HNRPA1 and HSP40 have been studied in OPMD muscle, and shown to be localized in the INIs (Fan *et al.*, 2003a ; Bao *et al.*, 2004).

While much is known about PABPN1's C-terminal region, the role of the N-terminal polyalanine domain remains elusive. OPMD is a member of a growing number of polyalanine diseases (Brais, 2003). To date eight other disease genes have been found to code for expanded polyalanine domains in their proteins: HOXD13 (Muragaki *et al.*, 1996), RUNX2 (Mundlos *et al.*, 1997), ZIC2 (Brown *et al.*, 1998), HOXA13 (Goodman *et al.*, 2000), FOXL2 (Crisponi, 2001), PHOX2B (CCHS) (Amiel *et al.*, 2003 ; Sasaki *et al.*, 2003), ARX (Bienvenu *et al.*, 2002) and SOX3 (Laumonier *et al.*, 2002). All are nuclear proteins and, except for PABPN1, they are all transcription factors (Lavoie *et al.*, 2003 ; Brown *et al.*, 2004). However, among polyalanine diseases, INIs have only been described in OPMD. PABPN1 is known to be aggregate prone (Kuhn *et al.*, 2003 ; Scheuermann *et al.*, 2003). The C-terminal domain of PABPN1 has been shown to be essential for its nuclear accumulation (Fan *et al.*, 2001 ; Kuhn *et al.*, 2003 ; Kuhn *et al.*, 2004). The biophysical properties of polyalanine were suggested to play an important role in the accumulation of PABPN1 in OPMD muscle nuclei (Brais, 2003 ; Kuhn *et al.*, 2004). Different lines of evidence suggest that polyalanine oligomers form resistant macromolecules *in vivo* and *in vitro* (Scheuermann *et al.*, 2003). Polyalanine oligomers containing more than 8 alanines in a row form fibrils spontaneously (Blondelle *et al.*, 1997). These oligomers form stable  $\beta$ -sheet structure *in vitro* that are very resistant to a wide range of proteases, denaturants, pH and temperatures (Forood *et al.*, 1995).

Several groups have produced cell models for OPMD by overexpressing mutant PABPN1 using transfection methods in Hela and Cos7 cells (Shanmugam *et al.*, 2000 ; Fan *et al.*, 2001 ; Kim *et al.*, 2001 ; Bao *et al.*, 2002 ; Ravikumar *et al.*, 2002 ; Abu-Baker *et al.*, 2003 ; Bao *et al.*, 2004). All have shown inclusion formation and some have demonstrated an association between aggregate formation and cell death (Fan *et al.*, 2001 ; Bao *et al.*, 2002 ; Abu-Baker *et al.*, 2003). More recently, the first transgenic mouse model of OPMD was obtained by expressing mutant (13 Ala) human *PABPN1* under the control of a strong ubiquitous (CAG) promoter (Hino *et al.*, 2004). In these mice, muscle disease is progressive and associated with INIs formation. Despite the known function of PABPN1 and the easy *in vitro* production of INIs, the pathophysiology of OPMD is still poorly

understood. It is possible that the misfolding of mutant PABPN1 is an important factor as judged by the presence of the molecular chaperones HSP40 and HSP70 in the INIs. This is supported by the protective effect of either the overexpression of these chaperones (Bao *et al.*, 2002 ; Abu-Baker *et al.*, 2003 ; Bao *et al.*, 2004), as well as treatment with Congo red and doxycycline, both known to interfere with  $\beta$ -sheet formation (Bao *et al.*, 2004). Many INI-dependent and independent pathological mechanisms have been proposed to be involved in OPMD (Brais, 2003 ; Fan *et al.*, 2003b ; Kuhn *et al.*, 2004) including autophagy (Ravikumar *et al.*, 2002) and mRNA trapping by the INIs (Calado *et al.*, 2000a). However, as in the field of polyglutamine disease (Michalik *et al.*, 2003), the exact role of the INIs in the pathophysiology of OPMD is still debated (Brais, 2003 ; Kuhn *et al.*, 2004).

The knowledge that the INIs contain poly(A)-mRNAs, that PABPN1 is an important mRNA processing factor and that its overexpression influenced the expression of certain transcription factors led us to hypothesize that the formation of INIs may influence the expression level of genes that could play a role in OPMD. In order to identify genes and possibly pathways that are relevant to inclusion formation and OPMD pathogenesis, we used an adenoviral *PABPN1* expression model, which reproducibly led to INIs formation within 48 h in the majority of cells in culture. We used Affymetrix human HGU133A gene chips to detect changes in the level of gene expression induced by PABPN1 expression. In this paper we describe the significant effect that PABPN1 expression accompanied by INIs formation have on the expression profile of infected cells. Furthermore, by studying proteins coded by upregulated genes, we were able to identify new proteins that colocalize with PABPN1 in OPMD nuclear inclusions.

## Materials and methods

### *Cell lines and Cell Culture*

Human A549tTA cells were cultured as previously described (Massie *et al.*, 1998a ; Massie *et al.*, 1998b). Proliferating A549tTA cells were maintained in DMEM (Wisent, St-Bruno, Qc) supplemented with 5% of TSA FBS (Tet free system approved fetal calf serum; Clontech, Palo Alto, CA) and 30  $\mu\text{g/ml}$  phleomycin (Sigma, St-Louis, MI) until one passage before experiments. BMAde1 78-42, BMAde1 220-8 (Massie, U.S. patent 5,891,6690) and 293A cells were maintained in DMEM containing 10 % FBS (Wisent) and 239ACymR cells were maintained in DMEM containing 5% FBS supplemented with Geneticin G418 at 500  $\mu\text{g/ml}$  (Massie *et al.*, 1998b).

### *Plasmids and viruses*

The PABPN1 bovine cDNA (provided by E. Whale) cloned in the expression vector pGM10-pabp2 was modified by PCR directed mutagenesis (Nemeth *et al.*, 1995). The following two primers were used to add 3 alanine codons to the normal PABPN1 bovine cDNA: 5'-CAG GAT CCC ATA TGG CAG CAG CAG CGG CGG CGG CGG CGG CGG CAG CAG CA-3' and 5'-CGA GCC AGG CCC AGG GCC CGG AGC TCC CG-3'. The wt PABPN1-10Ala and mutated PABPN1-13Ala PCR products were cut with NdeI and SacI and cloned back into the pGM10-pabp2 plasmid downstream of a sequence encoding a 6XHis-tag. The His-tagged cDNAs were digested by NcoI and BamHI and cloned in the PmeI site of the adenoviral shuttle vector pAd5TR5-K7-GFP (Massie *et al.*, 1998a ; Massie *et al.*, 1998b). To generate recombinant viruses by homologous recombination, the FseI digested shuttle vector was co-transfected with ClaI digested viral DNA in 293A cells. The recombinant clones were plaque purified in BMAde1 78-42 cells. The human PABPN1wt (hPABPN1wt) cDNA was excised from pBSK by digestion using BstXI and BmrI. After blunting, it was inserted into the blunted BglIII cloning site of pAdTR5CuO vector. The mutated hPABPN1 bearing a stretch of 13 alanines was generated by a PCR reaction on pBSK-hPABPN1wt using the primers 5' G AAG ATC TTC GCG

GCG ATG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCA GCA GCA GCG GG 3' and 5' TCC TCT TGG CTG CCG GGG GCT CCC GAA CCA GGC CCA GGG 3'. The PCR product was digested by BglII and SacI to generate a 272 bp fragment encoding the beginning of the hPABPN1 cDNA. The second fragment of hPABPN1 cDNA was excised from pBSK-hPABPN1wt by SacI and NotI. The 780 bp band was purified from agarose gel in the absence of ethidium bromide. These two fragments of the hPABPN1 cDNA were ligated with the pAdTR5CuO vector predigested by BglII and NotI. Recombination with the viral vector pAdEasy (Qbiogene Inc., Carlsbad, CA) was done and screened in bacteria following the manufacturer instructions. PacI digested viral DNA was transfected in 293ACymR cells. These cells express a 28 kDa repressor molecule (CymR) that binds the Cumate Operator (CuO) in the absence of Cumate. All viruses were amplified in BMAE1 220-8 cells to minimize the occurrence of Replication Competent Adenoviruses (RCA). Titers were determined on 293A cells using a standard plaque assay (Massie *et al.*, 1998a ; Massie *et al.*, 1998b). The AdTR5-GFP adenovirus was used as infected control (Massie *et al.*, 1998b).

### *Infections*

A549tTA cells were plated at a density of 9 000 cells/cm<sup>2</sup> in 6-well culture dishes and serum starved 6 h later (0,5% FBS in DMEM medium) for 6 h. Cells were either mock-infected or infected using conditions, including minimal volume, to maximize viral adsorption at multiplicity of infection (MOI) of 5, 25 or 50 plaque forming unit (pfu)/cell for 18 h (Massie *et al.*, 1998a ; Massie *et al.*, 1998b). Then, fresh medium was added to each well. Infections were done in duplicates. For the microarray experiments, A549tTA cells were plated at 7 x 10<sup>5</sup> cells/dish in 100 mm Petri dishes one-day prior experiment. The cells were serum starved at the moment of infection with 5, 25 or 50 pfu/cell.

### *RNA extraction and Northern Blot*

Cells were harvested 48 h post infection, trypsinized and washed in PBS. Ninety percent of the suspension volume was used for RNA extraction and 10 % of cells were kept

for protein extraction. Total RNA was extracted using Trizol reagent (Life Technologies, Carlsbad, Ca) according to the manufacturer's protocol. RNA pellets were resuspended in DEPC treated HPLC grade water to a final concentration of 2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  or higher. Total RNA was quantified using a Beckman spectrophotometer and a A260/A280 ratio of 1.6 to 1.9 was used as an indicator of purity. Samples were separated on formaldehyde containing gels, transferred to a nitrocellulose membrane and hybridized overnight at 68°C with a bovine PABPN1 cDNA probe labeled with  $^{32}\text{P}$  (Nemeth *et al.*, 1995) using the Ready-To-Go DNA labeling Beads (dCTP) kit (Amersham Pharmacia Biotech, UK). A solution containing heparin and dextran sulfate was used as a prehybridization and hybridization buffer. Autoradiography was performed using Kodak X-OMAT LS films. Densitometry was performed using an AlphaImager (Alpha Innotech., San Leandro, Ca).

#### *Western Blot*

Cells kept for protein extraction were lysed in extraction buffer (62.5 mM Tris-HCl; 2% SDS; 6M urea) and sonicated to shear DNA. Protein concentration was measured using the BioRad DC colorimetric assay with BSA as standard. Samples were separated on a 10% polyacrylamide gel and transferred overnight on nitrocellulose membrane at 80 mA. A rabbit polyclonal anti-PABPN1 antibody (provided by E. Whale) (Krause *et al.*, 1994) (1/1000) and a mouse monoclonal anti-4XHis-Tag (Qiagen, Mississauga, ON) antibody (1/3000) were used to detect PABPN1 and the 6XHis-Tag, respectively. HRP-conjugated goat anti-rabbit or anti-mouse (Amersham Pharmacia Biotech, UK) antibodies (1/50000) were used as secondary antibodies and the bound peroxidase was detected using the SuperSignal detection kit (Pierce, Rockford, IL). Densitometry was performed as described above. For loading control, membranes were stripped and then re-blotted with a mouse monoclonal anti- $\beta$  Actin antibody (Abcam, Cambridge, UK) (1/5000) and revealed with HRP-conjugated Goat anti-mouse antibody (1/5000) and the bound peroxidase was detected using the ECL detection kit (Amersham Pharmacia Biotech).

#### *RNA preparation and microchip hybridization*

Hybridization to Affymetrix arrays and further quality control tests were carried out at the McGill University and Genome Québec Innovation Centre. Integrity of RNA samples was assessed by running aliquots on a RNA 6000 Nano Lab:chip (Agilent Technologies) and using the 2100 bioanalyser (Agilent Technologies). First strand cDNA synthesis was obtained from 10 µg of total RNA after reverse transcription with the Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen Life Technologies). Double stranded cDNA was synthesized and purified by phenol chloroform extraction and redissolved in 20 µl nuclease-free water. An in vitro transcription reaction step was used to generate the biotinylated cRNA. The cRNA was purified using the RNeasy total RNA clean up protocol (Qiagen) and quantified by spectrophotometry. 15 µg of fragmented cRNA were used in a 300 µl hybridization mixture including spiked IVT controls and hybridized onto Affymetrix HG-U133A chips (Affymetrix, Santa Clara, CA) for 16-20 h at 45°C. Post-hybridization washes, double-stain and scanning protocols used an Affymetrix GeneChip Fluidics Station 400 (Affymetrix). Specifically bound probe was detected with the Agilent GeneArray scanner 2500 (Affymetrix). The scanned images were analyzed using the Microarray Analysis Suite version 5.0 (Affymetrix). Statistical analyses were done with Kensington Discovery Edition version 1.8 (Inforsense, MA).

#### *Data normalization and Gene Ontology Annotations*

Microarray data was normalized by scaling all samples to 1000 units to allow direct comparison between each chip. Absent calls were removed to avoid comparing expression levels for genes that were labeled absent in both test and reference conditions. A fold change of 2.5 or more and an intensity difference over/equal to 200 units were used as cut-offs for selecting differentially expressed genes in each experiment. Only those probe sets, which significantly changed in all replicate experiments were selected for this study. The gene ontology terms (GO) (Ashburner *et al.*, 2000) for differentially expressed genes were obtained using the Gene Ontology Mining Tool from the NETAFFX website ([www.affymetrix.com](http://www.affymetrix.com)) (Liu *et al.*, 2003), public databases such as NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) and ENSEMBL ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)), the Onto-Express program (<http://vortex.cs.wayne.edu/Projects.html>) (Khatri *et al.*, 2002 ; Draghici *et al.*, 2003) and

FATIGO (<http://FATIGO.bioinfo.cnio.es/>) at the GEPAS website (Herrero *et al.*, 2003 ; Al-Shahrour *et al.*, 2004). We used FATIGO and Onto-Express version 2 to determine the statistical significance of the observed differences between GO terms from upregulated and downregulated genes.

### *Immunofluorescence microscopy*

Serum starved A549tTA cells were plated at a density of 20 000 cells/well on cover slides in 24 well-plates. Cells were infected at a multiplicity of infection (MOI) of 5 or 50 plaque forming units per cell (pfu/cell). The cells were fixed 48 h post-infection in PBS containing 4% paraformaldehyde (PFA) for 10 min at room temperature (RT) and kept in PBS at 4°C until used. Cells were permeabilized in cold methanol 10 min at RT, and rinsed 3 x 5 min with PBS, then blocked in PBS-BSA 3% 30 min at RT. The cells were incubated 45 min with the primary antibody diluted in PBS-Tween 0,05% (PBS-T) + BSA 3%: monoclonal anti-His-Tag (Qiagen), rabbit polyclonal anti-PABPN1 (Krause *et al.*, 1994) (1/100), mouse monoclonal anti-HSP40 (HDJ2/DNAJ; Neomarkers, Fremont, CA; 1/200), mouse monoclonal anti-HSP70 (Hsp72; Stressgen, San Diego, CA; 1/100), mouse monoclonal anti-CUGBP1 (SantaCruz, Santa Cruz, CA; 1/50), mouse monoclonal anti-SFRS3 (Srp20; Zymed, San Francisco, CA; 1/10), goat polyclonal anti-HMG2, anti-FKBP1A, anti-HNRPA1, anti-PRC1, anti-SGCB and anti-TNFSF10D (SantaCruz; 1/10) antibodies, rabbit polyclonal anti-EIF5 (SantaCruz; 1/100), mouse monoclonal anti-S100P (BD Biosciences Pharmingen, San Jose, CA ; 1/10) and a mouse monoclonal anti-SC35 (provided by Vincent M.; 1/100) antibody. The cells were washed in PBS-T 3 x 5 min and then incubated 30 min with the appropriate secondary antibody diluted in PBS-T: donkey polyclonal anti-rabbit FITC (Jackson immunoresearch; 1/200), goat polyclonal anti-rabbit AMCA (Jackson immunoresearch ; 1/200), goat polyclonal anti-mouse Cy3 (Jackson immunoresearch; 1/200), donkey polyclonal anti-goat Cy3 (Jackson immunoresearch; 1/200) antibodies. DNA was stained with 5µg/ml of Hoechst 33342 (Molecular Probes, Eugene, OR) in PBS-T. After another 3 X 5 min wash, the cover slides were mounted on slides using the anti-fading Vectashield mounting media (Vector Labs, Burlingame, CA).

For double staining, both primary antibodies, and after both secondary antibodies, were mixed in the same solution.

#### *Immunofluorescence on OPMD tissues*

Frozen muscle sections from a muscle biopsy of the quadriceps of an homozygote OPMD patient (a 36 years old female carrying two (GCG)13 PABPN1 mutations) were analyzed (Blumen *et al.*, 1999). The patient signed an informed consent. Sections of 5  $\mu$ m were fixed in PFA 2% for 10 min at RT and incubated 30 min in citrate buffer at 37°C. The sections were then rinsed in PBS + NP40 0,5% (PBS-N) and incubated in blocking solution (PBS-N + BSA 3% + horse serum 2% +/- goat serum 2%) 15 min at RT. Sections were incubated 2 h with primary antibodies diluted in blocking solution: anti-PABPN1 (1/200), anti-CUGBP1 (1/1500), anti-SFRS3 (1/50) and anti-FKBP1A (1/50) antibodies (see previous section for suppliers). Sections were rinsed twice in PBS-N and incubated 30 min with secondary antibodies diluted in blocking solution: anti-rabbit FITC (1/200) and anti-mouse Cy3 (1/200) antibodies. DNA was stained with 5 $\mu$ g/ml of Hoechst 33258 in PBS-N. Slides were mounted with cover slides Immu-mount (Thermo Sandon, Pittsburg, PA). For the double staining, both primary antibodies, and after both secondary antibodies, were mixed in the same solution.

#### *Image capture and confocal microscopy*

Standard microscopy was performed using a Nikon 1800T microscope with a Nikon digital camera. Pictures were captured via the Metamorph software, (Universal Imaging Corp., Downington, Pa). For double labeling experiments, images were sequentially recorded in different channels transferred to Adobe Photoshop software (Adobe system Inc. San José, Ca) for presentation. For the double staining of Hsp40 and Hsp70 with PABPN1, anti-PABPN1 antibody was revealed using the AMCA conjugated anti-rabbit antibody and the signal was digitally converted to green for impression. Confocal microscopy was performed with a Zeiss Axiovert 100M laser scanning microscope LSM 510 (software version 3.2) equipped with an argon ion laser (488 nm) for FITC fluorescence and an

helium neon laser (543 nm) for Texas Red and To-Pro fluorescence (Carl Zeiss, Jena, Germany). For double labeling experiments, images from the same focal plane were sequentially recorded in different channels and superimposed.

### *Electron microscopy*

For electron microscopy, PBS-washed cells were fixed together in 2.5% glutaraldehyde and post-fixed in osmium tetroxide. They were embedded in epoxy resin (EPON) and prepared for EM according to standard procedures (Tomé *et al.*, 1980). Ultra-thin sections were examined with a Jeol 1010 electron microscope (Jeol USA, Peabody, MA) operated at 80 kV.

## Results

### *Adenoviral PABPN1 expression leads to filamentous intranuclear inclusions formation*

In order to express *PABPN1*, we generated a first set of recombinant non-replicative adenoviruses. We used these inducible adenoviruses expressing either wild type His-tagged 10 alanines bovine *PABPN1* (His-b*PABPN1*wt) or mutated His-tagged 13 alanines bovine *PABPN1* (His-b*PABPN1*mut) along with constitutive expression of the green fluorescent protein (GFP) to facilitate production (Fig. 11A) (Massie *et al.*, 1998a). We used human A549tTA cells, which stably express the tetracycline transactivator (tTA). *PABPN1* expression following infection was confirmed by Northern and Western blots (Fig. 12A and B). The *PABPN1* mRNAs are detected as a more abundant 3.5 kb and a less abundant 1.5 kb transcript in A549tTA cells (Fig. 11B and 12A). Infection by adenoviruses expressing either His-b*PABPN1*wt or His-b*PABPN1*mut at a MOI of 50 pfu/cell led to a marked increase in the expression of a 1.5 kb transcript corresponding to the adenoviral expressed *PABPN1* (Fig. 12A). Unexpectedly, the 3.5 kb transcript showed a 2.1 fold increase as determined by densitometry. Since the *PABPN1* adenoviruses express the fully spliced variant, the observed change is most likely due to the upregulation of the expression of the endogenous gene although an increase in the half-life of those transcripts or an inhibition of splicing cannot be excluded. This result was further confirmed by microarray data with the 213046\_at probeset, which detects intron B (Fig. 11B), showing a mean fold change of 2.54. *PABPN1* expression was also assessed by Western blot using anti-*PABPN1* and anti-His antibodies (Krause *et al.*, 1994). *PABPN1* was detected as a 50 kDa protein in agreement with published observations (Fig. 12B) (Nemeth *et al.*, 1995) and showed an increase of expression in cells infected with adenovirus expressing either His-b*PABPN1*wt or His-b*PABPN1*mut. Anti-His-tag antibody specific for the exogenous protein detected the more abundant 50 kDa protein only in cells infected with adenoviruses expressing *PABPN1*.

Expression of either His-b*PABPN1*mut or His-b*PABPN1*wt led to the formation of intranuclear inclusions in 60 to 80% of infected cells 48 h after infection at MOI of 50 pfu/cell (Fig. 13). As previously described in other cell models of *PABPN1*

overexpression, the INIs were found to contain PABPN1, as revealed with an anti His-tag antibody (Figure 13A and 3D) and to exclude DNA, as detected by Hoechst staining (Fig. 13B and 3E) (Calado *et al.*, 2000c). The INIs were also found to contain the molecular chaperones HSP40 (DNAJ) and HSP70 (HSP72) (Fig. 13G-L) (Calado *et al.*, 2000c ; Bao *et al.*, 2004). The INIs were also found not to colocalize with the nuclear speckles as shown by the SFRS2 (SC35) staining (Fig 13 M-O). To confirm that the formation of INIs was not due to the presence of the N-terminal His-tag in both constructs, we generated a second set of viruses expressing untagged human *PABPN1* with 10 or 13 alanines (Fig 11A). As for bPABPN1, the overexpression of hPABPN1 led to the formation of INIs that were rich in PABPN1 (Fig 13) and excluded DNA. The surprising result that wild-type PABPN1 overexpression induces INIs formation was confirmed by transfection in HeLa and COS-7 cells using a GFP-b*PABPN1*wt construct (data not shown). The formation of INIs in the three cell lines with the wild-type protein suggests that overexpression by itself is sufficient to produce INIs.

Finally, we performed an EM study on the INIs produced by expressing b*PABPN1*mut. The infected cells contained inclusions appearing as large pale zone within the nucleus (Fig. 14A). These inclusions are filamentous and globular (Fig. 14B). Although they do not show the organized tangles and palisades observed in OPMD muscle, their appearance is reminiscent of type B inclusions observed in an innervated model of OPMD (F.M.S Tomé, personal communication) (Tomé *et al.*, 1989). Less organized filamentous inclusions were also observed in a transgenic mice model of OPMD (Hino *et al.*, 2004) and in neurons from normal rat hypothalamus as dynamic aggregates (Berciano *et al.*, 2004). In summary, our adenoviral model shares the histological features of published *PABPN1* overexpression cell models with the added property of being a more efficient and controlled method to express *PABPN1*.

#### *PABPN1* overexpression induces major modifications of expression profile

Our objective was to analyze the transcriptional changes following *PABPN1* expression at a time when a maximal number of cells contained INIs. As our adenoviruses expressing His-b*PABPN1* also express GFP, which could have an impact on the expression

profile of cells, we chose to compare first the expression profiles of mock-infected cells with cells infected with adenoviruses expressing GFP only using the Affymetrix human HG-U133A GeneChips. Very few differences were observed suggesting that neither the adenoviral infection by itself nor the expression of GFP led to important expression changes (Fig. 15A). To further control for alterations that might result from GFP expression, we compared the expression profile of cells expressing His-b*PABPN1*mut to GFP infected controls (both at 50 pfu/cell) rather than to mock-infected controls. We obtained comparable results with His-b*PABPN1*wt and His-b*PABPN1*mut constructs. Both profiles were found to be similar over two replicate experiments (data not shown), which mirrors our observations that both viruses led to similar inclusions formation. In light of these results, we concentrated our efforts on the effects produced by the His-b*PABPN1*mut expression. The analysis of three independent expression profiles identified 219 probesets whose levels of expression were consistently modified by a factor of at least 2.5 across all three experiments (Fig. 15B and C). This group of 219 probesets corresponds to 202 distinct genes. To further validate that the altered expression profiles of these genes was due to His-b*PABPN1*mut expression, we studied the expression profiles of cells infected at 5 and 25 pfu/cell and compared them to the ones obtained in cells infected with an MOI of 50 pfu/cell. Overall, the set of 202 genes displayed dose-dependent changes with the levels of *PABPN1*mut expression (data not shown). This demonstrates that *PABPN1* overexpression, which is associated with INIs formation, has a wide range effect on the expression of a large number of genes.

*PABPN1 overexpression leads to the upregulation of genes encoding predominantly nuclear and RNA-binding proteins*

Of the 202 distinct genes consistently modified in their expression level, an almost identical number of genes were upregulated (103/202, 51%) than downregulated (99/202, 49%). Among them, 152 encode well-characterized proteins (152/202, 74.2%), whereas 50 correspond to poorly characterized genes (50/202, 24.7%). Table 3 classifies these 202 genes based on their main biological function. Using the FATIGO software (Al-Shahrour *et al.*, 2004), we compared the ontology annotations of upregulated and downregulated genes

with regards to biological process, molecular function and cellular component to determine if any single category was enriched when compared to the entire array (Fig. 16). A significantly higher number of upregulated genes encoded proteins involved in "nucleic acid metabolism" (21/48, 43.7%) than downregulated genes (9/54, 16.7%,  $p < 0.05$ ) (Fig. 16A). In contrast, upregulated genes annotated as "cell communication" and "response to external stimulus" were under-represented when compared to the downregulated gene set ( $p < 0.01$ ) or the whole array ( $p < 0.05$ ) (Fig. 16A).

A survey of the literature and multiple public databases allowed us to find information on cellular localization for 59.2% (61/103) of the upregulated gene products. Of these 61 genes, 36 encode nuclear proteins (36/61, 59.2%). In contrast, of the 62 downregulated annotated genes (62/99, 62.6%) only 16 encode nuclear proteins (16/62, 25.8%, Table 3). FATIGO annotated 46 of the upregulated genes with GO cellular component, 27 of them being nuclear (58.7%, Fig. 16B). In contrast, only 10/43 (23.3%) downregulated genes were classified as "nuclear". Indeed significant differences were observed in the number of genes encoding nuclear proteins between upregulated and downregulated genes ( $p < 0.05$ ) and between upregulated genes and the chip as a whole ( $p = 0.006$ ).

Molecular function annotations were retrieved for 39 of the upregulated genes (Fig. 16C). Of these, 13 were found to be "RNA binding" proteins (13/39, 33.3%). This is in sharp contrast ( $p < 0.05$ ) with downregulated genes for which only three RNA binding proteins were found out of 48 annotated genes (3/48, 6.2%, Fig. 16C). By comparison, FATIGO annotated 5.1% (314/6109) of the genes on the whole array as RNA binding. We further reviewed the literature on the 202 genes in order to identify other RNA binding proteins whose expression was modulated by PABPN1 expression. We found a total of 19 RNA binding proteins, excluding PABPN1, which were modulated; only three of these were downregulated (Table 3). Like *PABPN1*, many of these genes encode proteins that play a role in mRNA processing and export such as: FUSIP2, Pinnin, SFRS3, RAE1, HNRPA1, HNRPA3, NSAP1, RBM3, and CUGBP1 (Table 3). Three others encode ribosomal components, namely RPL15, RPS21 and RPL5, and another one, RNU17D, is a member of the small nucleolar RNAs family that play a role in ribosomal RNA modification (Pelczar *et al.*, 1998). These results are the first to demonstrate an association

between *PABPN1* expression and alterations in expression of many genes encoding nuclear proteins involved in mRNA processing and transport. In addition, expression of a small group of genes encoding cytoplasmic proteins which bind mRNA, is modified in response to *PABPN1* expression: EIF5 and EIF4EL3, two factors involved in the initiation of translation, and PAIP1, the binding partner of the polyadenylation binding protein cytoplasmic 1 (PABPC1) (Roy *et al.*, 2002) that replaces *PABPN1* on the poly(A) tail (Table 3). Another group of genes encoding nuclear proteins with transcription factor activity was upregulated in our model: EED, BTF, NR2C1, ZNF228, MYBL1 and CEBPG (Table 3). On the other hand, only four transcription factors were downregulated: STAT1, SNAIL1, FIP2 and PHF6. Together these results demonstrate that the expression of a large number of genes encoding nuclear proteins with RNA or DNA binding activities are mostly upregulated by *PABPN1* overexpression. Whether it is *PABPN1* expression alone or the associated formation of INIs that is responsible for these expression changes cannot be distinguished at this stage.

*Many upregulated genes encode proteins that are sequestered in intranuclear inclusions*

Two previously described components of OPMD INIs, HNRPA1 and HSPA1B (Fan *et al.*, 2003a ; Bao *et al.*, 2004), had their gene upregulated in response to *PABPN1* expression in our model. This raised the possibility that other proteins encoded by upregulated genes, which are mostly nuclear proteins, could be sequestered in the INIs. To test this hypothesis, we determined whether some of the proteins encoded by upregulated genes colocalized with *PABPN1* in the INIs. Among 11 commercial antibodies available for proteins encoded by upregulated genes, eight were against nuclear proteins (CUGBP1, FKBP12, HMG2, HNRPA1, PRC1, S100P, SFRS3, HSP70/72), two against membrane proteins (SGCB and TNFSFRS10D) and one against the cytoplasmic protein EIF5. We first established the normal distribution of the proteins in non-infected cells (Fig. 17 and Table 4). To facilitate the interpretation of the immunofluorescence studies, we chose to perform the colocalization experiments in cells infected with an adenovirus expressing the non-tagged human *PABPN1* with 13 alanines (h*PABPN1*mut, Fig.11A). As mentioned above, cells infected with this adenovirus do not co-express the GFP and display INIs comparable

to those observed in *bPABPN1* expressing cells. All of the 8 nuclear proteins tested colocalized with PABPN1 in the inclusions: SFRS3, CUGBP1, HMG2, PRC1, FKBP1A, HSP70(HSP72) and to a lesser extent S100P and HNRPA1 (Fig. 17 and Table 4). The two membranes proteins SGCB and TNFSFRS10D and the cytoplasmic protein EIF5 did not demonstrate any colocalization with PABPN1 (Table 4). None of these three proteins showed a different distribution between *PABPN1* infected or control cells. Finally, two other nuclear proteins for which the genes were not influenced by *PABPN1* expression, namely SFRS2 (SC35, Fig 3 M-O) and CHC1, were tested and did not show a different distribution in *hPABPN1*mut infected cells as compared to infected controls (data not shown). These results support the hypothesis that the PABPN1-containing INIs sequester the nuclear proteins which are coded by upregulated genes.

To assess the significance of our colocalization results for the study of OPMD, we determined whether the proteins that were recruited to INIs in our adenoviral model, were also present in OPMD muscle INIs. We studied a muscle biopsy from the quadriceps of a homozygote (GCG)<sub>9</sub> OPMD case, because these patients were shown to have a more severe phenotype that correlated with twice as many nuclei containing INIs per slide (9.4% vs 4.9% in heterozygote OPMD muscle) (Blumen *et al.*, 1999). We studied the more interesting proteins that were shown to be present in the INIs in the adenoviral model: CUGBP1, SFRS3, FKBP1A and HMG2. In their normal distribution CUGBP1, SFRS3 and HMG2 are nuclear and FKBP1A staining is diffuse in fiber (data not shown). Of these, three colocalized with PABPN1 in OPMD muscle INIs, namely CUGBP1, SFRS3 and FKBP1A (Fig. 18). These results confirm that at least some of the proteins encoded by upregulated genes in our cell model indeed accumulate with PABPN1 in OPMD muscle nuclear inclusions. This raises the possibility that sequestering of PABPN1, mRNA and a large number of nuclear proteins may play a role in the pathophysiology of OPMD.

## Discussion

In this article, we demonstrated that overexpression of PABPN1 accompanied by the production of intranuclear inclusions has a broad impact on the mRNA expression profile in human cells. Using adenoviruses, we were able to obtain a more homogenous expression of *PABPN1* in a cell population than by transfection, making our cell model more amenable to microarray analysis. We isolated a set of 202 genes whose expression was significantly and reproducibly modified by a factor equal to or greater than 2.5 in response to PABPN1 expression and inclusions formation. We found that approximately 60% of the upregulated genes encode nuclear proteins (Table 3), and showed by immunofluorescence microscopy that several of these nuclear proteins colocalized with the INIs of our adenoviral model. The power of this approach to uncover proteins present in OPMD INIs was confirmed by the colocalization in pathological muscle of three out of the four proteins tested. Our results demonstrate that nuclear inclusions in OPMD are more heterogeneous than previously thought and that they could play an active role in the disease by sequestering a large number of nuclear proteins.

Several observations support the hypothesis that INIs display a relative specificity for the sequestration of some nuclear proteins. We observed that the majority of the upregulated genes encode nuclear proteins, many of which have RNA or DNA binding activities. In our model, upregulation correlated histologically with the presence of their respective proteins within the INIs. We determined this for all eight nuclear proteins either tested in our model or previously known to colocalize with PABPN1 within the OPMD inclusions (Fig. 17 and Table 4) and for six of the seven studied in OPMD muscle so far (Fig. 18 and Table 4). Not all nuclear proteins are sequestered in INIs. As we show SFRS2/SC35 and CHC1, whose gene expression was not changed, did not colocalize with PABPN1 in the INIs. Interestingly, many of the upregulated genes encode proteins involved in RNA processing, suggesting that some of the proteins involved in mRNA splicing (FUSIP1, CUGBP1), packaging and transport (RAE1), or both (SFRS3 and HNRPA1) may be sequestered into the INIs. Together these observations lead us to suggest that the mutated or abundant PABPN1 can alter complexes involved in transcription, mRNA processing, export or proofreading. This may be due to the binding of PABPN1 to

mRNA from transcription to nuclear export. Messenger RNA would act as an essential thread for all complexes that are sequestered in the INIs, possibly explaining the abundance of poly(A)-mRNA previously observed in OPMD INIs (Calado *et al.*, 2000c). The sequestration of both RNA and proteins within the inclusions could lead to a decrease in the availability of some nuclear proteins, leading to the compensatory upregulation of their genes, as observed for all eight genes tested. In agreement with this hypothesis, we also noted that *PABPN1* overexpression led to an upregulation of the endogenous *PABPN1* gene (Fig. 12A). We could further hypothesize that the sequestration of some transcription factors could be responsible for the decrease in the expression of some genes. This may partly explain the large number of genes that are downregulated in our model.

Though it is unlikely that PABPN1 is overexpressed in OPMD muscle, we provide evidence that PABPN1 expression is sufficient to generate INIs, independently of the length of its polyalanine domain. This is not unexpected since a recent study has shown that wild type PABPN1 can form dynamic inclusions *in vivo* (Berciano *et al.*, 2004). *In vitro* studies have also indicated that PABPN1 has a strong tendency to form aggregates even in the absence of its polyalanine domain (Kuhn *et al.*, 2003 ; Scheuermann *et al.*, 2003 ; Kuhn *et al.*, 2004). The effect of the OPMD polyalanine domain expansion mutation may increase this tendency. An addition of alanines at the N-terminus of the protein has been shown to increase its oligomerization into amyloid-like fibrils (Scheuermann *et al.*, 2003). As the expression profiles are similar between wild-type and mutated constructs, it is possible that the abundant PABPN1 reproduces a similar effect as the mutation by distorting large mRNA-protein complexes that become sequestered in INIs. However, the observation that genes encoding some of the sequestered nuclear proteins are upregulated in response to PABPN1 expression raises the possibility that INIs in the pathology may decrease the availability of certain nuclear proteins. How the formation of INIs and the possible sequestration of some nuclear proteins impact on cell death still needs to be investigated.

We and others have proposed different INI-dependant mechanisms which could cause OPMD (Brais, 2003 ; Fan *et al.*, 2003b ; Kuhn *et al.*, 2004). One could speculate that, with time, progressive filling of the nuclei by the INIs could prevent adequate nuclear functions. This is supported by displacement of the chromatin as seen by Hoescht staining.

Alternatively, the sequestration of key transcription or splicing factors within the INIs could alter the capacity of cells to adjust to certain mechanical or metabolic stresses requiring the rapid production of important transcripts. A possible role for INIs-mediated transcription factor sequestration was also suggested for polyglutamine diseases (McCampbell *et al.*, 2000 ; Shimohata *et al.*, 2000) and such a mechanism may underlie the upregulation of six genes coding for transcription factors in our model. It seems unlikely that the non-specific trapping of mRNA in the inclusions as proposed by Calado *et al.* (Calado *et al.*, 2000c) is a major contributor to cell dysfunction. In fact, more than 95% of genes did not see their expression levels influenced by a fold greater than 2.5 by *PABPN1* overexpression, despite the formation of large INIs in most cells. We would expect that a non-specific mRNA-trap would have an even larger influence on general expression. An indirect way by which INIs could contribute to the pathophysiology of OPMD is by trapping protein complexes that modulate important cellular functions other than mRNA processing and transcription. This could be the case for FKBP1A, which we found present in INIs *in vitro* and *in vivo*. The 12 kDa FK506-binding protein (FKBP1A) is a peptidyl-prolyl isomerase and as such may play a role in protein folding. In muscle, FKBP1A was shown to modulate excitation-contraction coupling by interacting with the ryanodine receptor, to block myoblast proliferation and induce their differentiation (Jayaraman *et al.*, 1993 ; Avila *et al.*, 2003). Interestingly, FKBP1A was also found to be upregulated in a polyglutamine cell model (Kita *et al.*, 2002). It is unclear why FKBP1A colocalizes with the INIs, although it might act as a chaperone in the INIs. Considering its function in muscle, it is possible that its sequestration in the inclusions could lead to important changes in the function of the calcium release channels of the sarcoplasmic reticulum in OPMD muscle and so could contribute to the dystrophic process.

The observation that CUGBP1 is upregulated in our cell model and present in OPMD INIs raises the possibility that there may be similarities in the molecular basis of two of the most common muscular dystrophies: OPMD and Myotonic Dystrophy type 1 (DM1, MIM: 160900). DM1 is a muscular dystrophy caused by the expansion of a non-coding (CTG) repeat in the 3' untranslated region of the serine-threonine kinase gene (DMPK)(Mahadevan *et al.*, 1992). CUGBP1 has been implicated in the pathology of DM1 where it reportedly binds to CUG repeats on mRNA transcripts from the mutated DMPK

gene (Timchenko *et al.*, 1996 ; Timchenko *et al.*, 2002). In addition to CUG repeats, CUGBP1 can also bind other repeats such as GCC repeats (Timchenko *et al.*, 1999 ; Welm *et al.*, 2000). The role of RNA in the pathogenesis of DM1 is increasingly recognized (Ranum *et al.*, 2004) and mutant DMPK transcripts are known to accumulate as ribonuclear foci in nuclei (Taneja *et al.*, 1995 ; Davies *et al.*, 1997) which exclude DNA, sequester transcription factors (Ebralidze *et al.*, 2004) and likely contain CUGBP1 (Timchenko *et al.*, 1996 ; Ebralidze *et al.*, 2004). The sequestration of CUGBP1 may prevent it from performing its normal role in splicing (Philips *et al.*, 1998). Inhibition of myogenesis is a feature of DM1 and overexpression of CUGBP1 led to an inhibition of myogenesis in mouse (Timchenko *et al.*, 2004a). More work will be required to establish if the RNA foci in DM1 share other features with OPMD INIs. However, these observations suggest that nuclear RNA and protein sequestration play a role in both dystrophies. The exact role of INIs in the pathophysiology of OPMD still needs to be determined, but this study suggests that they sequester a large number of nuclear proteins with RNA or DNA binding activities that could directly or indirectly compromise cellular function.

### **Acknowledgements**

We thank Fernando M.S. Tomé and Moïse Bendayan for their precious advises on electron microscopy and Christine Alexander, Anna Désy and Christian Charbonneau for their expert technical assistance. We thank Elmar Wahle for sharing his pGM10-pabp2 cDNA and the anti-bovinePABPN1 antibody. This work was supported by the Neuromuscular Research Partnership Program of the Canadian Institute of Health Research (CIHR) (MOP-49485 to BB and YL), the Muscular Dystrophy of Canada (MDC) and the Canadian Amyotrophic Lateral Sclerosis Association, the Association Française contre les Myopathies (AFM), the Muscular Dystrophy Association (MDA, USA) and by an operation grant to B.M. from the National Research Council of Canada (NRC). AFK is supported by a studentship from the AFM. GAR is supported by the Canadian Institutes of Health Research. BB is a chercheur-boursier of the Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ).

**Table 3: Gene expression changes in cells expressing His-bPABPN1mut 48 h post-infection**

Sequence	Gene	Name/Function	CC	FC
<b>Actin Binding/Actin Related</b>				
U29586	SGCB	Sarcoglycan, beta	m	3,8
NM_013262	MIR	myosin regulatory light chain interacting protein		3,8
AY026505	KNSL6	kinesin-like 6	n	3,16
NM_001613	ACTA2	actin, alpha 2, smooth muscle, aorta	a	-2,94
NM_003079	SMARCE1	BRG1-associated factor, 57-KD	n	-3,1
AB028945	SHANK2	cortactin SH3 domain-binding protein		-3,38
NM_003870	IQGAP1	IQ motif containing GTPase activating protein 1	a	-4,37
Z78330	ACTR3	ARP3 Actin-related protein 3 homolog		-5,28
AL157398	NEBL	nebulin	a	-4,23
<b>Apoptosis and Apoptosis Related</b>				
AF021233	TNFRSF10D	Decoy receptor 2	m	15,16
NM_016534	LOC51275	apoptosis-related protein PNAS-1		12,68
AL035669	DATF1	death associated transcription factor 1	n	5,48
AF229253	API5L1	API5-like 1		3,83
AK021780	PTDSR*	phosphatidylserine receptor	m	3,32
NM_018307	FLJ11040	hypothetical protein FLJ11040		-3,66
NM_004052	BNIP3	BCL2/adenovirus E1B 19kD-interacting protein 3	mi	-6,18
BG111635	ARTS-1	type 1 tumor necrosis factor receptor shedding aminopeptidase regulator		-8,1
K03199	TP53	tumor protein p53	n	-9,53
NM_003810	TNFSF10	tumor necrosis factor superfamily, member 10	m	-18,3
<b>Calcium Signalling</b>				
NM_005980	S100P	S100 calcium-binding protein P		11,5
BC005147	FKBP1A	FK506-binding protein 1A	n	3,61
N30649	LOC51149	truncated calcium binding protein	c	-14
<b>cAMP Signalling</b>				
BC003418	ARPP-19*	cyclic AMP phosphoprotein, 19 kD	c	4,02
M18468	PRKAR1A	protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type 1, alpha		3,76
<b>Cell Adhesion</b>				
W46291	ADAM12	a disintegrin and metalloproteinase domain 12		-15,1
NM_001627	ALCAM	activated leucocyte cell adhesion molecule		-4,17
AA129716	PVRL3	nectin 3		-3,87
NM_014705	DOCK4	Dock4	m	-3,18
<b>Cell Cycle/Mitosis</b>				
NM_003981	PRC1	protein regulator of cytokinesis 1	n	3,86
NM_014264	STK18	serine/threonine kinase 18		3,56
NM_021953	FOXM1	forkhead box M1	n	3,47
NM_006342	TACC3	transforming, acidic coiled-coil containing protein 3	c	3,4
NM_014321	ORC6L	origin recognition complex, subunit 6 -like	n	3,25
NM_001211	BUB1B	budding uninhibited by benzimidazoles 1, beta	n	3,21
NM_006461	DEEPEST	mitotic spindle coiled-coil related protein		3,04
AJ010395	DKC1	dyskeratosis congenita 1, dyskerin	n	2,97
NM_001237	CCNA2	cyclin A2	n	2,87
NM_004935	CDK5	cyclin-dependent kinase 5		-3,57
BF576710	PTP4A1*	protein tyrosine phosphatase type IVA, member 1	n	-3,76
<b>Chaperones</b>				
NM_005346	HSPA1B	heat shock 70kD protein 1B	n/c	2,94
NM_005125	CCS	copper chaperone for superoxide dismutase	c	-3,18
<b>DNA Repair</b>				
BC000903	HMG2	high-mobility group protein 2	n	4,47
NM_022346	HCAP-G	chromosome condensation protein G	n	3,91
<b>Endoplasmic Reticulum Function</b>				
BG107676	SERP1	stress-associated endoplasmic reticulum protein 1	m	-4,08
<b>Enzymatic Activity</b>				
AW614435	UROD	uroporphyrinogen decarboxylase		16,42
NM_024843	FLJ23462	duodenal cytochrome b	m	9,24
NM_030920	ANP32E	acidic nuclear phosphoprotein 32 family, member E	n/c	8,78
AK002091	MGEA5	meningioma expressed antigen 5	c	4,93
NM_000945	PPP3R1	protein phosphatase 3, regulatory subunit B, alpha isoform		4,5
NM_007045	FOP	FGFR1 oncogene partner		3,73
NM_002539	ODC1	ornithine decarboxylase 1		3,22
R60068	DDX3	DEAD/H box polypeptide 3		3,16
NM_016291	IP6K2	mammalian inositol hexakisphosphate kinase 2		3

Table 3 (Continued)

Sequence	Gene	Name/Function	CC	FC
NM_002064	GLRX	glutaredoxin		-2,61
NM_000860	HPGD	hydroxyprostaglandin dehydrogenase 15-		-3,25
NM_000602	SERPINE1	serine proteinase inhibitor, clade E, member 1		-3,39
AL049699	ME1	malic enzyme 1, NADP-dependent, cytosolic	c	-3,42
NM_003406	YWHAZ*	14-3-3-ZETA (YWHAZ)		-3,66
AL353950	PPP3CA	protein phosphatase 3, catalytic subunit, alpha isoform		-5,67
NM_012262	HS2ST1*	heparan sulfate 2-O-sulfotransferase		-5,79
AA129753	RABGGTB	Rab geranylgeranyltransferase, beta subunit		-5,91
NM_021105	PLSCR1	phospholipid scramblase 1	m	-6,24
AL525798	FACL3	fatty-acid-Coenzyme A ligase, long-chain 3		-6,42
M55575	BCKDHB	branched chain keto acid dehydrogenase E1, beta polypeptide	mi	-13,8
<b>Growth Factor/Regulation of Cell Growth</b>				
NM_005414	SKIL	SKI-like	n	8,72
BC005359	GMFB	glia maturation factor, beta		5,44
NM_019071	ING3	inhibitor of growth family, member 3		3,06
NM_016079	LOC51652	CGI-149 protein		-2,86
BF110421	EGFL5	EGF-like-domain, multiple 5		-3,08
M37435	CSF1	colony stimulating factor 1	m	-3,33
AF154054	CKTSF1B1	cysteine knot superfamily 1, BMP antagonist 1	e	-4,16
NM_002006	FGF2	fibroblast growth factor 2	c	-5,21
NM_025208	SCDGF-B	spinal cord-derived growth factor-B	m	-5,41
<b>Guanine Exchange Factors</b>				
NM_002074	GNB1*	guanine nucleotide binding protein, beta polypeptide 1		-5,78
<b>Histone</b>				
AF044286	H2AFY	H2A histone family, member Y	n	-9,2
<b>Interferon Induced Proteins</b>				
AA083483	FTH1	ferritin, heavy polypeptide 1		-3,66
NM_005531	IFI16*	interferon, gamma-inducible protein 16	n	-5,41
NM_006417	IFI44	interferon-induced protein 44	c	-7,58
NM_005101	ISG15	interferon-stimulated protein, 15 kDa	e	-11,1
AA083478	TRIM22	tripartite motif-containing 22		-11,4
BC001356	IFI35	interferon-induced protein 35	n	-13,3
NM_001548	IFIT1	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	c	-14
NM_002462	MX1	myxovirus resistance 1, homolog of murine	c	-14
NM_003641	IFITM1*	interferon induced transmembrane protein 1	m	-19,3
NM_016816	OAS1*	2',5'-oligoadenylate synthetase 1	c	-32,3
<b>Mitochondrial Function</b>				
AW337510	COX4I1	cytochrome c oxidase subunit IV isoform 1	mi	25,58
NM_005000	NDUFA5	NADH dehydrogenase 1 alpha subcomplex, 5	mi	-2,98
U94592	UCP2	uncoupling protein 2	mi	-12,7
<b>Nuclear Organelle</b>				
BG391060	COIL	coilin	n	3,2
NM_003113	SP100	nuclear antigen sp100	n	-5,82
<b>Other</b>				
NM_004622	TSN	translin	n	4,69
BE964655	HUMGT198A	GT198, complete ORF		3,64
BC001288	DAF	decay accelerating factor for complement	m	3,15
N74607	AQP3	aquaporin 3	m	2,97
NM_018362	LIN-7-C	LIN-7 protein 3		2,78
N21202	DAB2	disabled homolog 2		-2,85
NM_015681	B9	B9 protein		-3,18
NM_007071	HHLA3	HERV-H LTR-associating 3		-3,31
AF263541	DYRK4	dual-specificity tyrosine--phosphorylation regulated kinase 4		-3,42
BE879873	PGRMC2	progesterone receptor membrane component 2	m	-3,97
NM_005981	SAS	sarcoma amplified sequence	m	-4,15
BE560202	PHAPI	putative human HLA class II associated protein I	n	-4,44
NM_006270	RRAS	related RAS viral oncogene homolog		-4,66
M81635	EPB72	erythrocyte membrane protein band 7.2	m	-4,84
AA081084	TAZ	transcriptional co-activator with PDZ-binding motif	n	-5,79
BC002791	NPR2L	homologous to yeast nitrogen permease		-6,11
<b>Rho Signalling</b>				
NM_015313	ARHGEF12	Rho guanine exchange factor 12		-3,29
AK001327	TIP-1	Tax interaction protein 1	c	-3,76

Table 3 (Continued)

Sequence	Gene	Name/Function	CC	FC
<b>RNA Binding/Metabolism</b>				
BF675004	PABPN1	Poly-binding protein, nuclear 1	n	12,49
AW024383	RPS21	Ribosomal protein S21	c	10,53
AA582460	RPL5	Ribosomal protein L5	c	6,39
AJ006835	RNU17D	RNA, U17D small nucleolar		6,31
NM_006560	CUGBP1	CUG Triplet repeat binding 1	n	5,58
AL134489	RPP38	Ribonuclease P	n	4,94
AU130523	FUSIP2	FUS-interacting protein 2	n	4,12
Y09703	PNN	Pinin	n	3,89
BF437591	RBM3	RNA binding motif protein 3		3,48
NM_006372	NSAP1	NS1-associated protein 1	n	3,43
NM_003017	SFRS3	Splicing factor, arginine/serine-rich 3	n	3,15
BE867771	HNRPA3	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	n	3,14
NM_003610	RAE1	RAE1 homolog	n/c	2,73
X79536	HNRPA1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	n/c	2,73
BC000527	EWSR1	Ewing sarcoma breakpoint region 1	n	2,74
NM_014314	RIG-I	RNA helicase	n	-40,8
AF279903	RPL15	Ribosomal protein L15	c	-2,76
<b>Transcription and Transcription Factors</b>				
AF099032	EED	Embryonic ectoderm development	n	35,02
AF305239	HIPK3	Homeodomain-interacting protein kinase 3		4,87
AF249273	BTF*	BCL-2 associated transcription factor	n	4,64
M21985	NR2C1	Nuclear receptor subfamily 2, group C, member 1	n	4,58
AC084239	ZNF228	Zinc finger protein 228	n	3,7
AW592266	MYBL1	v-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog-like 1	n	3,04
NM_001806	CEBPG	CCAAT/enhancer binding protein , gamma	n	2,83
NM_005985	SNAIL	Snail 1 , zinc finger protein	n	-3
AA772747	POLR2L	Polymerase II polypeptide L	n	-4,54
AV757675	FIP2	Huntingtin interacting protein L	c	-5,78
AL035306	PHF6	PHD Finger Protein 6		-9,12
BC002704	STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1, 91kD	n	-16,6
<b>Translation</b>				
BF516289	EIF4EL3	Eukaryotic translation initiation factor 4E-like 3	c	4,26
NM_001969	EIF5*	Eukaryotic translation initiation factor 5	c	3,74
NM_006451	PAIP1*	Polyadenylate binding protein-interacting protein 1	c	-4,22
<b>Ubiquitin-Proteasome Pathway</b>				
AL109923	ITCH*	Itchy E3 ubiquitin protein ligase	n	5,63
NM_019116	UBPH	Similar to ubiquitin binding protein		3,42
NM_005789	PSME3	Proteasome activator subunit 3	c	-2,57
AA824386	USP9X	Ubiquitin specific protease 9, X chromosome		-3,13
<b>Vesicles/Vacuoles/Secretory Pathways</b>				
AV657604	BIG2	Brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein 2		22,06
NM_006555	YKT6	SNARE protein	m	4,14
AF112206	RAB14	RAB14, member RAS oncogene family		3,88
NM_001128	AP1G1	Adaptor-related protein complex 1, gamma 1 subunit	m	3,52
NM_004603	STX1A	Syntaxin 1A	m	3,38
BE645231	SEC24A	SEC24 related gene family, member A	g	3,34
NM_013995	LAMP2	Lysosomal-associated membrane protein 2	m	-2,75
BE789881	RAB31	RAB31, member RAS oncogene family		-3,09
NM_012120	CD2AP	CD2-associated protein	c	-3,35
NM_002865	RAB2	RAB2, member RAS oncogene family		-3,97
NM_005639	SYT1	Synaptotagmin 1	m	-4,14

Table 3 (Continued)

Sequence	Gene	Name/Function	CC	FC
<b>Hypothetical Genes and ESTs</b>				
NM_024796	FLJ22639	hypothetical protein FLJ22639		58,5
Y08772	null	H.sapiens PABII pseudogene	n	47,68
M27830	null	null		20,79
M27830	null	null		15,25
NM_022907	FLJ23053*	hypothetical protein FLJ23053		10,28
AI992187	null	Homo sapiens alpha-NAC gene for nascent polypeptide-associated		9,49
NM_018183	FLJ10701	hypothetical protein FLJ10701		8,39
AA156865	FUBP1	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp564O0122	n	5,02
NM_024668	FLJ20288	hypothetical protein FLJ20288		4,92
NM_014805	KIAA0766	KIAA0766 gene product		4,82
NM_014949	KIAA0907	KIAA0907 protein		4,74
D87450	KIAA0261	KIAA0261 protein		4,72
NM_024524	AFURS1	ATPase family homolog up-regulated in senescent cells	m	4,41
AW002970	FLJ12542	hypothetical protein FLJ12542		4,26
H49382	null	EST		4,03
AW205215	KIAA0286	KIAA0286 protein	m	3,86
AB020677	KIAA0870	KIAA0870 protein		3,76
AL109684	null	Homo sapiens mRNA full length insert cDNA clone EUROIMAGE		3,61
AW516297	null	Homo sapiens cDNA FLJ11946 fis. clone HEMBB1000709	n	3,49
NM_016040	LOC50999	CGI-100 protein	m	3,47
NM_017976	GABPB2	GA binding protein transcription factor, beta subunit 2, 47kDa	n	3,36
AL036840	null	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp564O0122		3,33
AF130050	null	Homo sapiens clone FLB3442 PRO0872 mRNA, complete cds		3,21
NM_023012	FLJ11021*	Similar to splicing factor, arginine/serine-rich 4		3,13
NM_031214	AF311304	hypothetical protein AF311304		3,1
NM_018339	FLJ11149	hypothetical protein FLJ11149	c	2,94
NM_024778	FLJ22612	hypothetical protein FLJ22612		2,88
NM_019044	FLJ10996	hypothetical protein		2,67
NM_014744	TBC1D5	KIAA0210 gene product		-3,07
NM_020194	GL004	GL004 protein		-3,17
AI700633	null	Homo sapiens cDNA: FLJ22642 fis. clone HSI06970		-3,35
BF340123	FLJ11149	hypothetical protein FLJ11149	c	-3,45
AL117499	DKFZP434D1	DKFZP434D1335 protein		-3,45
AL534702	null	EST		-3,55
BC002873	DKFZP564J0	DKFZP564J0123 protein		-3,73
AI890972	PRO2730	hypothetical protein PRO2730		-3,76
NM_014034	DKFZP547E2	DKFZP547E2110 protein		-3,97
AV755522	CIC	capicua homolog		-4,41
NM_014888	GS3786	predicted osteoblast protein	e	-4,45
AB018289	KIAA0746	KIAA0746 protein		-4,49
BF511231	null	ESTs. Weakly similar to ubiquitous TPR motif. Y isoform [H.sapiens]	e	-4,56
BF967998	PBX1	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp586J2118		-4,77
BE780075	null	Homo sapiens cDNA FLJ13553 fis. clone PLACE1007454	m	-4,92
AA805651	KIAA0143*	KIAA0143 protein	m	-4,98
BF447246	KIAA0960*	KIAA0960 protein		-5,54
NM_024897	FLJ22672	hypothetical protein FLJ22672	m	-6,98
NM_007213	JM4	JM4 protein		-8,34

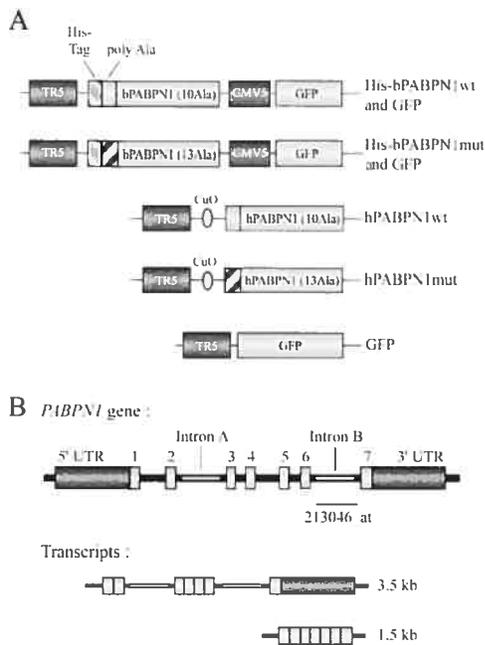
\*, genes represented by two probesets among the 219 probesets identified in this study; CC, cellular components of the proteins according to GO; n, nuclear; c, cytoplasmic; n/c, nuclear and cytoplasmic; m, membrane; mi, mitochondrial; and e, extracellular.

**Table 4 : Proteins that colocalize with PABPN1 in the INIs of the adenoviral model and OPMD muscle**

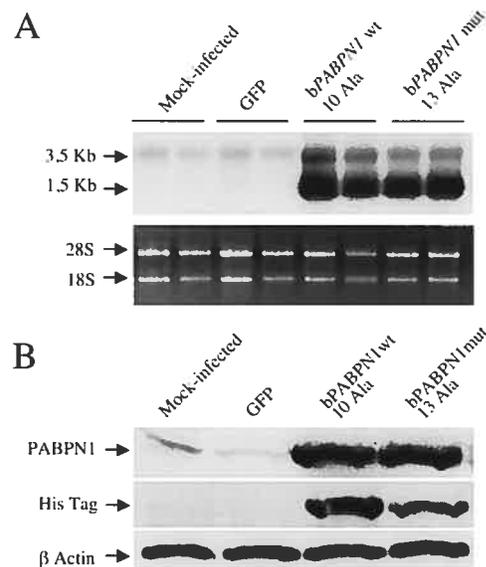
<b>Proteins</b>	<b>CC A549</b>	<b>CC</b>	<b>Molecular function</b>	<b>INIs A549</b>	<b>INIs OPMD muscle</b>
CUGBP1	n	n	RNA binding	+	+
FKBP1A	n/c	n	DNA binding	+	+
HMG2	n	n	DNA binding	+	-
HNRPA1	n	n	RNA binding	+	+
PRC1	n	n	Mitotic spindle elongation	+	Not tested
S100P	n	n	Calcium binding	+	Not tested
SFRS3	n	n	RNA binding	+	+
HSP70	n/c	n/c	Chaperone	+	+
SGCB	n/c	m	Cytoskeleton	-	-
TNFRSF10D	c	m	Receptor	-	-
EIF5	c	c	Translation initiation factor	-	Not tested

CC.A549, major cellular components of the proteins in A549 cells; CC, cellular components of the proteins according to Gene Ontology; n, nuclear; c, cytoplasmic; n/c, nuclear and cytoplasmic; m, membrane; +, the tested proteins that colocalize with PABPN1 within the INIs; -, tested protein that was not found to colocalize with PABPN1.

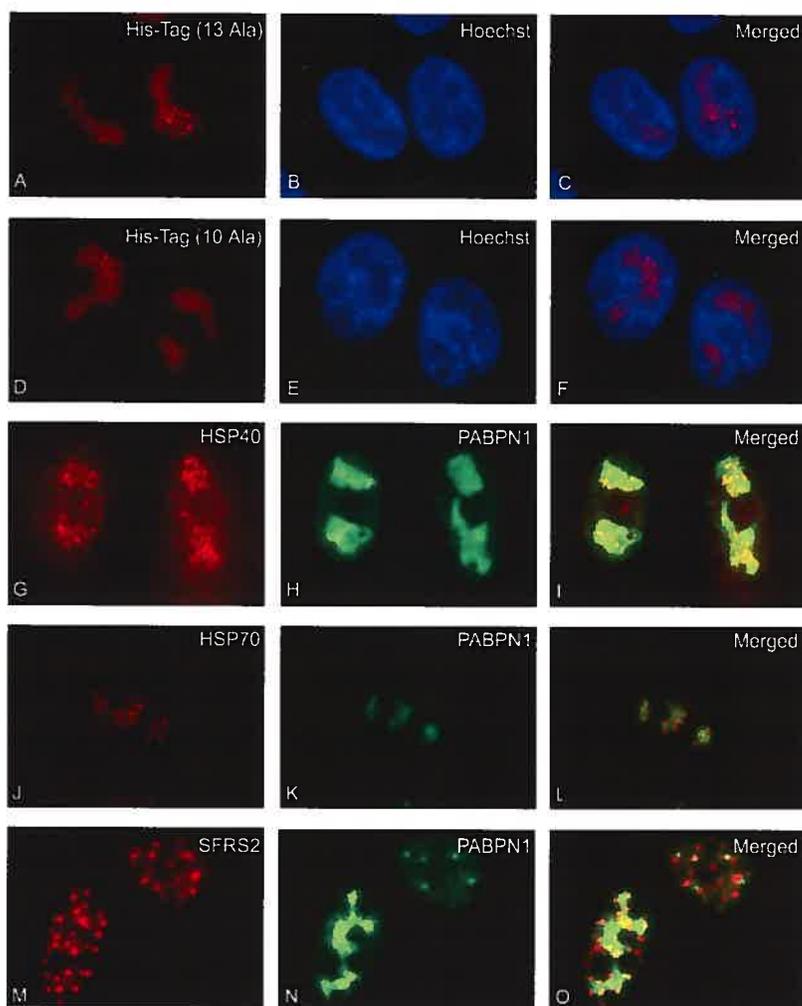
\* Fan *et al.* 2003, \*\* Boa *et al.* 2004



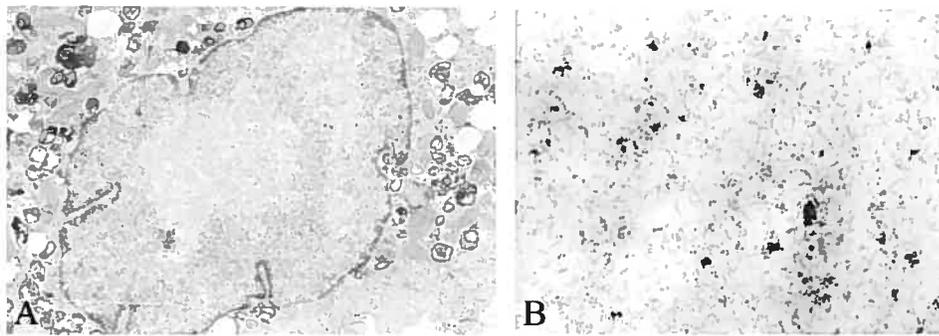
**Figure 11: Schematic representation of the inducible expression cassette of the adenoviral vectors and structure of the *PABPN1* gene.** (A) The TR5 promoter drives the expression of the gene in the presence of the tetracycline trans-activator (tTA). The first two constructs express bovine *PABPN1* with 10 or 13 alanines (coding for bPABPN1wt or bPABPN1mut, respectively). A 6 His-tag was placed at the N-terminus of the protein to differentiate endogenous from exogenous protein expression. The plaque purification step of these adenoviruses was facilitated by the coexpression of the Green Fluorescent Protein (GFP) under the control of a constitutive CMV promoter. An adenovirus expressing the GFP alone was also used as control. A second set of adenoviruses was designed allowing the inducible expression of non-tagged human *PABPN1* with the wild-type 10 or mutated 13 alanine domains (coding for hPABPN1wt or hPABPN1mut respectively). The Cumate operator (CuO) allows the inhibition of protein expression in the CymR cell line used to clone the recombinant adenoviruses. (B) The *PABPN1* gene is composed of 7 exons and 6 introns. Two introns (labeled A and B) are conserved in higher molecular weight RNA transcripts. One Affymetrix probeset (213046\_at) detects the intron B sequence in RNA. This probeset allowed us to differentiate the endogenous *PABPN1* transcripts from the exogenous expression of *PABPN1* without introns in our microarray experiments. The 3.5 kb transcript corresponds to the partially spliced mRNA containing the two main introns (named A and B). The 1.5 kb transcript correspond to the fully spliced mRNA or to the adenoviral expressed *PABPN1*.



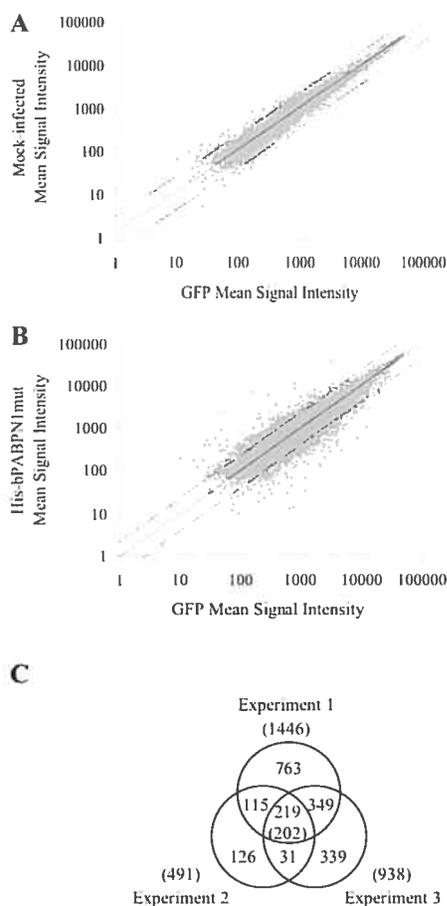
**Figure 12: Overexpression of *PABPN1* in A549tTA cells.** Cells were infected at 50 pfu/cell with adenoviruses expressing either GFP or bPABPN1 with 10 or 13 alanines. RNA and proteins were harvested 48 h post-infection. (A) Northern blots were probed using a DNA probe derived from the pgm10-PABP2 plasmid. A549tTA cells infected by bPABPN1 encoding adenoviruses express mainly the 3.5 and 1.5 kb transcripts, with the shorter transcript corresponding to the fully spliced *PABPN1*. The uppermost band corresponds to the endogenous RNA containing intron B. (B) Western blots using a polyclonal anti-PABPN1 antibody detecting PABPN1 as a 50 kDa band (upper panel). Detection with a monoclonal anti-His-tag antibody demonstrates that bPABPN1 overexpression was essentially due to the adenoviral vectors (middle panel). RNA and proteins used for Northern and Western blots were extracted from the same culture than the one used to prepare RNA for the first microarray experiment



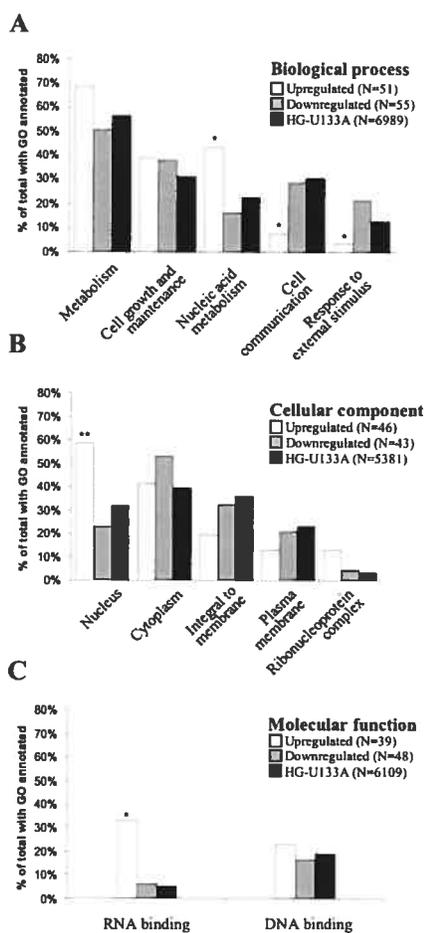
**Figure 13: Characterization of INIs produced by *PABPN1* expression in A549tTA cells using immunofluorescence microscopy.** A549tTA cells were infected with adenoviruses expressing either bPABPN1mut or bPABPN1wt (both at 5pfu/cell) and fixed in 4% paraformaldehyde 96 h post-infection. The resulting inclusions were shown to contain PABPN1 as revealed by an anti-His antibody (A and D respectively for PABPN1mut and wt, red staining) and to exclude DNA (Hoechst staining in blue, B, C and E, F respectively for PABPN1mut and wt). The inclusions also contained the molecular chaperones HSP40 (G) and HSP70 (J). Double labeling with an anti-PABPN1 antibody (E and H, green staining) showed colocalization of these chaperones with PABPN1. (J-K) SFRS2 (SC35) (M, red staining) do not colocalize with PABPN1 within the inclusions (N and O) (A-L:  $\times 1000$  and M-O:  $\times 400$ ).



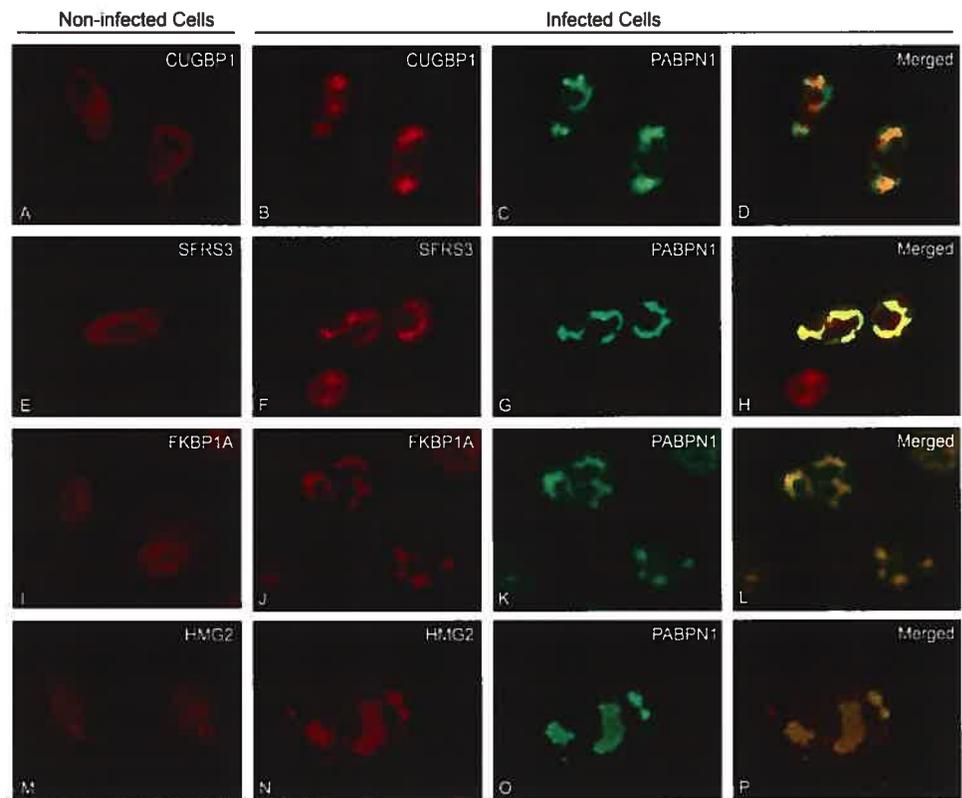
**Figure 14: Characterization of INIs produced by *PABPN1* expression in A549tTA cells using electron microscopy.** Cells were infected at 5 pfu/cell with adenoviruses expressing His-bPABPN1mut and fixed 2.5% glutaraldehyde and post-fixed in osmium tetroxide, 96 h post infection. (A) The INIs as seen under electron microscopy appear as large pale zone within the nucleus of an infected cell ( $\times 4000$ ). (B) Upon higher magnification ( $\times 38000$ ), these inclusions appeared to be composed of filamentous and globular aggregates.



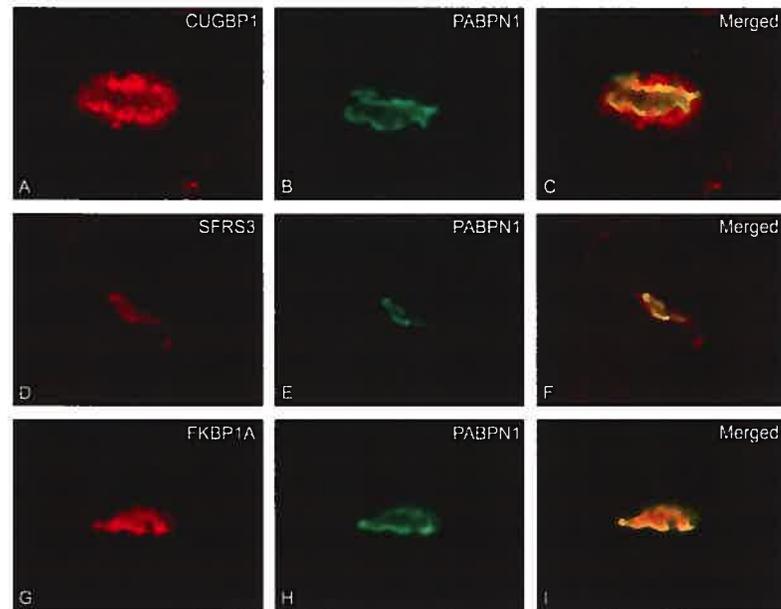
**Figure 15: Expression profile in cells expressing mutant *PABPN1*.** Scatter Plot of 11629 gene expression levels in A549tTA cells infected with (A) adenoviruses expressing GFP and A549tTA non infected cells and (B) A549 cells infected with adenovirus expressing GFP only and cells infected with an adenovirus expressing bPABPN1mut (both at 50 pfu/cell). Data shown is log of the mean normalized signal intensity for 2 and 3 independent experiments respectively. Hatched diagonal lines delineate fold changes greater or equal to  $\pm 2.5$ . (C) Summary of results of the 3 independent His-bPABPN1mut (50 pfu/cell) infections compared to infected controls expressing GFP. A group of 219 probsets, which detect 202 distinct genes, displays a reproducible change in expression following PABPN1 overexpression.



**Figure 16: Analysis of differential frequency of Gene Ontology (GO) terms in microarray data.** We compared the relative frequency of GO terms between upregulated and downregulated genes using FATIGO software. Each group was also compared to the entire HG-U133A array. Comparisons were performed for biological process (A), cellular component (B) and molecular function (C). Percentages were calculated with respect to all genes annotated at the specified level and ontology. Only those GO terms representing 10% of all genes with GO annotation, at the selected level and ontology, and corresponding to at least 5 genes are represented. N, total number of genes with GO annotations retrieved by FATIGO, at the specified level and ontology. Significant differences in the distribution of annotations between groups are tested by a Fisher exact test ( $p < 0.05$ ) and are represented by a (\*), while differences found to be significant for both Fischer's exact test and for False Discovery Rate (FDR) adjusted p-values ( $p < 0.05$ ) are indicated by (\*\*). Note that for biological process annotations, all annotations were at level 3 ontology, except for the "nucleic acid metabolism" ontology, which was found at level 4. At this level of ontology, FATIGO successfully annotated 48 and 54 genes from the upregulated and downregulated genes instead of the 51 and 55 genes annotated at the level above.



**Figure 17: Colocalization of proteins encoded by upregulated genes with PABPN1 in intranuclear inclusions of the adenoviral model.** A549tTA non -infected cells were fixed with 4% paraformaldehyde and stained for CUGBP1, SFRS3, FKBP1A and HMG2 (respectively A, E, I and M, red staining). A549tTA cells were infected at 50 pfu/cell with the adenovirus expressing hPABPN1mut. Cells were fixed 48 h post infection with 4% paraformaldehyde and were double-stained for CUGBP1, SFRS3, FKBP1A or HMG2 (respectively B, F, J and N, red staining) and PABPN1 (C, G, K and O, green staining). All of these proteins colocalized with PABPN1 within the INIs of our adenoviral model (respectively D, H, L and P, yellow staining). Magnification: (A-D, E, I and M)  $\times 600$ , (F-H and J-K)  $\times 400$ , and (N-P) Confocal microscopy  $\times 1000$ .



**Figure 18: Colocalization of proteins encoded by upregulated genes with PABPN1 in intranuclear inclusions of OPMD muscle.** Confocal microscopy was done on frozen section (5  $\mu\text{m}$ ) of quadriceps from a  $(\text{GCG})_{13}$  homozygous OPMD patient. Sections were double-stained for CUGBP1, SFRS3 or FKBP12 (respectively A, D and G, red staining) and PABPN1 (B, E and H, green staining). All of them were found to colocalize with PABPN1 within the inclusions. (C, F yellow staining). ( $\times 1000$ ).

### **Chapitre 3 : La délétion ou de grandes expansions dans le domaine polyalanine de PABPN1 modifient son agrégation et son expression.**

#### **Contribution des co-auteurs**

**A.F. Klein** a participé à toutes les étapes du projet. Il a effectué une très large partie des expériences et est à l'origine de toutes les figures de l'article. Il a rédigé l'intégralité du manuscrit et a effectué toutes les corrections demandées (texte et expériences) pour le processus de révision

**M. Ebihara** a grandement participé à l'élaboration des constructions pour exprimer PABPN1 et PHOX2B fusionnés à la GFP.

**C. Alexander** a participé à l'élaboration des constructions pour exprimer les protéines polyalanines.

**M.J. Dicaire** a participé à l'élaboration et la purification des constructions adénovirales, à participer l'obtention de résultats avec le modèle cellulaire.

**A.M.J. Sasseville** a participé à l'élaboration des constructions adénovirales et à la correction du manuscrit.

**Y. Langelier** collabore avec nous sur le projet notamment pour les constructions adénovirales.

**G.A. Rouleau** collabore avec nous sur le projet, notamment sur l'utilisation des modèles cellulaires et la toxicité.

**B. Brais** a supervisé toutes les étapes du projet, de l'élaboration du projet et des expériences jusqu'à l'écriture du manuscrit.

**PABPN1 polyalanine tract deletion and long expansions modify its aggregation pattern and expression**

Arnaud F. Klein<sup>1</sup>, Mitsuru Ebihara<sup>1</sup>, Christine Alexander<sup>1</sup>, Marie-Josée Dicaire<sup>1</sup>, A. Marie-Josée Sasseville<sup>1,2</sup>, Yves Langelier<sup>2,3</sup>, Guy A. Rouleau<sup>4</sup> and Bernard Brais<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of neurogenetics of motion, Centre d'excellence en neuromique de l'Université de Montréal, CRCHUM, Université de Montréal, Montréal, Canada

<sup>2</sup> Centre de recherche du CHUM, Université de Montréal, Montréal, Canada

<sup>3</sup> Département de microbiologie et immunologie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

<sup>4</sup> Centre d'excellence en neuromique de l'Université de Montréal, CRCHUM, Université de Montréal, Montréal, Canada

Corresponding author: Bernard Brais MD, MPhil, PhD  
Centre de recherche du CHUM, M4211-L3  
Hôpital Notre-Dame-CHUM  
1560 Sherbrooke est  
Montréal, Québec  
H2L 4M1, Canada  
Tel:1-514-890-8000 Ext.: 25560  
Fax: 1-514-412-7525



**Abstract**

Expansions of a (GCN)<sub>10</sub>/polyalanine tract in the Poly(A) Binding Protein Nuclear 1 (PABPN1) cause autosomal dominant oculopharyngeal muscular dystrophy (OPMD). In OPMD muscles, as in models, PABPN1 accumulates in intranuclear inclusions (INIs). In other diseases caused by polyalanine expansions in nuclear proteins it was shown that the mutated proteins abnormally accumulate in the cytoplasm. This study presents the impact on the subcellular localization of PABPN1 produced by large expansions of its polyalanine tract or its deletion. Large tracts of more than 24 alanines lead to PABPN1 nuclear accumulation in SFRS2-positive functional speckles and are associated with significant decline in cell survival. These large expansions do not cause INIs formation nor do they lead to cytoplasmic accumulation. Deletion of the polyalanine tract induces the formation of aggregates that localize on either sides and traverse the nuclear membrane, highlighting the possible role of the N-terminal polyalanine tract in PABPN1 nucleo-cytoplasmic transport. We also show that though five other proteins with polyalanine tracts tend to aggregate when over-expressed they do not co-aggregate with PABPN1 INIs. This study presents the first experimental evidence that there may be a relative loss of function in OPMD by decreasing the availability of PABPN1 through an INI-independent mechanism.

**Keywords:** polyalanine, OPMD, PABPN1, aggregate, intranuclear inclusions

## Introduction

During the past decade, the uncovering of polyalanine tract expansions in oculopharyngeal muscular dystrophy (OPMD) (Brais et al., 1998b ; Brais, 2003) and eight other diseases heightened interest in these frequent homopolymeric regions (Amiel et al., 2004 ; Brown et al., 2004 ; Albrecht et al., 2005). In the human proteome, approximately 500 proteins harbor more than 600 polyalanine tracts greater than four alanines, 120 of these contain stretches longer than seven alanines (Lavoie et al., 2003). The strong conservation of size and position of the polyalanine tracts between species suggest a functional and structural evolutionary pressure for their appearance (Lavoie et al., 2003 ; Fondon et al., 2004). However, the role of these conserved regions is still largely unknown.

The biophysical properties of polyalanine stretches have been extensively studied (Blondelle et al., 1997 ; Scheuermann et al., 2003 ; Shinchuk et al., 2005 ; Giri et al., 2007). Polyalanine peptides containing more than seven alanines in a row were shown to form spontaneously  $\beta$ -sheet-containing fibrillar structures, which are very resistant to a wide range of proteases, denaturants and pH (Forood et al., 1995 ; Shinchuk et al., 2005). Several *in silico* studies have confirmed that the properties of polyalanine peptides contribute to the formation of organized aggregates (Ma et al., 2002 ; Nguyen et al., 2004, 2005). In cellular models, the overexpression of constructs coding for alanine stretches coupled to fluorescent tags lead to the formation of aggregates that are usually associated with some cellular toxicity (Rankin et al., 2000 ; Ravikumar et al., 2002 ; Oma et al., 2004 ; Berger et al., 2006a). The minimal number of alanines needed for aggregation and significant toxicity is still undetermined. To date, (GCN)/polyalanine expansions have been found in nine disease genes: *PABPN1* in oculopharyngeal muscular dystrophy (OPMD) (Brais et al., 1998b), *HOXD13* in Synpolydactyly (SPD) (Muragaki et al., 1996), *RUNX2* in Cleidocranial dysplasia (CCD) (Mundlos et al., 1997), *ZIC2* in Holoprosencephaly type 5 (HPE5) (Brown et al., 1998), *HOXA13* in hand-foot genital syndrome (HFGS) (Goodman et al., 2000), *FOXL2* in Blepharophimosis, ptosis and epicanthus inversus syndrome (BPES) (Crisponi, 2001), *PHOX2B* in congenital central hypoventilation syndrome (CCHS) (Amiel et al., 2003 ; Sasaki et al., 2003), *ARX* in Infantile spasm X-linked syndrome (ISSX/MR) (Bienvenu et al., 2002), and *SOX3* in Mental retardation with growth hormone deficiency

syndrome (MRGH) (Laumonnier et al., 2002). These diseases are mostly congenital and involve mutations in transcription factors (Amiel et al., 2004 ; Brown et al., 2004 ; Albrecht et al., 2005). OPMD stands as an exception in polyalanine diseases being a late onset disease that is not caused by a mutation in a transcription factor.

OPMD (MIM 164300) usually presents in the late forties or early fifties as an autosomal dominant muscular dystrophy characterized by eyelid drooping, swallowing difficulties and proximal limb weakness (Brais, 2003). In dominant OPMD, a (GCN)<sub>10</sub> repeat coding for a polyalanine tract at the N-terminus of the Poly(A) Binding Protein Nuclear 1 (PABPN1) is expanded to a (GCN)<sub>12-17</sub> (Brais et al., 1998b ; Brais, 2003). The pathological hallmark of the disease is the presence of intranuclear inclusions (INIs) in skeletal muscles (Tomé et al., 1980). These inclusions are composed of filaments arranged in palisades that contain PABPN1, molecular chaperones, components of the ubiquitin-proteasome pathway, poly(A)-RNA (Calado et al., 2000c ; Abu-Baker et al., 2003 ; Bao et al., 2004) and transcription co-factors (Corbeil-Girard et al., 2005). PABPN1 is an ubiquitous polyadenylation factor essential for the extension of the poly(A) tails of eukaryotic mRNA (Kuhn et al., 2004). The protein shuttles between the nucleus and the cytoplasm (Calado et al., 2000b ; Bear et al., 2003). PABPN1 is a multidomain protein that includes: a polyalanine tract (aa 2-11); a coil-coiled domain important for the stimulation of the Poly(A) polymerase (aa 119-147) (Kerwitz et al., 2003 ; Verheesen et al., 2006); a RNP-motif RNA-binding domain essential for self-interaction (aa 161-257)(Kuhn et al., 2003); a nuclear localization signal (NLS, aa 289-306)(Calado et al., 2000a ; Abu-Baker et al., 2005); and two oligomerization regions (aa 155-294 and 264-306) that overlap the RNA binding domain and the NLS (Fan et al., 2001). To date, the role of the polyalanine tract and its expansion on PABPN1 structure and function is still unknown.

The overexpression of PABPN1 in cellular, mice and drosophila models induces the formation of INIs and leads to cell death (Shanmugam et al., 2000 ; Kim et al., 2001 ; Ravikumar et al., 2002 ; Abu-Baker et al., 2003 ; Bao et al., 2004 ; Hino et al., 2004 ; Corbeil-Girard et al., 2005 ; Davies et al., 2005 ; Chartier et al., 2006). The PABPN1-containing INIs are usually filamentous and share features of OPMD muscle INIs (i.e. DNA exclusion, presence of proteasome subunits, chaperones and poly(A) mRNA)(Brais, 2003). These inclusions are dynamic and disassemble in a large part during mitosis

(Sasseville et al., 2006). However, despite the fact that nuclear inclusions can be produced *in vitro* and *in vivo*, their role in the pathogenesis is still poorly understood. It was shown that mutated PABPN1 does not alter the steady-state mRNA poly(A) tails length in OPMD myoblasts even from double-mutant homozygote patients (Calado et al., 2000a). The combined observations of the apparent preservation of PABPN1 polyadenylation functions, the non-lethality of the homozygote state in humans and the observation of PABPN1-containing nuclear aggregates in OPMD skeletal muscle suggested that a gain-of-function mechanism was at play in this dominant muscular dystrophy (Brais et al., 1998b ; Brais, 2003 ; Amiel et al., 2004 ; Brown et al., 2004 ; Albrecht et al., 2005).

Until 2004, OPMD was the only polyalanine disease where the formation of inclusions *in vivo* or *in vitro* was described. Since, several studies have shown that overexpression of all the eight proteins involved in other polyalanine diseases induces their aggregation in cellular models (Albrecht et al., 2004 ; Caburet et al., 2004 ; Nasrallah et al., 2004 ; Bachetti et al., 2005 ; Brown et al., 2005). It was also shown that an increase above 25 alanines in the size of the polyalanine tracts of HOXA13, HOXD13, SOX2, RUNX2 and PHOX2B leads to the relocalization of these nuclear proteins to the cytoplasm (Albrecht et al., 2004 ; Bachetti et al., 2005). These observations led to the hypothesis that the cytoplasmic shift cause a loss-of-function by limiting the nuclear availability of these transcription factors (Albrecht et al., 2004). This hypothesis was in part confirmed *in vivo* in a mice model of synpolydactyly by the finding of abnormal cytoplasmic Hoxd13 staining (Albrecht et al., 2004).

In this article we explored if the size of the PABPN1 polyalanine tract influences its cellular localization as observed with other polyalanine proteins. As mutated PABPN1 was never shown to accumulate in the cytoplasm, we chose to produce constructs with expanded tracts in the size range of mutations observed in other polyalanine proteins (i.e. in a 25-40Ala range) and constructs without a polyalanine tract. We show that these major alterations of the PABPN1 polyalanine tract strongly modify its aggregation and localization without leading to cytoplasmic aggregations. Our observations that increasing the size of the polyalanine tract significantly disturbs the protein/mRNA ratio of PABPN1

and leads to greater cellular toxicity, together raise the possibility that a decrease in PABPN1 availability may play a role in OPMD physiopathology.

## Material and methods

### *Cell lines and culture*

Hela cells and Cos7 cells were cultured in DMEM (Wisent, St-Bruno, Qc) supplemented with 10% of FBS (fetal bovine serum, Wisent) without antibiotics. Human A549tTA cells were cultured as previously described (Massie et al., 1998a ; Massie et al., 1998b). Proliferating A549tTA cells were maintained in DMEM supplemented with 5% of TSA FBS (Tet-free system approved fetal calf serum; Clontech, Palo Alto, CA) and 30µg/ml phleomycin (Sigma, St-Louis, MI) until one passage before experiments. Lactacystin (Calbiochem, San Diego, CA) was diluted in DMSO and used at 10µM. 3-Methyl Adénine (3MA; Sigma) was diluted in water and used at 10mM. Cells were treated with either of the two drugs 24h after transfection and incubated another 24h before the proteins were extracted.

### *Constructs*

*Plasmids:* For the insertion of *hPABPN1-wt* gene in the pDONR221 entry clone (Gateway system, Invitrogen, Carlsbad, CA), the cloning was done in two parts. The 5' part of the gene was modified and amplified in the pBluescript SK (pBSK) vector, using different AttB-forward primers (for the wt construct: 5' G GGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TTC ATG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCA 3'; for 13Ala construct: 5' G GGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TAT ATG GCA GCA GCA GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCA GCA GCA 3'; for 17Ala construct: 5' G GGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TAT ATG GCA GCA GCA GCA GCA GCA GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCG GCA GCA; for 0Ala construct: 5' G GGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TAT ATG GGG GCT GCG GGC GGT CGG GGC T 3'; for the NotI-hPABPN1wt construct: 5' G GGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TTC ATG GCG GCG CGG CGG CGG CGG CA 3'); and the *SacI* reverse primer: 5' CGA CCG AGG CCC AGG GCC CGG AGC TCC CG 3'. The 3' part of the gene was modified and amplified following a *SacI* digestion of the hPABPN1wt construct cloned in the pBSK vector. The purified digested products were reinserted into a new pBSK vector linearized with *SacI*. Finally, modification of the 3' part was done by PCR with a standard forward M13 primer and an AttB-reverse primer (5' G GGG ACC

ACT TTG TAC AAG AAA GCT GGG TCC TAG TAA GGG GAA TAC CAT GAT GT 3'). The ligation products of the 5' and 3' parts were inserted into the pDONR221 vector using the BP clonase recombination kit (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. Competent DH5 $\alpha$  bacteria were transformed with BP recombination products and grown in LB + kanamycin antibiotic (50 $\mu$ g/mL, Roche, Basel, Switzerland). Plasmid DNA was purified using the plasmid Midi Kit (Qiagen, Mississauga, Canada), and quantified using a Beckman spectrophotometer and then sequenced. To insert the genes in the pcDNA-Dest53 or pcDNA-V5/dest expression vectors (Invitrogen), the LR clonase recombination kit (Invitrogen) was used according to the manufacturer's protocol. Competent DH5 $\alpha$  bacteria were transformed with LR recombination products and grown in LB + ampicillin antibiotic (50 $\mu$ g/mL, Roche). Plasmid DNA was purified using the plasmid Midi Kit (Qiagen), and quantified using a Beckman spectrophotometer. For the hPABPN1-30 and -40Ala constructs, the pDONR221-NotI-hPABPN1wt entry clone was digested using the *NotI* enzyme. Multiples permutation polyalanine cassettes were produced by the annealing of 5' GGC CGC AGC AGC AGC 3' and 5' CGT CGT CGT CGC CGG 3' oligos that were inserted in the linearized vector. Constructs of different sizes were sequenced to confirm the number of inserted cassettes. Subsequent LR recombination, plasmid DNA purification and quantification were done as described above. *C-terminal GFP-tagged constructs*: Mutated *PABPN1* sequences were amplified by PCR from the pcDNA-Dest53 vector using different forward size-specific primers (for the wt: 5' GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT CAC CAT GGC GGC GGC GGCG; for 0 Ala: 5' GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTA TAC CAT GGG GGC TGC GGGC; and for 17 Ala: 5' GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTA TAC CAT GGC AGC AGC AGC A) and a reverse primer inducing a p.X306Leu mutation (3' GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC CAA GTA AGG GGA AT). PCR products were inserted in the pDONR221 and then in pcDNA-Dest47 vectors as previously described. The PABPN1-25Ala-GFP construct was generated using the same protocol described for GFP-PABPN130 and 40 alanines constructs. *Adenoviruses*: The insertion and mutagenesis of bPABPN1 (GFP or His-tagged) and hPABPN1 in adTR5-CuO vectors were described in two previous publications (Corbeil-Girard et al., 2005 ; Sasseville et al., 2006). The hPABPN1mut-0Ala was generated as the other adenoviral constructs by using primers:

5'G AAG ATC TTC GCG GCG ATG GGG GCT GCG GGC GGT CGG GGC TCC GGG CCG 3' and 5' TCC TCT TGG CTG CCG GGG GCT CCC GAA CCA GGC CCA GGG 3'.

### *Immunofluorescence microscopy*

Cells were plated on cover slides prior to transfection or infection. They were fixed 48h post-transfection or post-infection in PBS containing 4% paraformaldehyde for 10min at room temperature (RT) and kept in PBS at 4°C until used. Cells were permeabilized in cold methanol 10min at RT, rinsed 3 × 5min with PBS, and then blocked in PBS-Tween (0.05%)-BSA (3%) (PBS-TB) for 30min at room temperature (RT). The cells were incubated 45min with the primary rabbit or mouse antibody diluted in PBS-TB. The cells were washed in PBS-T 3 × 5min and then incubated 30min with the appropriate secondary antibody diluted in PBS-TB: donkey polyclonal anti-rabbit Cy3 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA; 1/200) or goat polyclonal anti-mouse Cy3 (Jackson ImmunoResearch; 1/200). DNA was stained with 5µg/ml of Hoechst 33342 (Molecular Probes, Eugene, OR) in PBS-T. Cover slides were mounted using the anti-fading Prolong Gold mounting media (Molecular Probes). Primary and secondary antibodies were mixed together during the incubation for double staining experiments. Primary antibodies used were: Rabbit polyclonal anti-PABPN1 1/200 (provided by E. Whale), mouse monoclonal anti-SFRS2 1/200 (provided by M. Vincent), mouse monoclonal anti-lamin B1 1/200 (provided by Y. Raymond)(Dieude et al., 2002), mouse monoclonal anti-NUP153 1/200 (Abcam, Cambridge, UK), mouse monoclonal anti-P4HB 1/200 (Abcam) and mouse monoclonal anti-HisTag 1/500 (Qiagen). Standard fluorescence microscopy was performed using a DM6000B microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Pictures were captures using a Leica DFC480 digital camera and processed using the Open Lab software (Improvision Ltd., Coventry, UK). Images from double labeling experiments were sequentially recorded in different channels then transferred to Adobe Photoshop software (Adobe System Inc., San José, Ca) for over layering.

### *RNA in situ fluorescent hybridization*

RNA FISH was performed as previously described ([www.singerlab.org/protocols](http://www.singerlab.org/protocols)) (Taneja, 1998). Briefly, cells plated on cover slides were fixed with 4% paraformaldehyde and kept at 4°C over-night in 70% ethanol. Cells were rehydrated in PBS for 10min, then permeabilized 10min with cold methanol and rinsed 3×5min with PBS. Cells were pre-hybridized 10min in 2×SSC+40% formamide at RT and hybridized with 15ng of labeled poly(T) probe in 2×SSC-40% formamide, over-night at 37°C. The probe was labeled with DIG using the oligonucleotides 3'end DIG labeling kit (Roche). Following hybridization cells were rinsed 30min in 2×SSC+40% formamide at RT and 2×5min in PBS-Tween 0,05%. Staining of the DIG-labeled probe alone or in combination with PABPN1 was done as described above using 1/200 monoclonal mouse anti-DIG antibody (Roche).

### *RNA extraction and Northern blots*

Cells trypsinized 48h post-transfection or adenoviral infection were harvested, washed in PBS and divided for RNA (70%) and protein (30%) extractions. Total RNA was extracted using Trizol (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. RNA pellets were suspended in DEPC treated water. Total RNA was quantified using a spectrophotometer. Samples were separated on a standard denaturing gel. Integrity of RNA was assayed on agarose gel and concentrations were adjusted based on ribosomal RNA signals. RNA were transferred on an Hybond N+ Nylon membrane (Amersham Biosciences, UK) and hybridized overnight at 65°C with a bovine PABPN1 cDNA probe labeled with <sup>32</sup>P (Nemeth et al., 1995) using the Ready-To-Go DNA labeling Beads (dCTP) kit (Amersham Biosciences). A solution containing heparin and dextran sulfate was used as a hybridization buffer. Autoradiography was performed using Kodak X-OMAT LS films.

### *Western blots*

Cells kept for protein extraction were lysed in Laemli 1X + 6M urea denaturing extraction buffer (62.5mM Tris-HCl; 2% SDS; 6M urea) and sonicated to shear the DNA. Protein concentrations were measured using the DC colorimetric assay (Biorad Laboratories, Hercules, CA) with BSA as a standard. Samples were separated on a 9% acrylamide/bisacrylamide gel (37.5:1) and transferred 2h on a PVDF membrane at 100V.

Membranes were blocked two hours in PBS-Tween 0.05%, BSA 3% and Milk 5%. A rabbit polyclonal anti-PABPN1 antibody (provided by E. Whale) (Krause et al., 1994) (1/2000) and a rabbit polyclonal anti-GFP (provided by B. Massie) antibody (1/2000) were used respectively to detect PABPN1 and the GFP-Tag. HRP-conjugated goat anti-rabbit (Amersham Biosciences, UK) antibody (1/5000) was used as secondary antibody and the bound peroxidase was detected using the ECL detection kit (Amersham Biosciences). A rabbit polyclonal anti-GRP78 (SantaCruz)(1/250) was used for the unfolded protein response assay. To control for loading, membranes were stripped and then re-blotted with a mouse monoclonal anti- $\beta$  Actin antibody (1/5000) (Abcam) and revealed with HRP-conjugated Goat anti-mouse antibody (1/5000) (Amersham Biosciences) using the ECL peroxidase detection kit (Amersham Biosciences).

#### *Densitometry assays*

The Protein/mRNA ratio was obtained for each construct by comparing the total PABPN1 protein and RNA extracted from cells harvested 48h post-transfection or adenoviral infection as described above. Densitometry analyses were done on Western and Northern blots using the Alphadigidoc software (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA). To compare proteins quantities, the PABPN1 values were normalized using  $\beta$ -actine. Briefly, for each construct, a correction factor was derived by comparing the obtained  $\beta$ -actine value to the mean of all the  $\beta$ -actine values from the same blot. Theses normalized values were represented in percentage. To compare the levels of protein to RNA expression, RNA densitometry values were normalized based on the expression of ribosomal RNA. The RNA correction factor was computed for each construct by comparing individual expression levels to the mean for the same set of experiments. This factor was applied to the PABPN1 values and results are provided in percentage. The Lactacystin and 3MA assay was performed by comparing normalized levels of PABPN1 between untreated and drug-treated cells transfected with the same construct in 3 duplicate experiments.

*Toxicity assay*

The toxicity assay was done as previously described (Abu-Baker et al., 2005). Briefly cells were plates in 12-well plates and transfected with 0.5 $\mu$ g of DNA in each well by construct according to the manufacturer's protocol. 24h after transfection, cells in fresh medium were placed in the heated and humidified chamber of an automated stage microscope DMI6000B (Leica Microsystem) with 5% of CO<sub>2</sub>. For each construct, three distinct fields were initially selected that contained a similar number of transfected cells. Approximately 200 cells were counted for each construct at day 1. The exact location of each field and the pictures were taken using an Orca-ER camera (Hamamatsu, Bridgewater, NJ) and the Open Lab software (Improvision Inc., Waltham, MA). The following days, pictures at the exact same position were taken and the number of remaining transfected cells in was counted and compared to the number of total transfected cells at day 1 for each field of each construct. The experiment was done three times in duplicates (n=6 except for GFP-PABPN1-wt with n=5).

## Results

### *PABPN1 with large expanded polyalanine tracts localize to functional nuclear SFRS2-positive speckles*

To investigate if the cytoplasmic shift observed with large expansions of polyalanine tracts in other proteins (Albrecht et al., 2004 ; Bachetti et al., 2005) occurred also with PABPN1, we generated constructions expressing hPABPN1 with 25-40 alanines tracts (Fig. 1A and 1B). The largest polyalanine expanded tract reported is a 33 alanines stretch in PHOX2B (Matera et al., 2004 ; Trochet et al., 2005). First, we show that expression of the GFP-hPABPN1 constructs with a wild-type (wt) 10Ala or 13Ala mutated tracts form inclusions in Hela cells (Fig. 1B and 2A). These inclusions are nuclear, exhibit a strong GFP signal and do not colocalize with the splicing factor SFRS2 (Fig. 2A). SFRS2 (formerly called SC35) is a marker of nuclear speckles, which are the functional localization of PABPN1 in nucleus when implicated in the mRNA processing machinery (Krause et al., 1994 ; Lamond et al., 2003). On the other hand, expression of the GFP-hPABPN1-40Ala led to a different pattern. Fig. 2A shows that the expanded protein is still nuclear but is present in SFRS2-positive nuclear speckles (Fig. 2A, lower panel). These results are reproducible at different time points (24, 48 and 72 hours post-transfection), with different concentration of plasmid DNA (0.5, 1, 2 and 4 $\mu$ g/well) (data not shown) and in COS7 epithelial-like cells (Fig. 2B). To exclude that the N-terminal position of the GFP-tag influences the localization of the protein, we expressed untagged and C-terminal GFP-tagged PABPN1 constructs with 25Ala and 29Ala tracts (Krause et al., 1994). Expression of these constructs confirms the absence of large INIs in transfected cells and reveal the complete or partial colocalization of these different forms of PABPN1 with SFRS2 (Fig. 2C). All experiments with C- or N-terminal GFP-tag 10Ala, 17Ala, and large expansions PABPN1 constructs do not demonstrate any changes in the patterns of inclusion formation (Supp. Fig. 1A). Our results also show that there is no cytoplasmic relocation of PABPN1 with a tract longer than 24 alanines, as was observed for many transcription factors with expanded polyalanine tracts (Albrecht et al., 2004).

*Deletion of PABPN1 polyalanine tract leads to its aggregation in proximity and across the nuclear membrane*

We chose to delete the polyalanine tract of PABPN1 to investigate its roles in nuclear localization and aggregation (Fig. 1A and 1C). In certain species, such as *Drosophila*, PABPN1 does not have a polyalanine tract (Benoit et al., 1999). When expressed using adenoviruses, non-tagged PABPN1-0Ala forms inclusions in A549tTA cells. However, the inclusions are smaller and more numerous than when they are generated by over-expressing wt, 13 or 17 alanines PABPN1 (Fig. 3A) (Corbeil-Girard et al., 2005). In addition, the inclusions are localized close to the nuclear membrane (Fig. 3A and supp. Fig. 1B). These results were also reproduced in HeLa and COS7 cells (Fig. 3A and data not shown). To better define the localization of these inclusions compare to the nuclear membrane, we used different markers: nucleoporine 153 (NUP153) for the nuclear membrane, Lamin B1 (LMNB1) for the nuclear surface and the proline-4-hydroxylase (P4HB, formerly called PDI) for the cytoplasmic surface (Fig. 4A and 4B). Immunofluorescence studies reveal that the inclusions disturb the organization of the nuclear membrane as seen by the absence of NUP153 within most of the aggregates (Fig. 4A) and the disorganization of the LMNB1 staining (Fig. 4B, upper panel). The absence of NUP153 staining within the inclusions observed by confocal microscopy (Fig. 4A), suggests that the aggregates traverse the membrane. The inclusions do not colocalize with SFRS2 (Fig. 4B, lower panel). Furthermore, FISH experiments show that these aggregates contain less poly(A)-mRNA than the nuclear inclusions formed by PABPN1wt or mutated 13-17Ala constructs (Fig. 4C). Together, these results confirm that the polyalanine tract is not essential for aggregation and raise the possibility that it may play a role in the nucleocytoplasmic transport of the protein. The accumulation of PABPN1 close to the nuclear membrane combined to the relatively low mRNA content of these accumulations leads us to hypothesize that the polyalanine domain could play a role in the mRNA-independent nuclear import of PABPN1 (Calado et al., 2000b).

These results are different from the ones previously published by Tavanez *et al.* (Tavanez et al., 2005). In their study, the INIs produced by expressing N-terminal GFP-tagged PABPN1-0Ala were similar to the one observed with wt or mutated 17Ala PABPN1 (Tavanez et al., 2005). These apparent contradictory results are likely explained by the N-

terminal position of the GFP-tag. As we show in Fig. 3B, the presence of the GFP-tag at the N-terminus of PABPN1-0Ala restores a nuclear aggregation pattern similar to the one we observe with the wt or 13-17Ala constructs. To further confirm that the addition of the N-terminal tag was indeed responsible for this modified pattern, and not only the presence of a GFP molecule, we expressed a C-terminus GFP-tagged PABPN1-0Ala. Immunofluorescence studies reveal that the expression of the PABPN1-0Ala-GFP constructs produces similar peri-nuclear aggregates (Fig. 3C and Supp. Fig. 1C) as the untagged protein (Fig. 3A). The fact that a GFP at the N-terminus is able to rescue the localization of PABPN1 into INI suggests that the N-terminal conformation of PABPN1, likely induced by the polyalanine tract in wild-type protein, is essential for nuclear localization of the protein.

*The length of the polyalanine tract influences PABPN1 protein/mRNA ratio*

We consistently observe that the expression of the GFP-hPABPN1-40Ala construct leads to relatively less nuclear GFP signal compare to the other constructs. This observation raises the possibility that the size of the polyalanine tract may influence the level of expressed PABPN1. To assay PABPN1 mRNA expression compare to protein levels, we collected RNA and protein samples from the same transfection or infection experiments. We used an 8M urea protein extraction buffer to ensure that no PABPN1-rich aggregates were ever found in the stacking gels. We observe that the hPABPN1-30Ala and -40Ala constructs, although expressing *PABPN1* mRNA at higher levels, produce relatively less protein than the wt and 17Ala constructs (Fig. 5A). This impact is reproducibly greater with the GFP-hPABPN-40Ala compare to GFP-hPABPN1-wt (20.2% versus 107.5%,  $p < 0.05$ ) and GFP-hPABPN1-17Ala (20.2% versus 172.2%,  $p < 0.005$ ) (Fig. 5C).

To establish if the variations in protein/mRNA ratio occur with PABPN1 harboring human-size mutations, we completed similar experiments using our adenovirus model (adTR5-hPABPN1-0, 10, 13 or 17Ala, Fig. 1C). The adenoviral model allows a more efficient and reproducible expression of the protein in more than 80% of cells (Corbeil-Girard et al., 2005 ; Sasseville et al., 2006). Total RNA and proteins were collected from cells infected at a multiplicity of infection (MOI) of 50 pfu/cell. Densitometry studies from six independent experiments reveal that both the hPABPN-17Ala (66.5%) and 0Ala

(62.7%) have a significant decrease in their protein/mRNA ratio compare to the hPABPN1 10 or 13 alanines infected cells (142.5% and 128.2% respectively, student t-test  $p < 0,05$ ) (Fig. 5B and 5D). Together, these experiments suggest that the size of the polyalanine tract of PABPN1 appears to inversely influence its availability.

To determine, whether this decrease is due to a relative decline in translation efficiency or an increase in the degradation of the mutated protein, transfected cells were treated with lactacystin (10 $\mu$ M), which blocks the ubiquitin-proteasome system (UPS)(Fenteany et al., 1998), or 3-methyladenine (3MA ; 10mM), that inhibits the autophagy pathway (Seglen et al., 1982). These two pathways were shown to play a role in the degradation of PABPN1 (Abu-Baker et al., 2003) and polyalanine peptides (Ravikumar et al., 2002). Drugs were added 24h post-transfection and cells were incubated another 24h prior to protein extraction. The results presented in Fig. 6 show that the inhibition of the UPS or autophagy leads to an increase in PABPN1-40Ala protein levels (145%,  $p < 0.05$  and 443%,  $p < 0.0005$ ) compared to control (Fig. 6A-C). Treatment of cells transfected with 10 or 17Ala constructs does not show significant modifications of PABPN1 protein levels, though the trend to increase is observed (data not shown). We also studied the activation of the unfolded protein response (UPR) by measuring the levels of GRP78 (Schroder et al., 2005). The GRP78 levels are significantly increased in cells transfected with GFP-hPABPN1-17Ala (135%,  $p < 0.0005$ ) and GFP-hPABPN1-40Ala (144%,  $p < 0.0005$ ) compare to control (Fig. 6D and E). These results could reflect interference with the UPS or autophagy in our system (Kitiphongspattana et al., 2005). Together, these results suggest that expansion of PABPN1's polyalanine tract induces a reduction in the availability of the protein with large polyalanine tract expansions by increasing its clearance, mainly through an autophagic process.

#### *The length of the polyalanine tract of PABPN1 influences cell survival*

To determine if large expansions or deletion of PABPN1 polyalanine tract could have an impact on the fate of cells overexpressing PABPN1 we measured cell growth and survival (Abu-Baker et al., 2005 ; Sasseville et al., 2006). Using an automated microscope system we followed serially the fate of transfected cells. The experiments demonstrate that cells transfected with GFP-PABPN1-10, 13 and 17 alanines continue to grow for two or

three days before their number start to decrease dramatically (Fig. 7A). Cells transfected with the wt construct exhibit a significant increase growth rate compare to the others mutated constructs (Fig. 7A,  $p < 0.0005$  during the first two days). On the other hand, the number of cells transfected with PABPN1 with 30 or 40Ala constructs never grow and only see their number decrease with time (Fig. 7A). The most significant differences are observed at day 3 when cells transfected with wt construct total 175% of their original number, while the 17Ala transfected cells total 140% ( $p < 0.00005$ ) and the 40Ala transfected cells only 40% ( $p < 0.00005$ ). These results are also confirmed with the PABPN1-25Ala-GFP expression, which exhibits a significant decrease in cell survival starting at day 3 compare to wt and 17Ala constructs ( $p < 0.005$ , Fig. 7B). Therefore, though the expression of PABPN1 with large polyalanine tracts does not lead to aggregation, they cause an early and significant decline in cell survival. Combining these observations and our previous results on the decrease in the protein/mRNA ratios, we can hypothesize that expanded PABPN1 is more toxic for cells through an INI-independent mechanism that yet has to be identified.

Decrease in cell survival is also observed with the expression of PABPN1-0Ala-GFP when compared to PABPN1-wt or 17Ala constructs (Fig. 7B). The difference is most significant at day 3 when compared to cells transfected with wt constructs (139% versus 100%,  $p < 0.0005$ ). This result is not unexpected considering the 0Ala PABPN1's perinuclear accumulation (Fig. 3C). The cells transfected with the N-terminal GFP-PABPN1-0Ala constructs exhibit cell survival curves similar to cells expressing a wt form (Fig. 7C). This observation correlates well with the restored nuclear aggregation discussed above caused by the N-terminal position of the GFP tag (Fig. 3B). Together, our results demonstrate that mutating the polyalanine tract impairs cell survival and that this toxicity is stronger in the absence of SFRS2-negative nuclear inclusions.

#### *The role of the polyalanine tract in PABPN1 and polyalanine protein aggregation*

Many authors hypothesized that the pathological mechanism caused by expansions of the polyalanine tract is related to structural change induced to PABPN1 past a certain tract length (Blondelle et al., 1997 ; Brais et al., 1998b ; Brais, 2003 ; Shinchuk et al., 2005 ; Davies et al., 2006a). It was proposed that the new conformation of the tracts may

increase  $\beta$ -sheet interactions between polyalanine regions of the mutated protein and possibly other proteins with polyalanine tracts. Considering that OPMD is a dominant disease, we investigated if mutated PABPN1 recruits wt PABPN1 in INIs. Indeed, immunofluorescence studies of cells co-infected with AdTR5-His-bPABPN1-13Ala and AdTR5-CuO-GFP-bPABPN1-wt adenoviruses reveal that the INIs contained both wt and mutated PABPN1 (Fig. 4D). Recruitment in the peri-nuclear membrane aggregates is also observed by co-expressing hPABPN1-0Ala with GFP-hPABPN1-17Ala (Fig. 4E). To investigate if polyalanine tracts play a role in co-aggregation with other polyalanine proteins, we chose to co-transfect five polyalanine proteins with tracts greater than nine alanines: TLE3, PHOX2B, TBX2, BHLHB3 and ZNF358 (Fig. 8A). These proteins were selected from a database of human polyalanine proteins (Lavoie et al., 2003) based on the availability of full cDNAs. All are transcription factors. Only PHOX2B is mutated in a disease (Amiel et al., 2003). We show that all these proteins are nuclear (Fig. 8B), and of that PHOX2B and TLE3 appear to form nuclear inclusions (Fig. 8B, upper panels). Co-expression of these five proteins with PABPN1-17Ala in HeLa cells does not demonstrate any colocalization but rather independent accumulation (Fig. 8C). Expression of mutated PHOX2B, with either an addition of 5 alanines or a deletion of 13 alanines in the first 20 alanines tract, does not induce any further recruitment in PABPN1 INIs (Supp. Fig. 2A). For TBX2 and BHLHB3, for which antibodies are commercially available, co-transfection experiments with GFP-PABPN1-17Ala do not show colocalization of these proteins in PABPN1 INIs (Supp. Fig. 2B). Together, these results show that, though proteins with polyalanine tracts often have a tendency to aggregate when over expressed, they do not co-aggregate with PABPN1 or with other proteins with such homopolymeric stretches. However, the absence of co-aggregation does not exclude the possibility of interactions between the non-aggregated proteins at the molecular level.

## Discussion

In OPMD, as in other GCN/polyalanine expansion diseases, the primary role of the polyalanine tracts in the mutated proteins and how their expansions influence normal function is still largely unknown (Amiel et al., 2004 ; Brown et al., 2004). The experiments presented in this paper were prompted by the intriguing observation that expanding the polyalanine tracts in other proteins led to their abnormal accumulation in the cytoplasm in a size-dependent manner (Albrecht et al., 2004 ; Bachetti et al., 2005 ; Shoubridge et al., 2007). This led to the hypothesis that such aggregation of transcriptional factors outside the nucleus may be the basis for a loss of function in these disorders (Albrecht et al., 2004). Though PABPN1 is not a transcription factor and the OPMD mutations consist of smaller alanines expansions (Brais et al., 1998b), it is a nuclear protein that shuttles extensively between the nuclei and the cytoplasm raising the possibility that cytoplasmic retention caused by expansions of its polyalanine tract could play a role in the pathology (Calado et al., 2000b). Therefore, we chose to explore the possible cytoplasmic accumulation of PABPN1 in cellular models by studying large expansions of its polyalanine tract. This approach had the added value that it enabled the investigation of two other proposed molecular hypotheses that could be at play in OPMD: the role of the expanded polyalanine tract in self aggregation and in co-aggregation with other proteins through polyalanine stretch interactions (Blondelle et al., 1997 ; Brais et al., 1998b ; Brais, 2003 ; Shinchuk et al., 2005 ; Giri et al., 2007). In this paper, we demonstrate that even with large polyalanine expansions, PABPN1 does not shift to accumulate in the cytoplasm and that polyalanine tract interaction between PABPN1 molecules and other polyalanine proteins do not occur in a significant way as assessed by the absence of co-aggregation.

Despite the observation that PABPN1 with large polyalanine expansions does not form INIs nor accumulate in the cytoplasm, we show that it is accompanied by significant cellular toxicity. We show that this toxicity is associated with a decrease in the protein level of PABPN1 compare to its mRNA. Notably, this phenomenon was also observed in our more sensitive adenoviral model with an untagged human-size mutation 17Ala PABPN1, suggesting that this could occur in disease muscle. This is the first experimental evidence that there may be a relative loss of function in OPMD by decreasing the availability of PABPN1 at the protein level. We show that this relative decrease in PABPN1 availability is

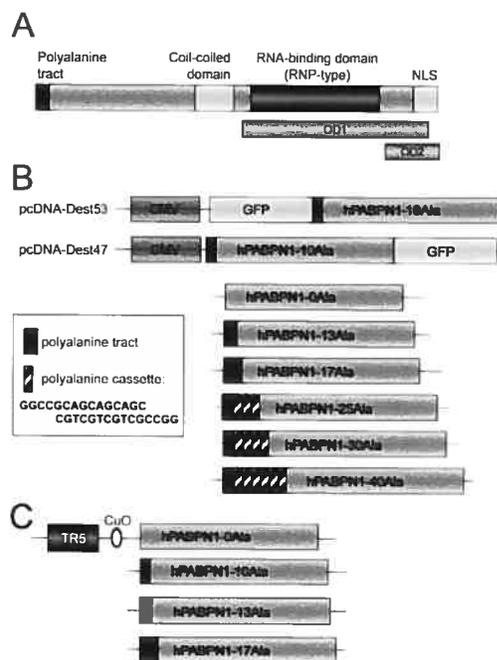
more likely due to increased clearance of the protein caused by an autophagic process, though INIs accumulation and proteasome degradation undoubtedly contribute to the overall loss of PABPN1 (Ravikumar et al., 2002 ; Abu-Baker et al., 2003). These findings could match the pathological observations of the absence of cytoplasmic PABPN1 accumulation but the presence of increased autophagic rimmed vacuoles in the cytoplasm of OPMD muscles fibers (Tome et al., 1997). However, the mechanisms by which such decrease in PABPN1 availability can influence cell survival still needs to be uncovered. The fact that expression of PABPN1 with large expansions does not induce INIs formation while significantly decreasing cell survival, suggest that this could be caused by an INI-independent mechanism. The previous observation that the toxicity of mutated PABPN1 was more likely due to free rather than the INI-bound PABPN1 in mammalian cells appear to point in the same direction (Messaed et al., 2007). Together, these studies encourage us to reconsider the often-proposed central role of the INI in the pathophysiology of OPMD. In the literature, several other INI-independent mechanisms have been proposed, including: interference with myogenic factors (Kim et al., 2001 ; Wang et al., 2006), accumulation of defective mRNA leading to cell cycle impairment (Wirtschafter et al., 2004), overall disturbance of mRNA maturation machinery (Bear et al., 2003 ; Brais, 2003), and loss of the anti-apoptotic function of PABPN1 (Davies et al., 2008). However, more experiments will be needed to determine in which way and how important a relative loss of function of PABPN1 by an INI-independent mechanism could be at play in OPMD.

The structural role of polyalanine tracts in proteins is still largely unknown except in spider silks where they play a role in ensuring tensile strength (Simmons et al., 1996). Our study largely excludes the possibility that the polyalanine tract in PABPN1 and five other proteins is important for self and co-aggregation, by this excluding these as major pathophysiological mechanisms. Similar polyglutamine tract interactions were also proposed in CAG/polyQ diseases but were never confirmed to occur (Michalik et al., 2003 ; Orr et al., 2007). In addition, by confirming that the polyalanine stretch in PABPN1 is not essential for its aggregation (Kuhn et al., 2003 ; Tavanez et al., 2005), our study underlines the paradox that though the pathological marker of the diseases is the accumulation of PABPN1 in muscle nuclei, the INI may not be the chief pathological culprit. This is even more surprising considering the evidence derived from cellular and *in vitro* models. In such

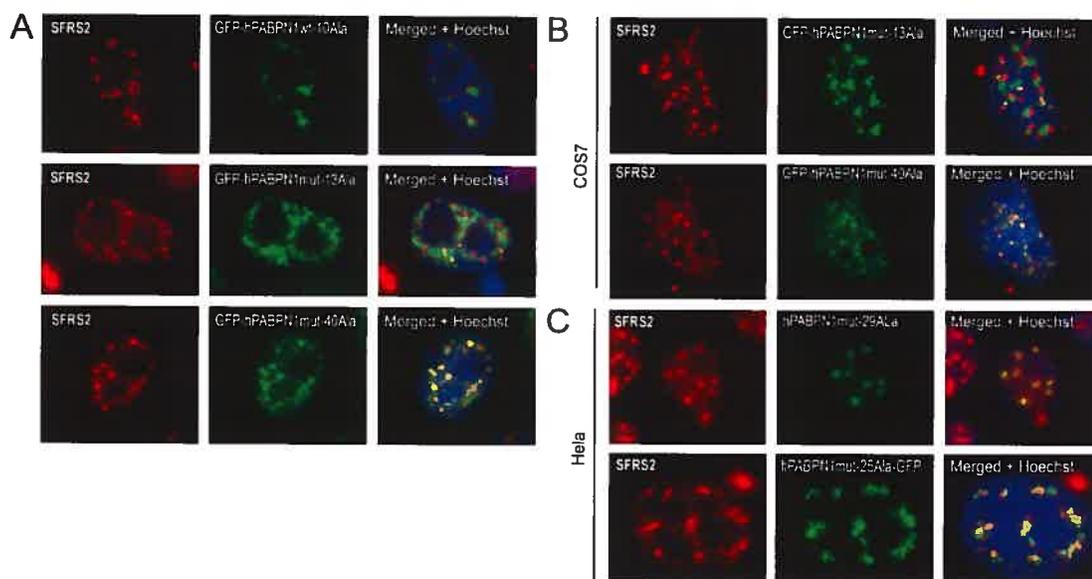
models, the lengthening of polyalanine sequences alone or fused to a fluorescent marker leads to pro-aggregative structural. And the expansion of the polyalanine tract of PABPN1 increases the tendencies of the protein to form amyloid-like structures *in vitro* (Rankin et al., 2000 ; Scheuermann et al., 2003 ; Oma et al., 2004 ; Shinchuk et al., 2005 ; Giri et al., 2007). This study does not resolve this paradox, but brings experimental evidences in support that the polyalanine tract influences the N-terminal structure of PABPN1. The accumulation of PABPN1-0Ala at the nuclear membrane and the restoration of INI formation with the addition of a N-terminal GFP both suggest that the conformation induced by the polyalanine tract may play an important role in the transport of the protein across the nuclear membrane. Furthermore, the apparent increase in the clearance of the expanded PABPN1 raises the possibility that the expansion of the polyalanine tract leads to significant structural changes that may cause PABPN1's inactivation in an INI-independent fashion. Though it appears that the polyalanine tract of PABPN1 is important for its transport across the nuclear membrane, its roles in normal protein function in PABPN1 and other proteins containing polyalanine tracts still needs to be further explored if we are to uncover how their expansions lead to disease.

### **Acknowledgments**

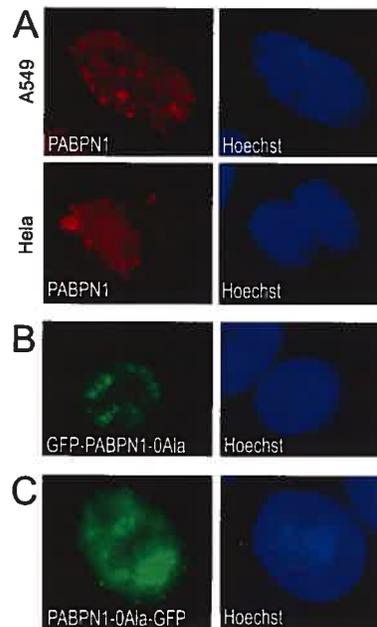
We thank E. Wahle, Y. Raymond and M. Vincent for sharing their antibodies. We also thank J. Laganier and C. Charbonneau for their technical support. This work is supported a grant to BB from the Neuromuscular Partnership of the Muscular Dystrophy Canada, ALS Society of Canada and the Canadian Institutes of Health Research (MOP-49485) and the Association Française contre les Myopathies (AFM). AK was awarded a graduate fellowship from the AFM. BB is a scholar of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ).



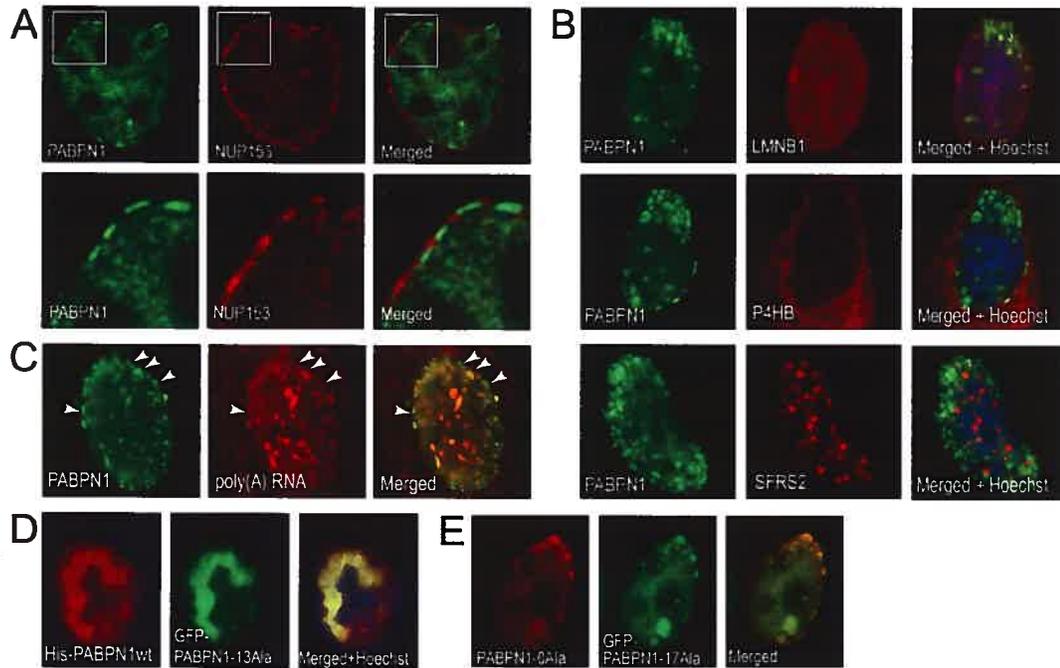
**Figure 19: Graphic representation of PABPN1 and the various expression constructs.** A) Representation of the various regions and domains of hPABPN1: the polyalanine tract (aa 2-11), a coil-coiled domain (aa 119-147), the RNA-binding domain (aa 161-257), the nuclear localization signal (NLS, aa 289-306) and the two oligomerization domains (OD1: aa 155-294 and OD2: aa 264-306). B) Graphic representation of the different GFP-tagged hPABPN1 constructs used in the study. The polyalanine tract is depicted as a dark grey box and the polyalanine cassette as a hatched one. C) Graphic representation of the untagged hPABPN1 adenoviral constructs. The polyalanine tracts are depicted in dark grey.



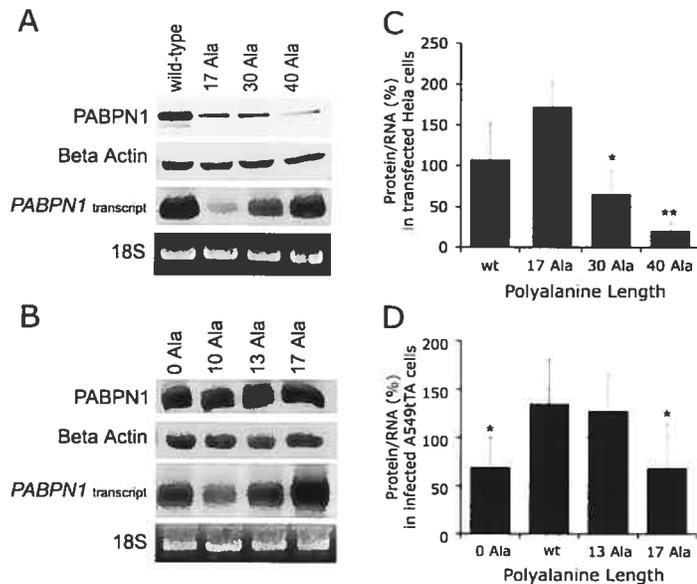
**Figure 20: Expression of large expanded (25-40Aa) hPABPN1 does not lead to INI formation.** A and B) HeLa (A) and Cos7 (B) cells transfected with 1 $\mu$ g/well of DNA for each construct. The hPABPN1wt and hPABPN1-13Aa form SFRS2-negative INI. Expressed hPABPN1-40Aa localizes to SFRS2-positive speckles. C) HeLa cells were transfected with 1 $\mu$ g/well of hPABPN1-29Aa or hPABPN1-25Aa-GFP also show accumulation of PABPN1 in SFRS2-positive speckles.



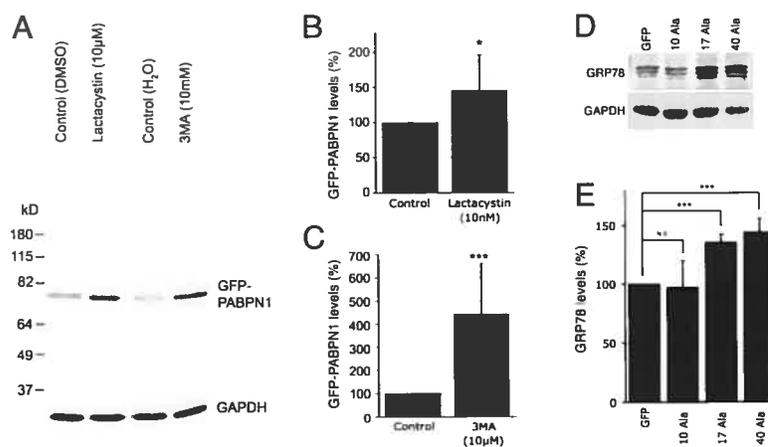
**Figure 21: Deletion of the polyalanine tract changes the aggregation of PABPN1 to a peri-nuclear pattern.** A) A549 cells infected with adenovirus expressing hPABPN1-0Ala at a multiplicity of infection (MOI) of 50 pfu/cell show peri-nuclear membrane accumulation. B) HeLa cells transfected with N-terminal GFP-tagged hPABPN1 (GFP-hPABPN1-0Ala) restore INI formation. C) HeLa cells transfected with C-terminal GFP-tagged hPABPN1 (hPABPN1-0Ala-GFP) show peri-nuclear accumulation.



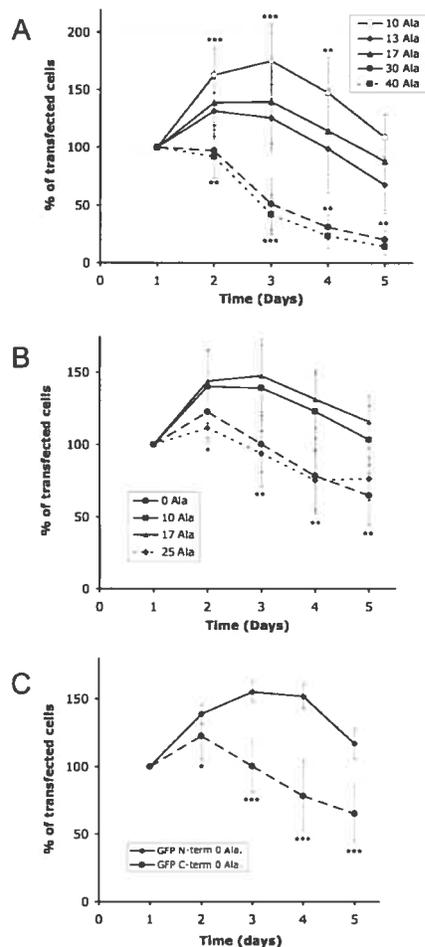
**Figure 22: Deleted PABPN1-0Ala accumulations disturb the nuclear membrane.** Deleted PABPN1-0Ala accumulations disturb the nuclear membrane. A) Infected A549 cells labeled with an anti-NUP153 antibody and observed with a confocal microscope show the localization of hPABPN1-0Ala through the nuclear membrane. Pictures in lower panel are enlargements of the framed areas of pictures in the upper panel. B) hPABPN1-0Ala infected cells labeled with anti-Lamin B1, anti-P4HB, or anti-SFRS2 antibodies further show that the peri-nuclear membrane accumulations are also present on the cytoplasmic side of the nuclear membrane and that they are SFRS2-negative. C) hPABPN1-0Ala infected cells hybridized with a DIG-labeled poly(T) probes show that the peri-nuclear accumulations do not contain much poly(A)-RNA (arrow heads). D) A549 cells co-infected with adenovirus expressing GFP-bPABPN1-13Ala and His-bPABPN1wt at a MOI of 25 pfu/cell show that wt PABPN1 is recruited in the peri-nuclear accumulations. E) HeLa cells co-transfected with hPABPN1-0Ala and GFP-hPABPN1-17Ala constructs show that mutated PABPN1 is recruited in the peri-nuclear accumulations.



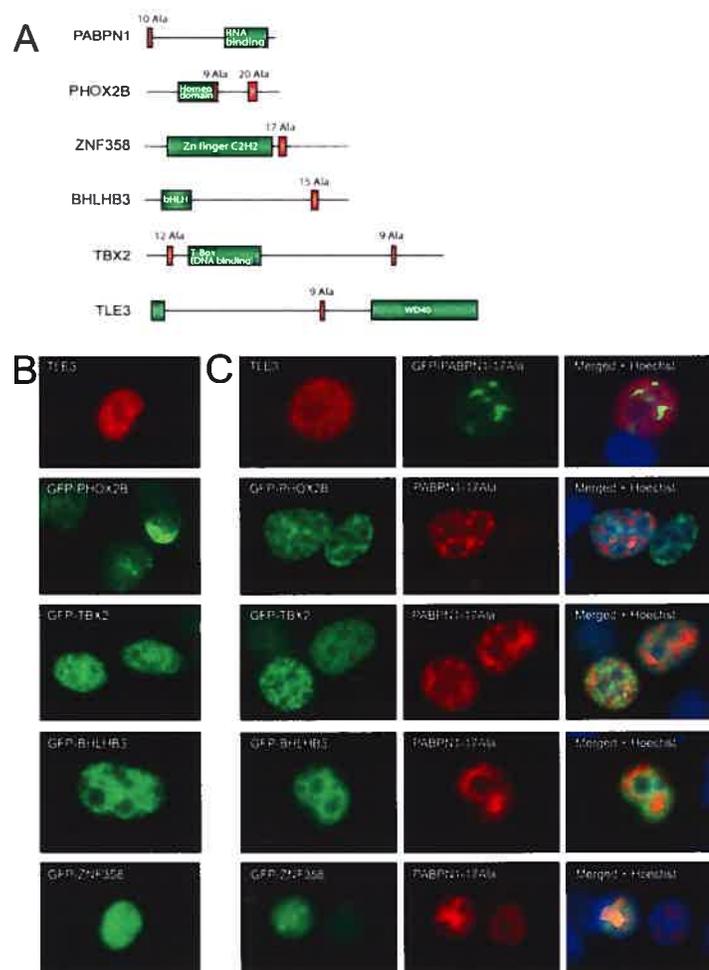
**Figure 23: Expansions and deletion of the PABPN1 polyalanine tract lead to decreased protein/mRNA ratios.** A) Western and Northern blots of samples from HeLa cells transfected with wt or mutated (17, 30 and 40Ala) GFP-hPABPN1 constructs. B) Western and Northern blots of samples from infected A549tTA cells with wt or mutated (0, 13 and 17Ala) hPABPN1 expressing viruses at a MOI of 50 pfu/cell. C) Densitometry studies from transfected HeLa cells demonstrate a significant decline in protein/mRNA ratios when comparing values for the GFP-hPABPN1-30 and -40Ala to the wt and 17Ala transfected cells (student t-test: \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.005$ ). D) Densitometry studies from infected A549tTA cells demonstrate a significant decline in protein/mRNA ratio when comparing values from A549tTA cells infected with adenoviruses expressing hPABPN1-0Ala and 17Ala to the wt and 13Ala constructs (student t-test: \*,  $p < 0.05$ )



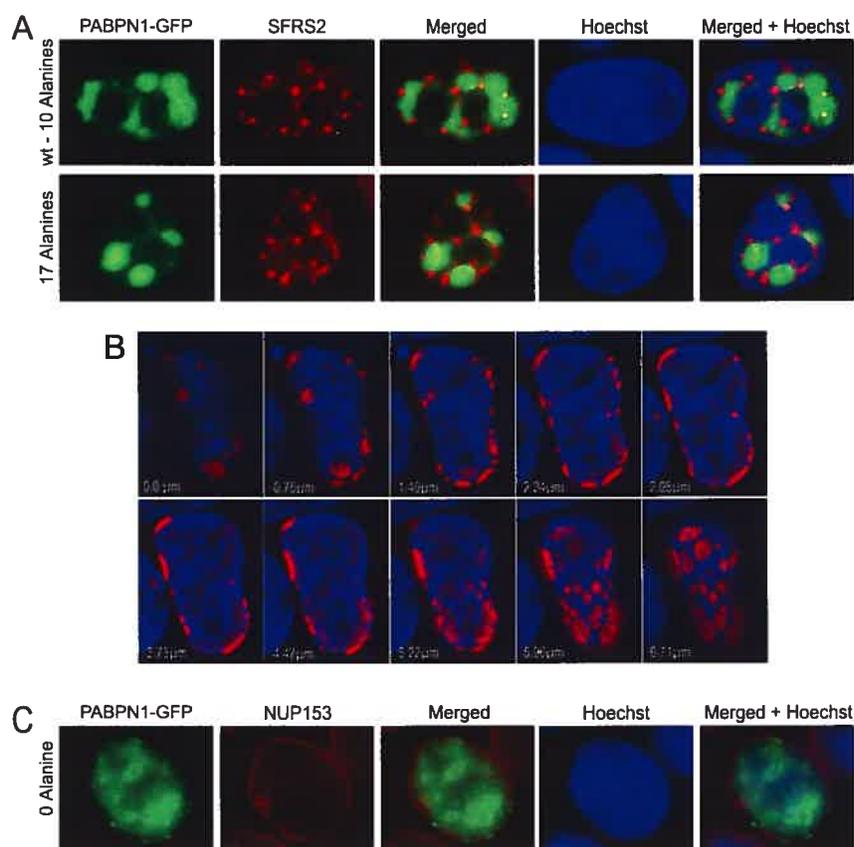
**Figure 24: The observed relative decrease in PABPN1 protein levels are likely due to an increase in clearance of the mutated protein.** A) Western blots 48h post-transfection from Hela cells treated with lactacystin (10 $\mu$ M), 3MA (10mM) and no drugs for 24h. B) Significant increase in GFP-PABPN1-40Ala protein level in cells treated with lactacystin compare to control (n=3 in duplicate). C) Significant increase in GFP-PABPN1-40Ala protein level in cells treated with 3MA compare to control (n=3 in duplicate). D) UPR activation assessed by GRP78 staining on Western blot of Hela cells transfected with control GFP construct or hPABPN1-10, 17 and 40Ala constructs. E) Densitometry analysis of the Western blots presented in (E) (n=3 in duplicate). (student t-test: \*, p<0.05 and \*\*\*, p<0.0005).



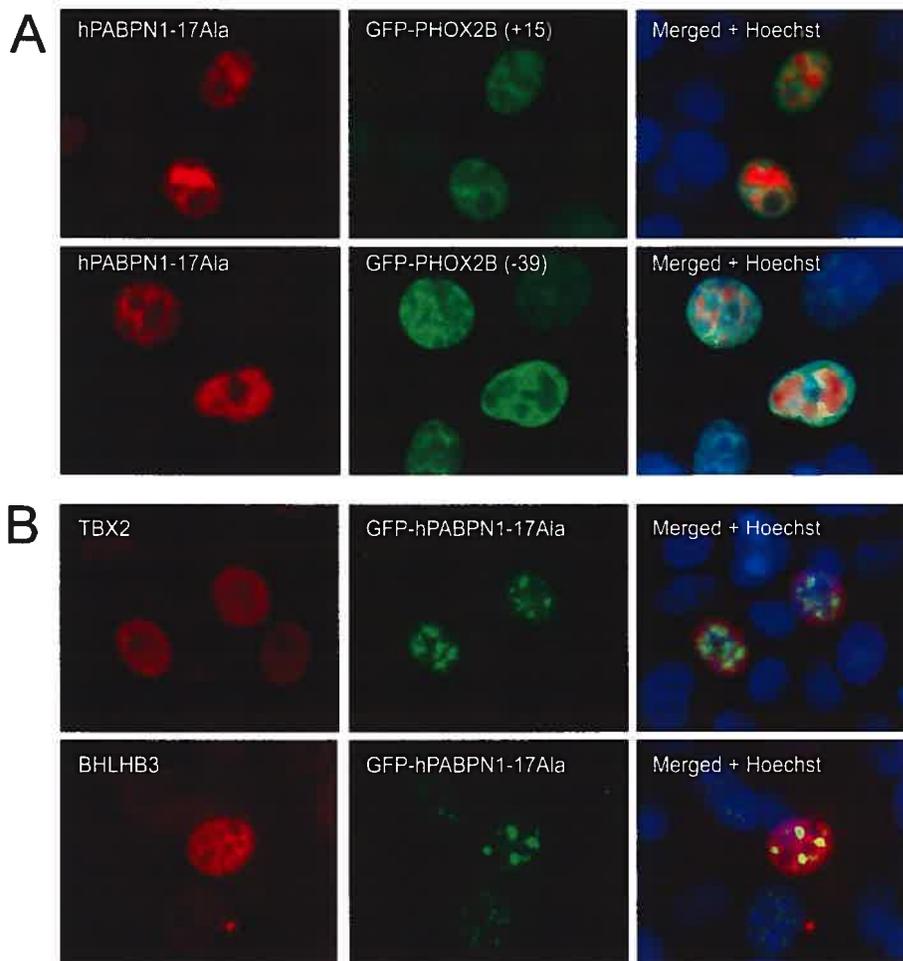
**Figure 25: Expression of PABPN1 with large or deleted polyalanine tracts reduces cell survival.** All values correspond to five-day evolution of cell counts of transfected cells per construct. Results are presented in percentages of transfected cells compared to the initial number of transfected cells on day 1. HeLa cells transfected with PABPN1 wt or mutated 13, 17, 25, 30 and 40Ala constructs expressed using the pcDNA-Dest53 (A) or the pcDNA-Dest47 vectors (B). C) Differences in cell survival for hPABPN1-0Ala according to the N- or C-terminal localization of the GFP-tag. The experiments were done three times in duplicate (student t-test: \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.005$  and \*\*\*,  $p < 0.0005$ ).



**Figure 26: The absence of co-aggregation of polyalanine proteins.** A) Graphic representation of the selected polyalanine proteins: TLE3, PHOX2B, TBX2, BHLHB3 and ZNF358. B) Upper panel: HeLa cells transfected with 1 $\mu$ g/well of TLE3 construct. Lower panel: HeLa cells were transfected with 1 $\mu$ g of each GFP-tagged construct (GFP-PHOX2B, GFP-TBX2, GFP-BHLHB3 or GFP-ZNF358). Cells were fixed 48 hours post-transfection. Immunofluorescence studies show that all proteins are nuclear. TLE3 and GFP-PHOX2B form nuclear aggregates. C) HeLa cells co-transfected with hPABPN1-17ala (untagged or GFP tagged) and all permutations of constructs expressing the five other polyalanine proteins demonstrate no co-aggregation (yellow).



**Figure 27: C-terminal GFP-tagged hPABPN1 forms inclusions in cells**  
 A) HeLa cells transfected with  $1\mu\text{g}/\text{well}$  of hPABPN1-wt or 17Ala constructs with a C-terminal GFP tag and stained with an anti-SFRS2 antibody (red) show the formation of INIs. B) Sequential observation using a confocal microscope of a HeLa cell transfected with  $1\mu\text{g}/\text{well}$  of hPABPN1-0Ala construct and stained with a anti-PABPN1 antibody (red) show the formation of inclusions around the nucleus (Hoechst, blue). The number ( $\mu\text{m}$ ) indicated represents the z position of each frame from the bottom to the top of the cell. C) HeLa cells transfected with  $1\mu\text{g}/\text{well}$  of hPABPN1-0Ala construct with a C-terminal GFP tag (green) and stained with anti-NUP153 antibody (red) reveal the formation of inclusions similar to the ones observed with the untagged hPABPN1-0Ala ( $\times 1000$ ).



**Figure 28: Absence of co-aggregation between polyalanine proteins.** A) HeLa cells were co-transfected with  $1\mu\text{g}/\text{well}$  of hPABPN1mut-17ala (GFP tagged or not) and with  $1\mu\text{g}/\text{well}$  of GFP-PHOX2Bmut- (+15Ala) or (-39) forms. The anti-PABPN1 staining shows an absence of co-aggregation between the different mutated PHOX2B proteins and hPABPN1, as revealed by the absence of signal when the channels are merged (right panels). B) HeLa cells were co-transfected with  $1\mu\text{g}/\text{well}$  of GFP-hPABPN1-17ala (GFP tagged or not) and with  $1\mu\text{g}/\text{well}$  of the hTBX2 or hBHLHB3 constructs. The cells stained with rabbit polyclonal anti-TBX2 (upstate) or anti-BHLHB3 (Sigma) antibodies show an absence of co-aggregation between the different proteins and hPABPN1.

## Chapitre 4 : Discussion générale et conclusion

Cette thèse de doctorat a pour thème central l'impact de la formation des inclusions intranucléaires riches en PABPN1 dans la dystrophie musculaire oculopharyngée. Le programme expérimental décrit nous a permis d'explorer plusieurs questions importantes liées au rôle de ces IINs dans la pathologie et à l'influence du domaine polyalanine de PABPN1 dans leur formation. Nous nous proposons dans ce dernier chapitre de mettre en perspective plus large l'ensemble des résultats des chapitres 2 et 3 afin de cerner leur contributions à l'avancement des connaissances sur les mécanismes physiopathologiques qui causent la DMOP. Pour se faire, nous confronterons nos résultats à ceux qui ont été obtenus par d'autres équipes au cours des dernières années sur les maladies à expansion de domaines polyalanines et polyglutamines.

### 4.1. Principaux résultats obtenus

Les études présentées dans le chapitre 2 montrent que l'utilisation d'adénovirus, pour exprimer PABPN1 dans des cellules humaines, nous a permis d'établir un modèle compétitif de la DMOP pour l'étude de la formation des IINs ainsi que de leur composition. Ce modèle permet la formation d'inclusions dans le noyau des cellules infectées. Les IINs obtenues possèdent de nombreuses caractéristiques des IINs observées *in vivo* dans les muscles des patients atteints de la DMOP. Grâce à ce modèle, nous avons pu effectuer des études d'expression utilisant des puces à ARN (*GeneChips* d'Affymetrix) pour tester la réponse des cellules à la surexpression de PABPN1. Cette étude, qui est la première et la seule étude d'expression publiée dans la DMOP, nous a permis de définir le profil d'expression de ces cellules, et d'identifier 202 gènes qui répondaient de manière reproductible à l'expression de PABPN1 et à la formation des IINs. Parmi ces gènes, une grande majorité code pour des protéines nucléaires, dont une forte proportion encodant des facteurs de maturation de l'ARNm, sont surexprimés. De plus cette étude nous a permis d'identifier huit constituants des IINs de notre modèle dont trois ont été confirmés dans les IINs de la DMOP (CUGBP1, SFRS3 et FKBP1A). Grâce à cette étude, nous avons émis

l'hypothèse que les IINs avaient un rôle actif dans la physiopathologie de la DMOP en séquestrant des facteurs de maturations de l'ARNm et d'autres protéines essentielles à la survie cellulaire. Finalement ce modèle a confirmé que l'expression de la forme sauvage de PABPN1 conduisait aussi à la formation d'IINs identiques à celles qui sont observées avec l'expression de la forme mutée. Au-delà de la similitude du phénotype observé par immunofluorescence, les profils d'expression presque identiques nous ont confirmé la similarité de leur impact sur les cellules.

Cette dernière observation fut en grande part responsable de l'élaboration de la seconde partie du projet concernant le rôle du domaine polyalanine de PABPN1 dans la formation des IINs et la localisation de la protéine. En effet, les études effectuées avec les mutations identifiées chez l'humain ne permettent pas d'isoler facilement les mécanismes pathologiques spécifiques liés à l'expansion du domaine polyalanine. Nous avons donc décidé d'amplifier d'éventuels phénotypes pathologiques en générant de grandes expansions ou en retirant le domaine polyalanine de PABPN1. En conséquence, nous avons produit plusieurs constructions afin d'exprimer PABPN1 dans des modèles cellulaires. Ces études, présentées au chapitre 3, ont montré que l'expansion du domaine polyalanine à plus de 24 alanines conduit à une diminution de la formation d'IINs et à une diminution de la survie cellulaire. Par ailleurs, la délétion du domaine polyalanine induit la formation d'agrégats situés à proximité de la membrane nucléaire, suggérant un rôle du domaine polyalanine dans le transport de la protéine. Finalement, nos études de co-localisation ont montré que les IINs formées par l'expression de PABPN1 ne recrutaient pas d'autres protéines contenant un domaine polyalanine. Les résultats présentés dans le chapitre 3 nous ont permis d'établir que le domaine polyalanine n'est pas essentiel à la formation des agrégats, mais semble influencer la conformation de la partie N-terminale de la protéine, d'une manière qui altère potentiellement le passage de PABPN1 à travers la membrane nucléaire. Ces études nous ont aussi permis de démontrer qu'une augmentation du domaine polyalanine de PABPN1 entraîne une diminution de la quantité totale de PABPN1 disponible dans la cellule. Ce résultat expérimental est le premier qui supporte qu'une possible perte de fonction, au moins partielle, puisse jouer un rôle dans la DMOP.

## 4.2. Impact cellulaire de la formation des IINs et de la surexpression de PABPN1

La présence d'inclusions intranucléaires dans les fibres musculaires chez les patients atteints de la DMOP représente le seul marqueur cellulaire spécifique de la maladie (voir Chapitre 1) (Tomé *et al.*, 1980). Les autres phénomènes observés comme la présence de vacuoles bordées ou les signes de dégénération/régénération musculaires, même s'ils ne doivent pas être oubliés, ne sont pas spécifiques à la DMOP et sont observés dans d'autres conditions (Tome *et al.*, 1997). Par ailleurs, la formation d'IINs est le seul phénotype qui fut reproduit dans les différents modèles cellulaires. Les modèles souris montrent un phénotype musculaire avec des changements histologiques ressemblant à ceux observés dans la pathologie, incluant la formation d'IINs et de vacuoles bordées (Hino *et al.*, 2004 ; Davies *et al.*, 2005). La formation d'IINs dans les différents modèles est souvent associée à de la toxicité mais les mécanismes menant à cette toxicité, voir même à la formation des IINs sont encore inconnus.

### 4.2.1. Validation d'un modèle cellulaire de la DMOP

Dans l'étude présentée au chapitre 2, nous avons produit un nouveau modèle de la DMOP en utilisant des adénovirus pour exprimer PABPN1 sauvage ou mutée dans des cellules humaines. Comme pour les autres modèles publiés de la DMOP, la principale interrogation est de savoir à quel point le modèle d'expression de PABPN1 est un bon modèle d'étude de la DMOP. À ce jour, la présence d'inclusions riches en PABPN1 est le seul phénotype observable et reproductible pour définir un modèle cellulaire de la DMOP. Nous avons confirmé que l'expression de PABPN1 mutée conduisait à la formation d'IINs après 16 heures post-infection (Corbeil-Girard *et al.*, 2005 ; Sasseville *et al.*, 2006). Pour valider notre modèle, nous avons montré que les IINs formées avaient de nombreuses caractéristiques des IINs de la DMOP. Elles sont riches en PABPN1, ainsi qu'en protéines du système ubiquitine-protéasome et en chaperonnes moléculaires. De plus, elles montrent une exclusion de l'ADN et une absence de co-localisation avec le marqueur des *speckles* nucléaires SFRS2. Par ailleurs, nous avons montré que ces IINs avaient une structure filamentaire bien que celle-ci n'est pas aussi organisée que celle observée dans les IINs de la DMOP. Cette moins grande organisation, qui rappelle celle des IINs de type B (Tomé *et*

*al.*, 1989), est peut être due à la rapidité à laquelle se forment les IINs dans ces cellules, à savoir en quelques heures plutôt que plusieurs années, comme nous le supposons, dans la DMOP. De plus, nous avons aussi confirmé que les IINs formées dans notre modèle contenaient de l'ARN poly(A) par hybridation fluorescente *in situ* (FISH) avec une sonde poly(T) (données non publiées).

Les principales interrogations par rapport à la validité de notre modèle adénoviral sont de trois ordres. Premièrement, nous utilisons des cellules qui, bien que d'origine humaine, ne sont pas des lignées musculaires. À ce jour, seulement deux modèles cellulaires de la DMOP ont utilisé une lignée musculaire murine (cellules de type C2C12) pour montrer les interactions de PABPN1 avec le facteur de transcription SNW1 (Kim *et al.*, 2001) ou la diminution de facteurs myogéniques (Wang *et al.*, 2005b). Conscient de ce manque de spécificité, nous avons confirmé nos résultats, dans la mesure du possible, avec des biopsies provenant de patients atteints de la DMOP. Nous avons pu montrer ainsi la validité de notre approche en identifiant trois nouveaux constituants des IINs de la DMOP.

Par ailleurs, nous avons montré que l'expression de la forme sauvage de PABPN1 induisait la formation d'IINs très similaires à celles observées avec la forme mutée. Ce fait avait déjà été noté dans d'autres modèles cellulaires (Bao *et al.*, 2002 ; Abu-Baker *et al.*, 2003) et il souligne l'idée que la surexpression de PABPN1 plus que la mutation du domaine polyalanine est responsable de la formation des IINs. Les études *in vitro*, ainsi que la présence d'inclusions de type DMOP dans des neurones sains de souris, ont montré que la forme sauvage de PABPN1 a une forte tendance à l'agrégation même dans des conditions physiologiques (Scheuermann *et al.*, 2003 ; Berciano *et al.*, 2004). Cependant dans l'hypothèse où les IINs sont responsables de l'apparition de la maladie, la formation d'inclusions par l'expression de la forme sauvage de la protéine ne remet pas en cause les résultats obtenus.

Finalement, l'expression de PABPN1 et la formation d'IINs sont associées à de la toxicité cellulaire dans plusieurs modèles (Bao *et al.*, 2002 ; Abu-Baker *et al.*, 2003 ; Bao *et al.*, 2004 ; Abu-Baker *et al.*, 2005 ; Wang *et al.*, 2005b). Cependant, une observation de notre modèle adénoviral sur plusieurs jours révèle une faible toxicité et un taux d'apoptose peu élevé comparé à des cultures contrôles (Sasseville *et al.*, 2006) ou aux autres modèles. La différence observée peut être expliquée par l'utilisation d'adénovirus non-réplicatifs qui

sont moins dommageables pour les cellules que des techniques standards de transfection comme la lipofectamine ou le phosphate de calcium. De plus, les cellules COS7 ou Hela utilisées dans les précédents modèles sont peut-être plus sensibles à l'apoptose que les cellules A549. Par ailleurs, nous avons utilisé des constructions exprimant PABPN1 sans marqueur ou avec un marqueur Histidine (*His-tag*, 6 histidines consécutives), ce qui est peut-être moins toxique que la fusion d'une molécule de GFP (d'environ 27kDa) à une extrémité de PABPN1. Pour appuyer ces hypothèses, les études présentées dans le chapitre 3, qui utilise la surexpression de PABPN1 fusionné à la GFP dans des cellules Hela ou des cellules COS7 montrent bien plus de toxicité que ce que nous avons observé avec notre modèle adénoviral.

#### 4.2.2. Modification du profil d'expression

Grâce aux différentes études sur *GeneChip* Affymetrix, nous avons identifié 202 gènes dont l'expression était modifiée de manière reproductible, par un facteur supérieur ou égal à 2,5 par l'expression de PABPN1 et la formation des IINs. Parmi ces gènes, 102 sont surexprimés et 100 sont sous-exprimés. En plus de l'identification de gènes candidats pour l'étude de la DMOP, nous avons établi que l'expression de la forme sauvage (10A1a) ou mutée (13A1a) de PABPN1 conduisait au même profil d'expression confirmant ainsi la similarité du phénotype observé en microscopie à fluorescence. Par la suite, la modulation du nombre de particules virales moyen par cellules (pfu/cellule) a permis de confirmer que les résultats obtenus étaient dus à l'expression exogène de PABPN1 de manière dose dépendante. Il est difficile de différencier si les modifications du profil d'expression sont dues à l'expression intrinsèque de PABPN1, à la formation des IINs ou aux deux phénomènes concomitants. Nous avons tenté de répondre à cette question en utilisant de la tétracycline qui permet d'éteindre l'expression de notre construction. Les résultats obtenus montraient une variation du profil d'expression en présence du composé. Cependant pour répondre à cette question, il serait intéressant d'étudier l'impact de mutations qui empêchent l'agrégation de la protéine (ex: délétion dans domaine de liaison à l'ARN ou dans le domaine de type *coil-coiled*) sur le profil d'expression des cellules (Tavanez *et al.*, 2005 ; Chartier *et al.*, 2006 ; Messaed *et al.*, 2007). De même, étudier l'impact de la formation d'IINs non induite par PABPN1 mais par une autre protéine (Li *et al.*, 2007) sur le profil

d'expression des cellules permettrait d'identifier des gènes qui sont modulés par la seule présence d'inclusions. Actuellement, il est difficile de confirmer la validité de nos résultats en les comparant à d'autres études. Notre étude est actuellement la seule étude d'expression publiée pour un modèle de la DMOP ou une autre maladie à expansion de domaine polyalanine. Dans le cadre des maladies à expansion de domaine polyglutamine, plusieurs études du même genre ont été effectuées (Kita *et al.*, 2002 ; Marubuchi *et al.*, 2005 ; Abou-Sleymane *et al.*, 2006 ; Apostol *et al.*, 2006). Cependant, ces études ont été réalisées en utilisant des lignées cellulaires murines, en particulier la lignée neuronale PC12. Les résultats obtenus sont donc difficilement comparables aux nôtres. Toutefois, Kita *et al.*, puis Apostol *et al.*, ont pu également identifier les gènes *RBM3*, *FKBP1A* et *HMGB2* dont l'expression est modulée en réponse à la surexpression d'une forme mutée de la HD (Huntingtin) (Chan *et al.*, 2002 ; Kita *et al.*, 2002 ; Apostol *et al.*, 2006). Finalement une équipe, comparant les profils d'expression entre des souris atteintes par différentes dystrophies et des souris contrôles ont montré une surexpression de *RNU17D* chez les souris atteintes de dystrophies sévères (Turk *et al.*, 2006). Ces observations laissent supposer que peut-être des mécanismes communs sont mis en place dans plusieurs de ces pathologies.

#### 4.2.2.1. Surexpression des facteurs de maturation de l'ARNm

Les analyses des études d'expression montrent que presque 60% des gènes surexprimés codent pour des protéines nucléaires. De plus, une augmentation significative du nombre de gènes codant pour des facteurs de maturation des ARN messagers est observée. Parmi eux, *HSPA1B* (*HSP70*) et *HNRPA1* ont été identifiés. La présence de ces deux gènes dans le groupe des gènes surexprimés est intéressante puisque les deux protéines pour lesquels ils codent ont été identifiées dans les IINs de DMOP (Calado *et al.*, 2000c ; Fan *et al.*, 2003a). Suite à ces observations, nous avons émis l'hypothèse qu'une majorité des gènes surexprimés voyaient leur expression modifiée suite à la séquestration de leur protéines dans les IINs. Des études d'immunofluorescence ont permis de valider cette hypothèse puisque toutes les protéines nucléaires testées ont été trouvées dans les IINs de notre modèle (*HNRPA1*, *SFRS3*, *CUGBP1*, *S100P*, *FKBP1A*, *PRC1*, *HSPA1B* et *HMGB2*), puis cinq d'entre elles ont été confirmées dans les IINs de la maladie (*CUGBP1*,

SFRS3, FKBP1A, HSPA1B et HNRPA1). La composition des inclusions et l'impact de la séquestration de protéines au sein des IINs sont discutés de manière plus approfondie dans la section 4.3. Cette hypothèse de surexpression compensatoire, bien que validée en partie, ne permet pas d'expliquer toutes les variations observées dans notre étude et nos résultats ne nous ont pas permis de révéler d'autres mécanismes pouvant expliquer ces variations d'expression. À part les protéines qui ont un domaine de liaison à l'ARN ou une fonction dans la maturation de l'ARN messenger, aucun autre candidat évident ne peut être associé à PABPN1, ses partenaires d'interactions ou sa fonction principale.

#### 4.2.2.2. Autres explications possibles les modifications observées

Plusieurs gènes dont les produits ont une fonction dans le transport vésiculaire montrent des modulations dans leur expression, comme *BIG2*, *YKT6*, *LAMP2*, *APIG1*, *RAB14*, *RAB2*, ou même *SERP1* qui code pour une protéine liée à la réponse au stress du réticulum endoplasmique. Les modifications d'expression de ces gènes pourraient refléter l'activation des processus autophagiques comme ceux observés pour la dégradation des séquences polyalanines (Ravikumar *et al.*, 2002) ou refléter l'apparition des vacuoles bordées dans la pathologie. Il se peut aussi que ces modulations soient caractéristiques des cellules A549. En effet, ces cellules sont issues de tissus épithéliaux pulmonaires dont le rôle, entre autres, est de sécréter du surfactant pour les voies respiratoires. Les modifications observées pour ces gènes pourraient indiquer une perturbation de cette fonction. Les mécanismes menant aux modifications de l'expression de ces gènes sont encore à découvrir. Par ailleurs, parmi les gènes dont l'expression est modifiée dans notre étude, tous les gènes codant pour des protéines de réponse aux interférons sont sous-exprimés. Les mécanismes menant à une telle diminution sont inconnus, mais ces observations pourraient suggérer qu'une voie commune d'activation de ces facteurs est inhibée par l'expression de PABPN1 et la formation d'IINs. Finalement, l'expression de nombreux gènes qui ont un lien avec la régulation du cycle cellulaire est modifiée dans nos études. Des gènes comme *PRC1* (dont la protéine est séquestrée dans les IINs de notre modèle), *FOXM1*, *TACC3*, *BUB1B*, *CCNA2* ou *DEEPEST* ont été montrés comme étant liés à la phase G2/M (Chang *et al.*, 2001 ; Wang *et al.*, 2003 ; Lampson *et al.*, 2005 ; Wang *et al.*, 2005a ; Kim *et al.*, 2006) et sont surexprimés dans notre modèle. Une autre étude

utilisant le même modèle adénoviral a montré un ralentissement de croissance pour les cellules exprimant la forme sauvage ou mutée de PABPN1, sans pour autant montrer une augmentation significative des niveaux d'apoptose (Sasseville *et al.*, 2006). Cette étude suggère que le cycle cellulaire pourrait être affecté par l'expression de PABPN1 et la formation des IINs. Même si le muscle squelettique est un tissu post-mitotique, sa régénération ou sa croissance se fait grâce à l'activation et la division des cellules satellites. Ainsi une étude approfondie de l'impact de l'expression de PABPN1 sur la croissance et le cycle cellulaire, en utilisant par exemple la microscopie en temps réelle permettant de suivre l'évolution de cellules individuelles sur plusieurs jours, pourraient s'avérer utile pour étudier si la présence de PABPN1 mutée dans les cellules souches musculaires peut avoir un impact sur leur croissance et la régénération musculaire.

#### **4.3. Composition des IINs et conséquences possibles de leur formation**

Les IINs observées dans la DMOP sont constituées de filaments tubulaires qui ont une structure très organisée (cf. Chapitre 1). PABPN1 a été identifié comme un constituant majeur de ces IINs. Par ailleurs, ces inclusions contiennent aussi des éléments du système ubiquitine-protéasome, des chaperonnes moléculaires et de l'ARN polyadénylé. Des études ont montré que les IINs contenaient aussi le facteur d'épissage HNRPA1 et la poly(A) polymérase (Fan *et al.*, 2003a ; Tavanez *et al.*, 2005). Même si la présence de PABPN1 semble évidente, si on considère que l'expansion du domaine polyalanine provoque une modification de structure favorisant ainsi son agrégation (voir la section 1.4.2.1.), les causes de la présence des autres facteurs restent incertaines. Les études décrites dans le chapitre 2 ont permis d'identifier trois nouveaux constituants des IINs de la DMOP: CUGBP1, SFRS3 et FKBP1A. La présence de ces différents facteurs dans les IINs soulève ainsi de nombreuses questions quant à la formation de ces inclusions.

##### **4.3.1. Recrutement des chaperonnes et du système ubiquitine-protéasome**

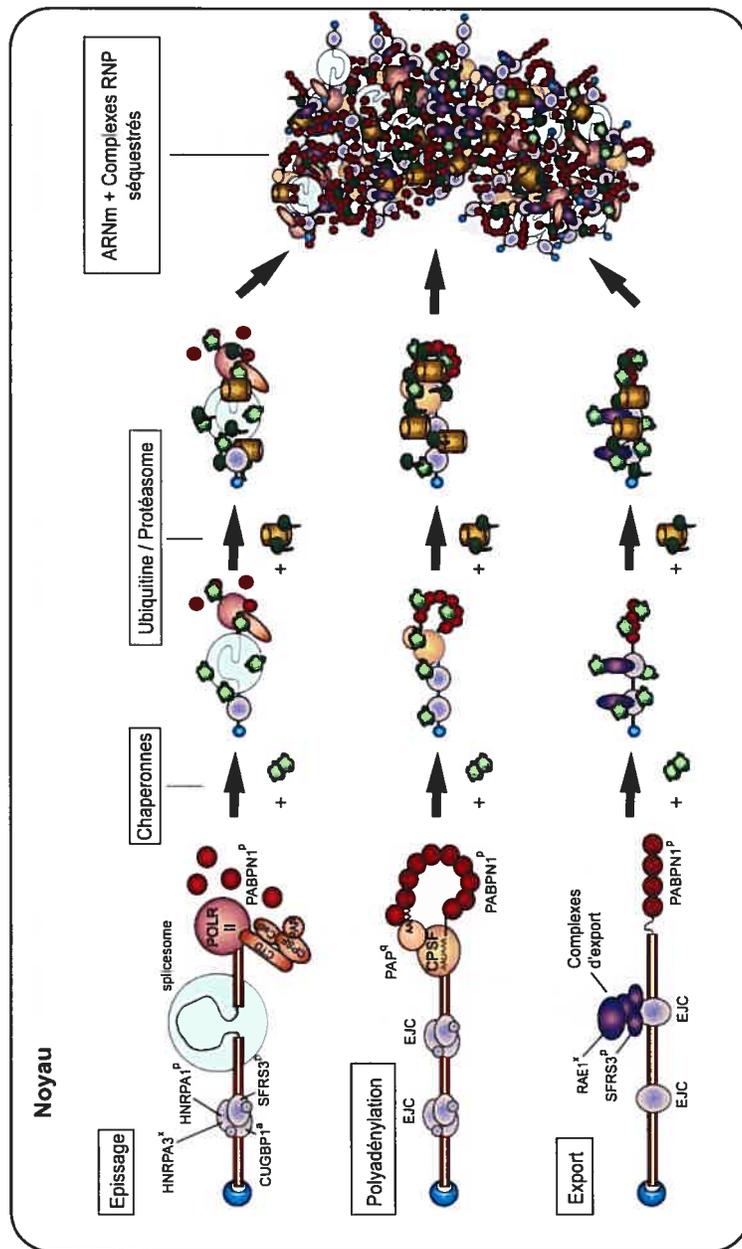
La présence des chaperonnes moléculaires HSPA1B ou HSP40 suggère qu'un problème de conformation est effectivement à l'œuvre dans la formation des IINs de la DMOP et des différents modèles de la maladie. Par ailleurs, la présence d'ubiquitine ou de

sous unités du protéasome confirme l'idée que les cellules essayent de dégrader ces inclusions sans y parvenir. Plusieurs études ont montré que l'expression ou l'induction de chaperonnes moléculaires comme HSPA1B (Bao *et al.*, 2002 ; Abu-Baker *et al.*, 2003 ; Bao *et al.*, 2004 ; Wang *et al.*, 2005b), ou encore l'utilisation de drogues comme le Congo Red ou la doxycycline (Bao *et al.*, 2004 ; Davies *et al.*, 2005 ; Davies *et al.*, 2006b) permettait de réduire le nombre d'agrégats dans les cellules. Notre modèle nous a aussi permis de confirmer cette observation en montrant que l'expression de PABPN1 et la formation des IINs induisait une surexpression de la chaperonne HSPA1B et de l'ubiquitine ligase ITCH. Par ailleurs, FKBP1A, dont le gène est aussi surexprimé dans notre modèle, colocalise avec PABPN1 dans les IINs de notre modèle et de la DMOP. Comme cette protéine est une isomérase peptidyl-prolyl, elle pourrait aussi agir comme une chaperonne moléculaire spécifique dans la DMOP. Puisque ces mécanismes de conformation et de dégradation des protéines sont toujours en activité dans la cellule, il serait intéressant de regarder si la séquestration de ces facteurs dans les IINs peut avoir un impact sur l'accumulation d'autres protéines défectueuses, comme cela a été suggéré pour les inclusions formées dans les maladies polyglutamine (Michalik *et al.*, 2003 ; Gatchel *et al.*, 2005). Par ailleurs, l'observation des IINs dans la DMOP n'a été réalisée que chez des patients dont les symptômes étaient déjà apparus, donc chez des personnes relativement âgées. Il se peut que le vieillissement du muscle squelettique et l'affaiblissement des fonctions des chaperonnes et du protéasome dû à l'âge (Fan *et al.*, 2003b) puissent contribuer à la formation des IINs ou à l'accélération du phénotype.

#### **4.3.2. Les IINs séquestrent des facteurs de maturation des ARNm**

La présence de facteurs de polyadénylation ou de maturation des ARN messagers dans les IINs est intéressante puisqu'elle permet de placer la formation des IINs dans le contexte de la fonction première de PABPN1. En plus de stimuler la poly(A)-polymérase en l'attachant à l'ARN messenger, PABPN1 se fixe à la queue poly(A) nouvellement formée. PABPN1 fait la navette entre le noyau et le cytoplasme ce qui suggère qu'il accompagne l'ARNm jusqu'à sa sortie du noyau où il doit être remplacé par PABPC1 (Calado *et al.*, 2000b). Par ailleurs, une étude a montré que PABPN1 interagit avec la RNA polymérase II et ce dès le début de la transcription (Bear *et al.*, 2003). Toutes ces observations suggèrent

fortement que PABPN1 est présent à toutes les étapes de la formation des ARNm, de l'initiation de la transcription jusqu'au début de la traduction. Or, il apparaît de plus en plus clair que toutes les étapes de la maturation des ARNm sont liées et concomitantes (Proudfoot, 2004 ; Vinciguerra *et al.*, 2004 ; Bentley, 2005). De plus, les études récentes sur la dégradation nucléaire des ARNm laissent supposer que PABPN1 pourrait bien aussi être impliqué dans ce mécanisme (Chang *et al.*, 2007). Or, nous et d'autres équipes avons montré que plusieurs des protéines impliqués dans ces complexes se retrouvaient dans les IINs de la DMOP ou de ses modèles, dont SFRS3 et HNRPA1. SFRS3 est un facteur d'épissage qui a aussi un rôle dans l'export des ARNm en association avec SFRS7 et NXF1 (Huang *et al.*, 2001 ; de la Mata *et al.*, 2006 ; Hargous *et al.*, 2006). HNRPA1 est également un facteur de maturation des ARNm, qui fait la navette entre le noyau et le cytoplasme (Pinol-Roma *et al.*, 1992) et qui aurait un rôle antagoniste à celui des protéines SFRS dans l'épissage alternatif des transcrits (Expert-Bezancon *et al.*, 2004 ; Guil *et al.*, 2007). Ceci nous a amené à formuler l'hypothèse que PABPN1, du fait de sa mutation, et de sa fonction entraînait avec lui dans les IINs des complexes ribonucléo-protéiques (complexes RNP) à différents stades de la maturation des ARNm ou de leur dégradation. Cette idée est supportée par l'observation de la présence d'ARN poly(A) dans les IINs suggérant ainsi la présence d'ARN messenger lié à PABPN1 mais aussi par l'observation que les IINs se forment essentiellement à proximité des *speckles* nucléaires. Ce compartiment nucléaire est composé de nombreux facteurs nécessaires à la transcription et la maturation des ARNm (Spector, 1993 ; Lamond *et al.*, 2003). PABPN1 y est localisé lorsqu'il est lié à de l'ARN (Calado *et al.*, 2000a). Il serait intéressant, pour confirmer cette hypothèse, de tester la présence de plusieurs protéines de ces différents complexes dans les IINs. Cela pourrait permettre de déterminer si un mécanisme est particulièrement touché par la formation des IINs ou permettre d'établir à quelle étape de la maturation des ARNm, la mutation de PABPN1 a le plus d'impact. Notre modèle nous a déjà permis d'identifier trois composants de ces IINs, et nous a donné plusieurs candidats potentiels qui pourraient contribuer à ce phénomène (Figure 29).



**Figure 29 ; Les IINs séquestrent des protéines nucléaires provenant des complexes RNP au cours de la maturation des ARNm.** Dans ce modèle de séquestration de protéines par les IINs, la surexpression de PABPN1 sauvage ou muté induit une mauvaise conformation de complexes RNP lié à la maturation ou l'export des ARNm. Ces complexes sont liés par les chaperonnes pour améliorer leur conformation puis par le système ubiquitine/protéasome pour les dégrader. Ces complexes se retrouvent par la suite séquestrés dans les IINs. (p) Protéines que nous avons identifiées dans les IINs (q) protéine qui a été identifiée par une autre équipe dans les IINs (x) protéines dont le gène est surexprimé dans notre étude d'expression.

### 4.3.3. Les IINs séquestrent CUGBP1

L'observation que CUGBP1 se trouve dans les IINs est d'intérêt car ce facteur qui se lie spécifiquement aux répétitions de type (CUG) a longtemps été considéré comme l'acteur principal des mécanismes physiopathologiques de la dystrophie myotonique de type 1 et de type 2 (DM1, MIM 160900; DM2, MIM 602668). La DM1 est une maladie causée par une extension de triplet (CTG) dans la région non traduite en 3' (3'UTR) dans le gène codant pour la Dystrophia Myotonica Protein Kinase (DMPK). La DM2 est causée par une expansion de séquences répétées (CCUG) dans l'intron 1 du gène codant pour la Zinc-finger protein 9 (ZNF9). Les deux formes sont des maladies dominantes et partagent de nombreuses caractéristiques cliniques, incluant une myotonie, une faiblesse et atrophie musculaire, des anomalies cardiaques, des problèmes de cataractes et une résistance à l'insuline. Une forme congénitale plus sévère a été décrite pour la DM1 avec une atteinte spécifique du système nerveux central et un retard mental. Les maladies sont caractérisées, au niveau cellulaire, la formation d'agrégats (appelé foci nucléaires) (Davis *et al.*, 1997) et par des troubles d'épissage dans plusieurs gènes (dont le gène du récepteur à l'insuline, du canal chlore CNCL1 ou de la troponine T cardiaque) (Osborne *et al.*, 2006). Le mécanisme physiopathologique proposé est un gain de fonction induit par l'ARNm muté (Ranum *et al.*, 2004). En effet, l'expansion du nombre de répétition induirait des interactions aberrantes avec des protéines liant l'ARN telles que les protéines de la famille de CLEF (incluant CUGBP1) et celle de la famille des Muscleblind (MBNL). Les mutations, qui peuvent atteindre plusieurs milliers de répétitions, conduisent à l'accumulation des transcrits mutés dans le noyau sous la forme de "foci" nucléaires qui recrutent les protéines MBNL (Ho *et al.*, 2005b). Même si CUGBP1 n'est pas recrutée dans ces inclusions, son activité est augmentée (Timchenko *et al.*, 2001). Plusieurs études ont montré que les deux familles de protéines agiraient de manière antagoniste pour réguler l'épissage alternatif des pré-ARNm (Kanadia *et al.*, 2003 ; Ho *et al.*, 2004 ; Timchenko *et al.*, 2004b ; Ho *et al.*, 2005a). Dans la DMOP, CUGBP1 se trouve recrutée dans les IINs formées. Il est probable qu'une modification de son activité puisse avoir des conséquences sur l'épissage de plusieurs transcrits et, éventuellement puisse expliquer l'atteinte spécifique des muscles squelettiques dans la maladie. Il serait donc intéressant de tester dans le cadre de la DMOP, l'épissage alternatif des transcrits qui sont impliqués dans la dystrophie myotonique, mais aussi de

regarder l'activité de CUGBP1 dans nos modèles d'expression de PABPN1. Il pourrait s'avérer également intéressant de tester la présence des protéines MBNL dans les IINs formées par la surexpression de PABPN1. Par ailleurs, les études effectuées dans le cadre de la dystrophie myotonique montrent clairement que des mécanismes pathologiques induits par l'ARN sont possibles. Les expansions de triplet observées dans la DMOP ne sont pas, et de loin, aussi importantes que celles qui sont observées dans les DM de type 1 et 2. Cependant PABPN1 est une protéine ubiquitaire et exprimée à un niveau relativement élevé dans toutes les cellules. Il semble raisonnable qu'une augmentation (GCG) ou (GCA) puisse aussi augmenter les interactions avec des protéines qui lient spécifiquement ce genre de séquences.

#### 4.3.4. Composition en ARN messagers des IINs

Deux études publiées ont décrit que les IINs de la DMOP et d'un modèle cellulaire de la DMOP contenaient de l'ARN-poly(A) (Calado *et al.*, 2000c ; Tavanez *et al.*, 2005). Ces études laissent supposer que des ARN messagers se trouvent recrutés dans les IINs. Des études, réalisées dans notre laboratoire, ont également confirmé la présence d'ARN poly(A) dans les inclusions formées dans nos différents modèles d'expression de *PABPN1*. La composition de ces ARN-poly(A) n'est pas connue, ni même si ces transcrits sont entiers ou juste des séquences poly(A) liées à du PABPN1. L'équipe du Dr. Carmo-Fonseca a regardé par hybridation *in situ* la localisation du transcrit de la  $\beta$ -actine et n'ont pas réussi à le détecter dans les IINs (Tavanez *et al.*, 2005). Nos études préliminaires utilisant des candidats identifiés grâce à notre étude d'expression (présentée au chapitre 2) et des techniques de FISH, ne nous ont pas permis de déterminer un transcrit spécifique à l'intérieur des IINs bien que l'hybridation d'une sonde poly(T) donne un très fort signal. Ces études, encore incomplètes, ne permettent pas de conclure que des transcrits complets sont recrutés dans les IINs. Par contre, nos résultats combinés à ceux publiés par Tavanez *et al.* nous amènent à plusieurs autres conclusions quant à l'absence de signal : soit la technique de FISH n'est pas assez sensible pour détecter un transcrit spécifique dans les IINs, soit les transcrits sont, au moins, partiellement dégradés et ainsi difficiles à identifier, soit nous n'avons pas encore trouvé les bons transcrits à regarder. Il serait pourtant primordial de comprendre la composition en ARNm des IINs, elle nous permettrait peut-être de

comprendre les mécanismes de formation de ces inclusions, ou alors l'atteinte spécifique des muscles squelettiques. Par ailleurs, les IINs se forment toujours à proximité des *speckles* nucléaires, il serait intéressant en utilisant des lignées stable inductible exprimant à haut niveau un gène autre que *PABPN1*, d'étudier si son transcrit se retrouve dans les IINs formées par *PABPN1* et ainsi de regarder si ces IINs se forment à proximité de sites très actifs de transcription.

#### 4.3.5. Les IINs : toxiques, protectrice ou les deux ?

La principale interrogation concernant la présence des IINs dans la DMOP mais aussi dans les maladies à expansion de domaine polyglutamine, est de savoir si elles sont à l'origine de la toxicité ou si elles représentent un moyen par lequel la cellule se protège contre des protéines toxiques (Brais, 2003 ; Orr *et al.*, 2007). Dans le cadre de la DMOP, les différentes études effectuées sur des modèles cellulaires ou animaux montrent que la formation des IINs est associée à de la toxicité (revue récemment par (Abu-Baker *et al.*, 2007)). L'utilisation de drogues ou l'expression des chaperonnes moléculaires permettent de réduire le nombre de cellules contenant des IINs et de diminuer la toxicité. Ces observations ont été utilisées pour souligner l'importance des IINs dans l'apparition de la toxicité. Par ailleurs, la présence de plusieurs facteurs potentiellement importants pour la cellule dans les IINs, souligne que ces inclusions, de part leur contenu, peuvent perturber le comportement cellulaire en réponse à un stress et, ultimement aboutir à la mort de la cellule.

Cependant les résultats que nous présentons dans le chapitre 3 montrent qu'une forme non agrégative de *PABPN1* (avec une domaine de 30 ou 40 alanines) induit une diminution plus importante de la survie cellulaire que les formes de *PABPN1* qui amènent à la formation d'IINs. Ces résultats suggèrent que la toxicité observée pourrait être due à un mécanisme indépendant des IINs. Récemment, l'équipe du Dr. Rouleau a montré que les cellules qui avaient une forte concentration de *PABPN1* sans former d'IINs survivaient moins longtemps en culture comparé aux cellules qui formaient des IINs (Messaed *et al.*, 2007). Ces observations supportent ainsi l'hypothèse d'une toxicité indépendante de la présence d'IINs dans les cellules. Il apparaît néanmoins que, même si la formation d'inclusions n'est pas nécessaire pour observer de la toxicité, *PABPN1* doit cependant être

nucléaire (Abu-Baker *et al.*, 2005). Ce résultat laisse supposer que la toxicité pourrait être due à l'interaction de PABPN1 avec un autre facteur nucléaire. Par ailleurs, le rôle des IINs dans les mécanismes de toxicité cellulaire déjà été remis en question par l'observation d'inclusions de type DMOP dans des neurones sécréteurs d'oxytocine pendant les phases de sécrétion maximale de l'hormone (Berciano *et al.*, 2004). Ces inclusions riches en PABPN1 possèdent une structure fibrillaire, contiennent de l'ARN-poly(A), des composants du système ubiquitine-protéasome et ne semblent pas compromettre la cellule. L'ensemble de ces résultats suggère que la présence d'IINs riches en PABPN1 n'est pas forcément toxique pour les cellules mais montrent également qu'une forte expression de PABPN1 est gérée par la cellule en formant une inclusion.

Par ailleurs, cette étude soulève une autre conclusion importante. En effet, elle démontre que l'expression de la forme sauvage de PABPN1 dans un environnement et à des niveaux physiologiques permet la formation d'IINs qui sont similaires à celles observées dans la DMOP. Cette observation confirme les résultats que nous avons présentés au chapitre 2 concernant la formation d'IINs par l'expression de la forme sauvage de PABPN1 dans notre modèle adénoviral. Ces IINs sont similaires à celles obtenues avec la forme mutée de la protéine et induisent le même profil d'expression. Donc, il apparaît que si le rôle des IINs dans les mécanismes physiopathologiques de la DMOP n'est pas encore certain, l'impact de la mutation du domaine polyalanine sur la formation de ces IINs ou sur l'évolution de la pathologie reste encore aussi incertain.

#### **4.4. Le domaine polyalanine de PABPN1**

Comme il a été décrit dans le premier chapitre de cette thèse, PABPN1 est une protéine constituée de plusieurs domaines. Le domaine polyalanine de PABPN1 ne peut pas être encore appelé "domaine" au sens strictement biochimique, c'est-à-dire, une partie de la protéine qui dont la conformation est indépendante du reste de la protéine ou dont la fonction est bien établie. Ce que nous savons, par contre, c'est qu'une expansion dans cette région conduit à une dégénérescence des muscles squelettiques et à la formation d'agrégats chez les patients atteints de la DMOP. Les différents modèles décrits jusqu'à présent dans la littérature et dans cette thèse, n'ont pas réussi à établir de phénotype entièrement différent

entre l'expression de la forme sauvage de PABPN1 et celles des formes qui ont une expansion de domaine polyalanine. L'étude présentée dans le chapitre 3 avait donc pour but d'identifier un rôle de ce domaine en testant de grandes mutations et ainsi mieux comprendre l'impact des mutations observées chez l'homme sur le comportement et la fonction de PABPN1.

#### **4.4.1. Impact du domaine polyalanine sur l'agrégation de PABPN1.**

Toutes les études concernant l'agrégation des séquences polyalanines réalisées *in vitro*, *in silico* ou dans des modèles cellulaires suggèrent que l'expansion d'une séquence polyalanine peut amener un changement de conformation et ainsi augmenter l'agrégation des protéines qui contiennent de tels domaines (Blondelle *et al.*, 1997 ; Brais, 2003 ; Davies *et al.*, 2006a). Il fut donc proposé que le domaine polyalanine puisse servir de domaine d'interactions entre protéines. Cette hypothèse est appuyée par le fait que toutes les protéines impliquées dans des maladies à expansion de domaine polyalanine peuvent former des inclusions (nucléaires et/ou cytoplasmiques) quand elles sont surexprimées dans des modèles cellulaires ou que leur domaine polyalanine est augmenté (Albrecht *et al.*, 2005 ; Shoubridge *et al.*, 2007). Cependant l'idée que les changements du seul domaine polyalanine soient responsables de l'agrégation de ces protéines est remise en question par plusieurs observations. Comme nous l'avons montré dans les différentes études présentées dans cette thèse, PABPN1 dans sa forme sauvage est capable de former des IINs similaires à celles qui sont formées par l'expression des formes mutées (13Ala ou 17Ala). Par ailleurs, nous avons montré au chapitre 3 que l'expression de PHOX2B dans sa forme sauvage induisait la formation d'IINs riches en composant du système ubiquitine-protéasome. Une autre équipe a également observé que ARX dans sa forme sauvage pouvait former des IINs quand elle était exprimée dans un modèle cellulaire (Nasrallah *et al.*, 2004). Tous ces résultats suggèrent que ces protéines qui possèdent un (ou plusieurs) domaine polyalanine ont une forte tendance à l'agrégation même si rien n'indique que cela soit effectivement relié au domaine polyalanine. En fait, nos résultats présentés dans le chapitre 3 de co-expression de plusieurs protéines contenant un domaine polyalanine suggèrent fortement que le domaine polyalanine n'est pas un domaine d'interaction entre protéines. Cette

hypothèse avait également été proposée pour les protéines contenant un domaine polyglutamine et n'a cependant pas été confirmée (Michalik *et al.*, 2003).

Dans le cadre de l'étude de PABPN1, le rôle du domaine polyalanine sur son agrégation reste confus. En effet, les résultats présentés au chapitre 3 avec l'expression de PABPN1-0Ala montrent clairement que le domaine polyalanine n'est pas essentiel à la formation d'inclusions. Ces résultats viennent appuyer les études publiées précédemment par Tavanez *et al.*, les études de doubles hybrides chez la levure publiées par Fan *et al.* ainsi que les études *in vitro* de Kuhn *et al.* montrant que l'oligomérisation de PABPN1, que ce soit en présence d'ARNm ou non, se fait grâce à la moitié C-terminale de la protéine, incluant le motif *coil-coiled*, le domaine de liaison à l'ARN et la région riche en arginines (Fan *et al.*, 2001 ; Kuhn *et al.*, 2003 ; Tavanez *et al.*, 2005). Même si l'impact de l'expansion du domaine polyalanine est indéniable puisqu'il conduit à la pathologie, le fait que l'expression de la forme sauvage de PABPN1 conduise au même phénotype que la forme mutée gêne considérablement l'étude des modifications engendrées par cette expansion. Les études publiées par l'équipe du Dr. Schwarz montrent, *in vitro*, que la partie N-terminale de PABPN1 (a.a. 1-145) permet la formation de structures fibrillaires de type amyloïde. L'expansion du domaine polyalanine à 17Ala conduit à une formation plus rapide de ces structures (Scheuermann *et al.*, 2003). Ils ont également montré que les agrégats formés par la forme mutée étaient plus résistants à la solubilisation (Lodderstedt *et al.*, 2007). Par ailleurs, nos études présentées au chapitre 3 montrent clairement que l'expansion du domaine polyalanine à plus de 24 alanines réduit la formation d'IINs dans les cellules. Ce phénomène semble être dépendant de la taille de l'expansion. En effet, l'expression de PABPN1-40Ala induit un phénotype très marqué avec la co-localisation importante de PABPN1 avec SFRS2 dans les *speckles* nucléaires. En revanche, l'expression de la forme contenant 25Ala conduit à un phénotype plus intermédiaire avec une co-localisation partielle avec SFRS2 et une toxicité relative. L'ensemble de ces observations suggère que même si le domaine polyalanine ne semble pas jouer un rôle dans l'oligomérisation de PABPN1, il semble néanmoins qu'il ait un impact dans son agrégation. Comme nous l'avons montré, il est peu probable que ce rôle se fasse par des interactions entre domaines polyalanines. Par conséquent, plusieurs hypothèses peuvent être soulevées afin d'expliquer les modifications observées : par exemple, le domaine polyalanine induirait une

conformation de la protéine, essentielle pour une interaction avec une autre protéine dans le cadre d'une autre fonction que la polyadénylation. Pour tester cette idée, il serait d'intérêt de connaître les partenaires d'interactions de PABPN1. Des études de doubles hybrides chez la levure ont déjà été effectuées (Fan *et al.*, 2001 ; Fan *et al.*, 2003a) mais des études d'immuno-précipitation pourraient peut-être nous permettre d'identifier de nouvelles protéines qui interagissent avec PABPN1 et spécifiquement avec son domaine polyalanine.

#### 4.4.2. Impact du domaine polyalanine sur la conformation de PABPN1

À ce jour, aucune information sur la structure tridimensionnelle de PABPN1 n'a été publiée. Plusieurs équipes, dont celle du Dr. Wahle, qui fut la première à identifier et caractériser PABPN1 (Wahle, 1991), ont essayé sans succès de purifier et cristalliser la protéine. PABPN1 agrège trop rapidement *in vitro* pour pouvoir être étudié dans sa forme complète (Scheuermann *et al.*, 2003). Certains auteurs ont suggéré que le domaine polyalanine, de part les propriétés des résidus alanines, forme une poche hydrophobe à l'intérieur de la protéine, structurant ainsi toute la protéine (Forood *et al.*, 1995 ; Blondelle *et al.*, 1997). Les résultats que nous présentons dans le chapitre 3 et que nous avons discutés dans la section précédente, montrent bien que des perturbations importantes du domaine polyalanine de PABPN1 ont un impact majeur sur le comportement de la protéine, aussi bien sur son agrégation que sur sa localisation. L'ensemble de ces observations souligne l'importance du domaine polyalanine et de la conformation qu'il impose à la protéine. L'absence d'agrégation avec un grand domaine polyalanine peut suggérer qu'un trop grand nombre de résidus alanines empêche physiquement l'oligomérisation de PABPN1, soit au niveau du domaine de liaison à l'ARN, soit au niveau des domaines d'oligomérisation (Fan *et al.*, 2001 ; Kuhn *et al.*, 2004). Cette dernière hypothèse est soutenue par la description récente d'un anticorps qui cible spécifiquement le domaine *coil-coiled* de PABPN1 dans des cellules vivantes non fixées, bloquant ainsi la formation d'IINs (Verheesen *et al.*, 2006). Par ailleurs, l'absence du domaine n'a pas d'impact sur l'agrégation mais peut conduire à une conformation qui n'est pas reconnue par le système de transport nucléaire. En effet la localisation des agrégats formés par PABPN1-0Ala à la membrane nucléaire, ainsi que la relative absence d'ARN poly(A) laisse supposer qu'un problème lors de l'importation de PABPN1 vers le noyau est possible.

Les études que nous avons réalisées avec différentes positions du marqueur GFP sur PABPN1-0Ala apportent les premiers résultats expérimentaux montrant qu'une modification de la conformation N-terminale de PABPN1 peut avoir un impact sur sa localisation. En effet, l'ajout d'une molécule de GFP juste en amont du domaine polyalanine annule la relocalisation des inclusions à la membrane nucléaire, mais permet de restaurer un phénotype d'IINs classique. Ce phénotype d'IINs n'est cependant pas observé avec la présence d'une GFP en C-terminal de PABPN1, démontrant ainsi que la GFP n'est pas responsable directement des changements observés. Il est probable que la présence d'une large séquence protéique bien conformée avant le domaine polyalanine préserve la structure de PABPN1 même en l'absence du domaine polyalanine. En attendant de connaître la structure cristallisée de PABPN1 et la place du domaine polyalanine dans la structure tridimensionnelle de PABPN1, il serait intéressant d'étudier les changements induits par différentes longueurs de domaine polyalanine entre l'absence de domaine et la taille normale (10Ala) ou alors avec une protéine contenant 11 alanines, responsable d'une forme récessive de la maladie.

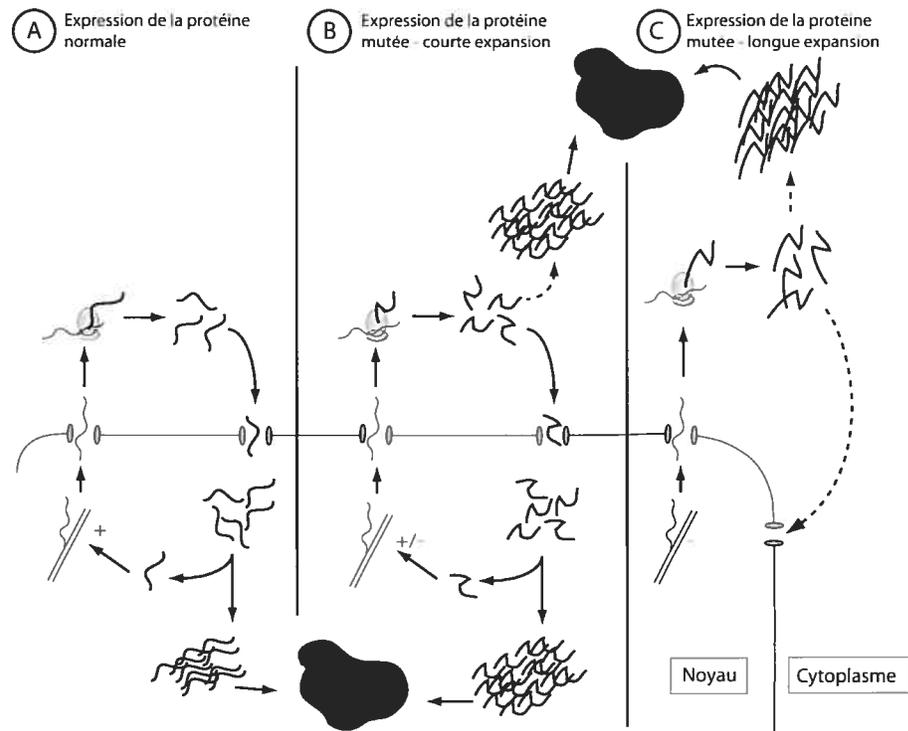
#### 4.4.3. Mécanismes communs : l'effet polyalanine?

Du fait de ses caractéristiques cliniques et pathologiques, la DMOP a toujours fait office d'exception dans le champ des maladies à expansion de domaine polyalanine. Cependant le fait que toutes les protéines impliquées dans ces maladies puissent former des agrégats quand elles sont surexprimées, dans des modèles cellulaires, soulève la possibilité d'un mécanisme pathologique commun à toutes ces conditions. En 2004, Albrecht *et al.* ont émis l'hypothèse d'un tel mécanisme commun après avoir observé que la localisation des agrégats formés par l'expression de plusieurs protéines polyalanines (HOXA13, HOXD13, SOX3 et RUNX2) était modifiée avec l'augmentation de la taille du domaine polyalanine. Les protéines agrégeaient dans le cytoplasme quand le domaine dépasse une certaine taille, avoisinant les 25 alanines (Albrecht *et al.*, 2004). Ces résultats furent confirmés par l'observation du même phénomène avec PHOX2B et partiellement avec ARX (Bachetti *et al.*, 2005 ; Shoubridge *et al.*, 2007). Ces études permirent aux auteurs d'établir un modèle de perte de fonction par séquestration de la protéine dans le cytoplasme, l'empêchant ainsi d'assurer sa fonction dans le noyau. Les auteurs supposent alors que la conformation prise

par un long domaine polyalanine provoque l'agrégation de ces protéines dès la fin de la traduction dans le cytoplasme (Figure 30).

Les résultats présentés dans le chapitre 3 démontrent que cette hypothèse n'est pas valable pour PABPN1, même quand la taille du domaine polyalanine est supérieur à 30 alanines ou supérieur au plus long domaine décrit chez l'humain (33 alanines dans une forme mutée de PHOX2B)(Trochet *et al.*, 2005). Cependant nos résultats avec PABPN1-0Ala suggèrent que les modifications du domaine polyalanines empêchent, au moins en partie, un transport correct de la protéine entre le noyau et le cytoplasme. Il se peut que l'apparition du domaine polyalanine chez les mammifères ait pour but de faciliter cette fonction (Lavoie *et al.*, 2003 ; Fondon *et al.*, 2004). Ceci implique peut-être une agrégation différente selon les processus de transport utilisés par ces protéines. Cette hypothèse ne contredit pas les études menée par Albrecht *et al.* ou par les autres équipes, puisque les agrégats formés dans ces études ne se situent pas dans les agrésomes, qui sont des inclusions cytoplasmiques observées dans de nombreuses maladies de conformations de protéines (Kopito, 2000 ; Webb *et al.*, 2004). Dans le cadre de cette hypothèse, il pourrait être intéressant de comparer les mécanisme de transports de ces protéines et identifier si elle ne partagent pas de mécanismes communs avec d'autres protéines à domaines polyalanines. Il serait aussi intéressant de vérifier si de telle expansions dans des protéines qui n'ont pas été décrite comme mutées dans des maladies peuvent provoquer le même genre de phénotype.

Par ailleurs, nous avons observé que l'augmentation du domaine polyalanine de PABPN1 induisait une diminution des quantités totales de la protéine mutée dans les cellules transfectées. Cette diminution serait due à une clairance plus importante de la protéine par un mécanisme d'autophagie. Or, les observations pathologiques pour les autres maladies à polyalanine suggèrent un mécanisme de perte de fonction pour la plupart des protéines impliquées. Il se pourrait que les expansions du domaine polyalanine augmentent la dégradation des protéines mutées à cause de la conformation anormale prise par le domaine polyalanine. Il serait donc intéressant pour répondre à cette question d'étudier l'activation des processus d'autophagie ou la réponse aux protéines mal conformées (UPR) dans le cadre des autres maladies à expansion de domaine polyalanine.



**Figure 30 : Modèle d'agrégation des protéines qui possèdent un domaine polyalanine.** Les protéines qui possèdent un domaine polyalanine peuvent former des inclusions nucléaires quand elles sont surexprimées (comme PABPN1, PHOX2B et ARX). Si il y a une expansion modérée du domaine polyalanine, les protéines forment des inclusions nucléaires et cytoplasmiques. Quand l'expansion du domaine est importante, toutes les protéines qui possèdent un domaine polyalanine et qui sont impliquées dans des maladies (à l'exception de PABPN1) forment des inclusions cytoplasmiques. La formation des inclusions nucléaires ou cytoplasmiques séquestrent les protéines impliquées les empêchant d'accomplir leur fonction. Un problème de conformation ou de transport de la protéine pourrait expliquer la sequestration cytoplasmique dans le cas d'une grande expansion.

#### 4.5. Conclusion : vers un modèle physiopathologique de la DMOP.

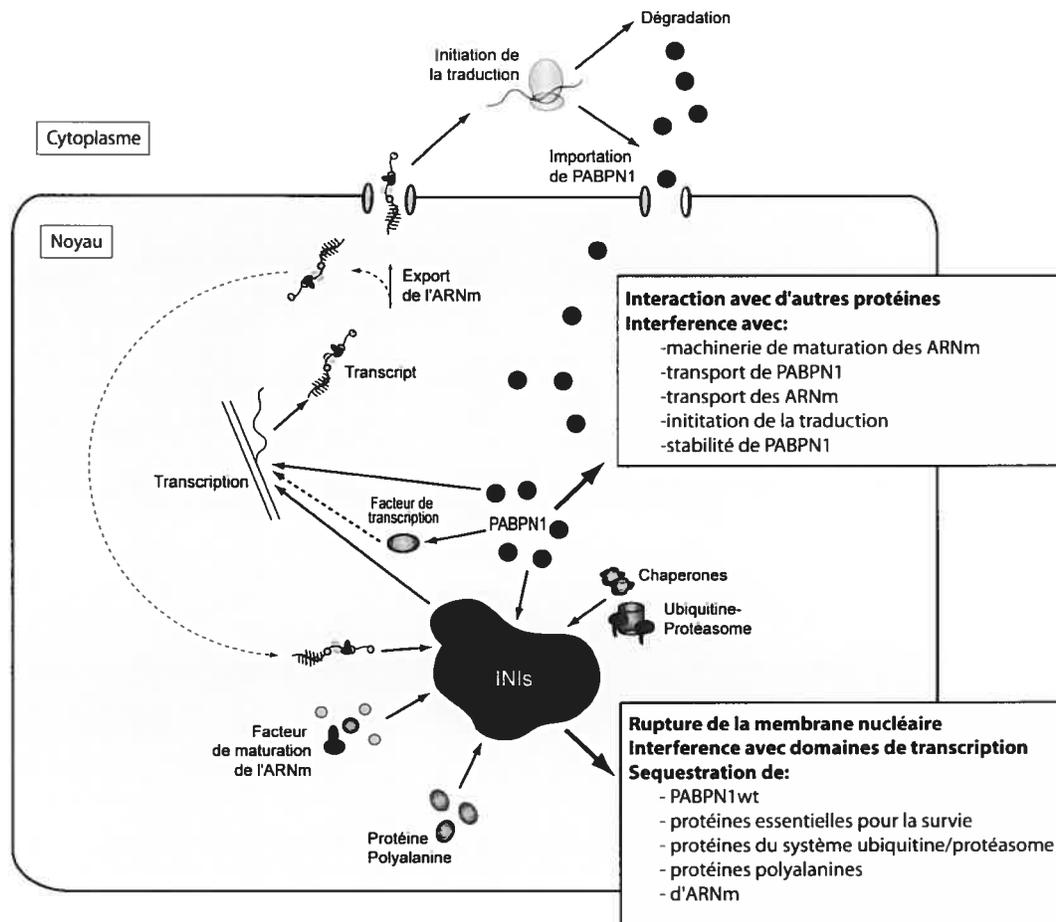
Les mécanismes pathologiques menant à l'apparition des symptômes et à l'évolution de la DMOP sont encore inconnus. Plusieurs questions restent à élucider pour une meilleure compréhension de la maladie : (1) Pourquoi les muscles squelettiques sont-ils spécifiquement atteints dans la DMOP ? (2) Pourquoi cette atteinte est-elle tardive? (3) Quel est l'impact de l'expansion du domaine polyalanine sur la structure et les fonctions de PABPN1 ? (4) Comment se forment les IINs ? Sont-elles toxiques, protectrices ou correspondent elles juste à un phénotype secondaire sans conséquence ? (5) Est ce que plusieurs mécanismes parallèles entrent en jeu dans la DMOP ? (6) Existe-t-il une "toxicité polyalanine" (7) Est-ce qu'un mécanisme commun à toutes les maladies à polyalanines est envisageable ? Les études présentées dans cette thèse de doctorat et discutées dans les sections précédentes de ce chapitre ont eu pour but d'identifier des nouvelles pistes de réponses à ces questions. Nos résultats nous ont permis d'apporter de nouveaux éléments afin de mieux comprendre la pathologie. Nous pouvons ainsi établir un modèle plus complet des mécanismes physiopathologiques de la maladie. La Figure 31 reprend ainsi les mécanismes potentiels qui sont mis en place dans la DMOP. Ces mécanismes sont de deux types: les mécanismes dépendant des IINs et ceux qui sont indépendants des IINs.

Nos études montrent que probablement les deux types de mécanismes entrent en jeu dans la DMOP. D'un côté l'expansion du domaine polyalanine de PABPN1 perturbe une fonction de la protéine. La polyadénylation ne semble pas être atteinte, donc les modifications doivent toucher une fonction secondaire inconnue. Etant donné la nature du domaine muté et son importance dans la conformation de la protéine, il est probable que la mutation agisse sur une interaction importante pour cette fonction. Cette interaction pourrait être spécifique au muscle ce qui pourrait expliquer le phénotype musculaire observé dans la maladie. Cette perturbation serait toxique pour la cellule de manière indépendante des IINs. Pour le moment aucun indice ne nous permet de privilégier un mécanisme particulier, mais les études récentes sur l'initiation de la traduction ou la dégradation nucléaire des ARNm imparfaits indiquent que ces deux systèmes comme des cibles potentielles intéressantes pour de futures études. Par ailleurs, nos résultats démontrent

qu'une perte de fonction est envisageable aussi dans la DMOP par diminution des quantités de PABPN1 disponibles. D'un autre côté, les études portant sur le rôle des IINs démontrent que leur présence n'est pas sans incidence sur la survie cellulaire. Leur formation est probablement due au changement pathologique de conformation de la protéine et a très certainement lieu dans le cadre d'une fonction de PABPN1. Nos études démontrent que ces inclusions peuvent influencer sur la disponibilité de plusieurs facteurs important pour la cellule. Nous ne connaissons pas tous les facteurs susceptibles de se trouver dans les IINs, mais les études expérimentales sur la dystrophie myotonique montrent bien comment les modifications touchant des facteurs comme CUGBP1 ou MBNL peuvent avoir une influence sur la physiologie musculaire. Nos études n'ont cependant pas réussi à confirmer un mécanisme commun à toutes les maladies polyalanine et il semble même peu probable que le domaine polyalanine favorise les interactions entre protéines qui ont un tel domaine. Cependant, si un mécanisme commun doit avoir lieu, il est plus probable que celui-ci soit au niveau de la conformation des protéines qui en contiennent, comme nous l'avons vu pour PABPN1.

L'ensemble des observations effectuées sur PABPN1 et la DMOP démontrent la complexité des mécanismes mis en jeu. Le principal enjeu des futures études fondamentales sur la DMOP sera probablement la description d'un modèle musculaire où une différence significative entre la forme sauvage et la forme mutée sera observée. Dans le cas d'animaux transgéniques, il faudrait que l'expression de PABPN1 mutée soit ubiquitaire mais inductible, en évitant la présence de marqueur à l'une ou l'autre des extrémités de la protéine. Pour les modèles cellulaires, l'utilisation de lignées musculaires humaines (primaires ou transformées) exprimant une forme mutée de PABPN1 permettrait sûrement l'obtention de résultats plus proches de la pathologie que les modèles utilisés actuellement.

Pour conclure, l'ensemble de nos résultats, malgré les limitations dues à l'utilisation des modèles cellulaires de la DMOP, ont permis de faire avancer nos connaissances sur les mécanismes pathologiques de cette dystrophie présente dans le monde entier mais si commune au Québec.



**Figure 31 : Modèle des mécanismes physiopathologiques qui conduisent à la DMOP.** Les mécanismes pathologiques supposés dans la DMOP sont de deux types. Les mécanismes dépendants des IINs et ceux indépendants des IINs. Les mécanismes dépendants des IINs concernent essentiellement la séquestration de facteurs important pour la cellule, comme des facteurs de maturation des ARNm, les protéines du système ubiquitine-protéasome ou même PABPN1 sauvage et aussi la séquestration d'ARNm. Par ailleurs les mécanismes indépendants des IINs concernent la perturbation de fonction connues ou supposées de PABPN1, sur la transcription, l'export ou l'initiation de la traduction. Il est probable que les deux types de mécanismes se fassent en parallèle. En plus, une perte de fonction par dégradation accrue de la protéine est également suggérée.

## Bibliographie

- Abou-Sleymane, G., Chalmel, F., Helmlinger, D., Lardenois, A., Thibault, C., Weber, C., Merienne, K., Mandel, J.L., Poch, O., Devys, D. et Trottier, Y.; Polyglutamine expansion causes neurodegeneration by altering the neuronal differentiation program, *Hum. Mol. Genet.* (2006) 15; 691-703.
- Abu-Baker, A., Laganriere, S., Fan, X., Laganriere, J., Brais, B. et Rouleau, G.A.; Cytoplasmic targeting of mutant poly(A)-binding protein nuclear 1 suppresses protein aggregation and toxicity in oculopharyngeal muscular dystrophy, *Traffic* (2005) 6; 766-79.
- Abu-Baker, A., Messaed, C., Laganriere, J., Gaspar, C., Brais, B. et Rouleau, G.A.; Involvement of the ubiquitin-proteasome pathway and molecular chaperones in oculopharyngeal muscular dystrophy, *Hum. Mol. Genet.* (2003) 12; 2609-23.
- Abu-Baker, A. et Rouleau, G.A.; Oculopharyngeal muscular dystrophy: recent advances in the understanding of the molecular pathogenic mechanisms and treatment strategies, *Biochim Biophys Acta* (2007) 1772; 173-85.
- Afonina, E., Stauber, R. et Pavlakis, G.N.; The human poly(A)-binding protein 1 shuttles between the nucleus and the cytoplasm, *J. Biol. Chem.* (1998) 273; 13015-21.
- Akarsu, A.N., Stoilov, I., Yilmaz, E., Sayli, B.S. et Sarfarazi, M.; Genomic structure of HOXD13 gene: a nine polyalanine duplication causes synpolydactyly in two unrelated families, *Hum. Mol. Genet.* (1996) 5; 945-952.
- Al-Shahrour, F., Diaz-Uriarte, R. et Dopazo, J.; FatiGO: a web tool for finding significant associations of Gene Ontology terms with groups of genes, *Bioinformatics* (2004) 20; 578-80.
- Albrecht, A. et Mundlos, S.; The other trinucleotide repeat: polyalanine expansion disorders, *Curr Opin Genet Dev* (2005) 15; 285-93.
- Albrecht, A.N., Kornak, U., Boddlich, A., Suring, K., Robinson, P.N., Stiege, A.C., Lurz, R., Stricker, S., Wanker, E.E. et Mundlos, S.; A molecular pathogenesis for transcription factor associated poly-alanine tract expansions, *Hum. Mol. Genet.* (2004) 13; 2351-9.
- Amiel, J., Laudier, B., Attie-Bitach, T., Trang, H., de Pontual, L., Gener, B., Trochet, D., Etchevers, H., Ray, P., Simonneau, M., Vekemans, M., Munnich, A., Gaultier, C. et Lyonnet, S.; Polyalanine expansion and frameshift mutations of the paired-like homeobox gene PHOX2B in congenital central hypoventilation syndrome, *Nat. Genet.* (2003) 33; 459-61.
- Amiel, J., Trochet, D., Clement-Ziza, M., Munnich, A. et Lyonnet, S.; Polyalanine expansions in human, *Hum. Mol. Genet.* (2004) 13 Spec No 2; R235-43.
- Amyot, R.; Hereditary, familial and acquired ptosis of late onset, *Canadian Medical Association Journal* (1948a) 59; 434-438.

- Amyot, R.; Ptosis héréditaire familial et tardif des paupières supérieures. Pharyngoplégie également héréditaire et familiales concomittante, *L'Union Médical du Canada* (1948b) 77; 1287.
- Apostol, B.L., Illes, K., Pallos, J., Bodai, L., Wu, J., Strand, A., Schweitzer, E.S., Olson, J.M., Kazantsev, A., Marsh, J.L. et Thompson, L.M.; Mutant huntingtin alters MAPK signaling pathways in PC12 and striatal cells: ERK1/2 protects against mutant huntingtin-associated toxicity, *Hum. Mol. Genet.* (2006) 15; 273-85.
- Ashburner, M., Ball, C.A., Blake, J.A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J.M., Davis, A.P., Dolinski, K., Dwight, S.S., Eppig, J.T., Harris, M.A., Hill, D.P., Issel-Tarver, L., Kasarskis, A., Lewis, S., Matese, J.C., Richardson, J.E., Ringwald, M., Rubin, G.M. et Sherlock, G.; Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium, *Nat. Genet.* (2000) 25; 25-9.
- Askanas, V. et Engel, W.K.; New advances in the understanding of sporadic inclusion-body myositis and hereditary inclusion-body myositis, *Current Opinion in Rheumatology* (1995) 7; 486-496.
- Avila, G., Lee, E.H., Perez, C.F., Allen, P.D. et Dirksen, R.T.; FKBP12 binding to RyR1 modulates excitation-contraction coupling in mouse skeletal myotubes, *J. Biol. Chem.* (2003) 278; 22600-8.
- Bachetti, T., Bocca, P., Borghini, S., Matera, I., Prigione, I., Ravazzolo, R. et Ceccherini, I.; Geldanamycin promotes nuclear localisation and clearance of PHOX2B misfolded proteins containing polyalanine expansions, *Int J Biochem Cell Biol* (2006).
- Bachetti, T., Matera, I., Borghini, S., Di Duca, M., Ravazzolo, R. et Ceccherini, I.; Distinct pathogenetic mechanisms for PHOX2B associated polyalanine expansions and frameshift mutations in congenital central hypoventilation syndrome, *Hum. Mol. Genet.* (2005) 14; 1815-24.
- Bae, J.S., Ki, C.S., Kim, J.W. et Kim, B.J.; Identification of a novel mutation in a Korean patient with oculopharyngeal muscular dystrophy, *J Clin Neurosci* (2007) 14; 89-92.
- Bao, Y.P., Cook, L.J., O'Donovan, D., Uyama, E. et Rubinsztein, D.C.; Mammalian, yeast, bacterial, and chemical chaperones reduce aggregate formation and death in a cell model of oculopharyngeal muscular dystrophy, *J. Biol. Chem.* (2002) 277; 12263-9.
- Bao, Y.P., Sarkar, S., Uyama, E. et Rubinsztein, D.C.; Congo red, doxycycline, and HSP70 overexpression reduce aggregate formation and cell death in cell models of oculopharyngeal muscular dystrophy, *J. Med. Genet.* (2004) 41; 47-51.
- Barbeau, A.; La myopathie oculaire au Canada Français, *L'Union Médical du Canada* (1965) 94; 1186-1187.
- Bear, D.G., Fomproix, N., Soop, T., Bjorkroth, B., Masich, S. et Daneholt, B.; Nuclear poly(A)-binding protein PABPN1 is associated with RNA polymerase II during transcription and accompanies the released transcript to the nuclear pore, *Exp. Cell. Res.* (2003) 286; 332-44.

- Becher, M.W., Kotzuk, J.A., Davis, L.E. et Bear, D.G.; Intranuclear inclusions in oculopharyngeal muscular dystrophy contain poly(A) binding protein 2, *Ann. Neurol.* (2000) 48; 812-5.
- Becher, M.W., Morrison, L., Davis, L.E., Maki, W.C., King, M.K., Bicknell, J.M., Reinert, B.L., Bartolo, C. et Bear, D.G.; Oculopharyngeal muscular dystrophy in Hispanic New Mexicans, *Jama* (2001) 286; 2437-2440.
- Benoit, B., Mitou, G., Chartier, A., Temme, C., Zaessinger, S., Wahle, E., Busseau, I. et Simonelig, M.; An essential cytoplasmic function for the nuclear poly(A) binding protein, PABP2, in poly(A) tail length control and early development in *Drosophila*, *Dev Cell* (2005) 9; 511-22.
- Benoit, B., Nemeth, A., Aulner, N., Kuhn, U., Simonelig, M., Wahle, E. et Bourbon, H.M.; The *Drosophila* poly(A)-binding protein II is ubiquitous throughout *Drosophila* development and has the same function in mRNA polyadenylation as its bovine homolog in vitro, *Nucleic Acids Res.* (1999) 27; 3771-8.
- Bentley, D.L.; Rules of engagement: co-transcriptional recruitment of pre-mRNA processing factors, *Curr Opin Cell Biol* (2005) 17; 251-6.
- Berciano, M.T., Villagra, N.T., Ojeda, J.L., Navascues, J., Gomes, A., Lafarga, M. et Carmo-Fonseca, M.; Oculopharyngeal muscular dystrophy-like nuclear inclusions are present in normal magnocellular neurosecretory neurons of the hypothalamus, *Hum. Mol. Genet.* (2004) 13; 829-38.
- Berger, Z., Davies, J.E., Luo, S., Pasco, M.Y., Majoul, I., O'Kane, C.J. et Rubinsztein, D.C.; Deleterious and protective properties of an aggregate-prone protein with a polyalanine expansion, *Hum. Mol. Genet.* (2006a) 15; 453-65.
- Berger, Z., Ravikumar, B., Menzies, F.M., Oroz, L.G., Underwood, B.R., Pangalos, M.N., Schmitt, I., Wullner, U., Evert, B.O., O'Kane, C.J. et Rubinsztein, D.C.; Rapamycin alleviates toxicity of different aggregate-prone proteins, *Hum. Mol. Genet.* (2006b) 15; 433-42.
- Beysen, D., Raes, J., Leroy, B.P., Lucassen, A., Yates, J.R., Clayton-Smith, J., Ilyina, H., Brooks, S.S., Christin-Maitre, S., Fellous, M., Fryns, J.P., Kim, J.R., Lapunzina, P., Lemyre, E., Meire, F., Messiaen, L.M., Oley, C., Splitt, M., Thomson, J., Van de Peer, Y., Veitia, R.A., De Paepe, A. et De Baere, E.; Deletions involving long-range conserved nongenic sequences upstream and downstream of FOXL2 as a novel disease-causing mechanism in blepharophimosis syndrome, *Am. J. Hum. Genet.* (2005) 77; 205-18.
- Bienroth, S., Keller, W. et Wahle, E.; Assembly of a processive messenger RNA polyadenylation complex, *EMBO J.* (1993) 12; 585-594.
- Bienvenu, T., Poirier, K., Friocourt, G., Bahi, N., Beaumont, D., Fauchereau, F., Ben Jeema, L., Zemni, R., Vinet, M.C., Francis, F., Couvert, P., Gomot, M., Moraine, C., van Bokhoven, H., Kalscheuer, V., Frints, S., Gecz, J., Ohzaki, K., Chaabouni, H., Fryns, J.P., Desportes, V., Beldjord, C. et Chelly, J.; ARX, a novel Prd-class-homeobox gene highly expressed in the telencephalon, is mutated in X-linked mental retardation, *Hum. Mol. Genet.* (2002) 11; 981-91.

- Blobel, G.; A protein of molecular weight 78,000 bound to the polyadenylate region of eukaryotic messenger RNAs, *Proc Natl Acad Sci U S A* (1973) 70; 924-8.
- Blondelle, S.E., Forood, B., Houghten, R.A. et Pérez-Payá, E.; Polyalanine-based peptides as models for self-associated B-pleated-sheet complexes, *Biochemistry* (1997) 36; 8393-8400.
- Blumen, S.C., Brais, B., Korczyn, A.D., Medinsky, S., Chapman, J., Asherov, A., Nisipeanu, P., Codere, F., Bouchard, J.P., Fardeau, M., Tome, F.M. et Rouleau, G.A.; Homozygotes for oculopharyngeal muscular dystrophy have a severe form of the disease, *Ann. Neurol.* (1999) 46; 115-8.
- Blumen, S.C., Sadeh, M., Korczyn, A.D., Rouche, A., Nisipeanu, P., Asherov, A. et Tome, F.M.; Intranuclear inclusions in oculopharyngeal muscular dystrophy among Bukhara Jews, *Neurology* (1996) 46; 1324-8.
- Bouchard, J.-P., Gagné, F., Tomé, F.M.S. et Brunet, D.; Nuclear inclusions in oculopharyngeal muscular dystrophy in Québec, *Can. J. Neurol. Sci.* (1989) 16; 446-450.
- Bouchard, J.P., Brais, B., Brunet, D., Gould, P.V. et Rouleau, G.A.; Recent studies on oculopharyngeal muscular dystrophy in Quebec, *Neuromuscul Disord* (1997) 7 Suppl 1; S22-9.
- Boukriche, Y., Maisonobe, T. et Masson, C.; Neurogenic involvement in a case of oculopharyngeal muscular dystrophy, *Muscle Nerve* (2002) 25; 98-101.
- Brais, B.; Oculopharyngeal muscular dystrophy: a late-onset polyalanine disease, *Cytogenet Genome Res* (2003) 100; 252-60.
- Brais, B., Bouchard, J.-P., Ya-Gang, X., Gosselin, F., Fardeau, M., Tomé, F.M.S. et Rouleau, G.A.; Using the full power of linkage analysis in 11 French Canadian families to fine map the oculopharyngeal muscular dystrophy gene, *Neuromuscular Disorders* (1997) 7; S70-S75.
- Brais, B., Bouchard, J.P., Xie, Y.G., Rochefort, D.L., Chretien, N., Tome, F.M., Lafreniere, R.G., Rommens, J.M., Uyama, E., Nohira, O., Blumen, S., Korczyn, A.D., Heutink, P., Mathieu, J., Duranceau, A., Codere, F., Fardeau, M. et Rouleau, G.A.; Short GCG expansions in the PABP2 gene cause oculopharyngeal muscular dystrophy, *Nat. Genet.* (1998a) 18; 164-7.
- Brais, B., Bouchard, J.P., Xie, Y.G., Rochefort, D.L., Chretien, N., Tome, F.M., Lafreniere, R.G., Rommens, J.M., Uyama, E., Nohira, O., Blumen, S., Korczyn, A.D., Heutink, P., Mathieu, J., Duranceau, A., Codere, F., Fardeau, M., Rouleau, G.A. et Korczyn, A.D.; Short GCG expansions in the PABP2 gene cause oculopharyngeal muscular dystrophy, *Nat. Genet.* (1998b) 18; 164-7.
- Brais, B., Xie, Y.-G., Sanson, M., Morgan, K., Weissenbach, J., Korczyn, A.D., Blumen, S.C., Fardeau, M., Tomé, F.M.S., Bouchard, J.-P. et Rouleau, G.A.; The oculopharyngeal muscular dystrophy locus maps to the region of the cardiac a and b myosin heavy chain genes on chromosome 14q11.2-q13, *Hum. Mol. Genet.* (1995) 4; 429-434.

- Brigand, C., Ferraro, P., Martin, J. et Duranceau, A.; Risk factors in patients undergoing cricopharyngeal myotomy, *Br J Surg* (2007) 94; 978-83.
- Brown, L., Paraso, M., Arkell, R. et Brown, S.; In vitro analysis of partial loss-of-function ZIC2 mutations in holoprosencephaly: alanine tract expansion modulates DNA binding and transactivation, *Hum. Mol. Genet.* (2005) 14; 411-20.
- Brown, L.Y. et Brown, S.A.; Alanine tracts: the expanding story of human illness and trinucleotide repeats, *Trends Genet.* (2004) 20; 51-8.
- Brown, L.Y., Odent, S., David, V., Blayau, M., Dubourg, C., Apacik, C., Delgado, M.A., Hall, B.D., Reynolds, J.F., Sommer, A., Wieczorek, D., Brown, S.A. et Muenke, M.; Holoprosencephaly due to mutations in ZIC2: alanine tract expansion mutations may be caused by parental somatic recombination, *Hum. Mol. Genet.* (2001) 10; 791-6.
- Brown, S.A., Warburton, D., Brown, L.Y., Yu, C.-Y., Roeder, E.R., Stengel-Rutkowski, S., Hennekam, R.C.M. et Muenke, M.; Holoprosencephaly due to mutation in ZIC2 a homologue of *Drosophila odd-paired*, *Nat. Genet.* (1998) 20; 180-183.
- Butland, S.L., Devon, R.S., Huang, Y., Mead, C.L., Meynert, A.M., Neal, S.J., Lee, S.S., Wilkinson, A., Yang, G.S., Yuen, M.M., Hayden, M.R., Holt, R.A., Leavitt, B.R. et Ouellette, B.F.; CAG-encoded polyglutamine length polymorphism in the human genome, *BMC Genomics* (2007) 8; 126.
- Caburet, S., Demarez, A., Moumne, L., Fellous, M., De Baere, E. et Veitia, R.A.; A recurrent polyalanine expansion in the transcription factor FOXL2 induces extensive nuclear and cytoplasmic protein aggregation, *J. Med. Genet.* (2004) 41; 932-6.
- Calado, A. et Carmo-Fonseca, M.; Localization of poly(A)-binding protein 2 (PABP2) in nuclear speckles is independent of import into the nucleus and requires binding to poly(A) RNA, *J. Cell. Sci.* (2000a) 113; 2309-18.
- Calado, A., Kutay, U., Kuhn, U., Wahle, E. et Carmo-Fonseca, M.; Deciphering the cellular pathway for transport of poly(A)-binding protein II, *RNA* (2000b) 6; 245-256.
- Calado, A., Tome, F.M., Brais, B., Rouleau, G.A., Kuhn, U., Wahle, E. et Carmo-Fonseca, M.; Nuclear inclusions in oculopharyngeal muscular dystrophy consist of poly(A) binding protein 2 aggregates which sequester poly(A) RNA, *Hum. Mol. Genet.* (2000c) 9; 2321-8.
- Calapez, A., Pereira, H.M., Calado, A., Braga, J., Rino, J., Carvalho, C., Tavanez, J.P., Wahle, E., Rosa, A.C. et Carmo-Fonseca, M.; The intranuclear mobility of messenger RNA binding proteins is ATP dependent and temperature sensitive, *J. Cell. Biol.* (2002) 159; 795-805.
- Chan, E.Y., Luthi-Carter, R., Strand, A., Solano, S.M., Hanson, S.A., DeJohn, M.M., Kooperberg, C., Chase, K.O., DiFiglia, M., Young, A.B., Leavitt, B.R., Cha, J.H., Aronin, N., Hayden, M.R. et Olson, J.M.; Increased huntingtin protein length reduces the number of polyglutamine-induced gene expression changes in mouse models of Huntington's disease, *Hum. Mol. Genet.* (2002) 11; 1939-51.

- Chang, M.S., Huang, C.J., Chen, M.L., Chen, S.T., Fan, C.C., Chu, J.M., Lin, W.C. et Yang, Y.C.; Cloning and characterization of hMAP126, a new member of mitotic spindle-associated proteins, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2001) 287; 116-21.
- Chang, Y.F., Imam, J.S. et Wilkinson, M.F.; The nonsense-mediated decay RNA surveillance pathway, *Annu Rev Biochem* (2007) 76; 51-74.
- Chartier, A., Benoit, B. et Simonelig, M.; A Drosophila model of oculopharyngeal muscular dystrophy reveals intrinsic toxicity of PABPN1, *EMBO J.* (2006) 25; 2253-62.
- Chen, Z., Li, Y. et Krug, R.M.; Influenza A virus NS1 protein targets poly(A)-binding protein II of the cellular 3'-end processing machinery, *EMBO J.* (1999) 18; 2273-2283.
- Cocquet, J., Pailhoux, E., Jaubert, F., Serval, N., Xia, X., Pannetier, M., De Baere, E., Messiaen, L., Cotinot, C., Fellous, M. et Veitia, R.A.; Evolution and expression of FOXL2, *J. Med. Genet.* (2002) 39; 916-21.
- Coiffier, L., Perie, S., Laforet, P., Eymard, B. et St Guily, J.L.; Long-term results of cricopharyngeal myotomy in oculopharyngeal muscular dystrophy, *Otolaryngol Head Neck Surg* (2006) 135; 218-22.
- Coquet, M., Vital, C. et Julien, J.; Presence of inclusion body myositis-like filaments in oculopharyngeal muscular dystrophy: ultrastructural study of 10 cases, *Neuropathology and Applied Neurobiology* (1990) 16; 393.
- Corbeil-Girard, L.P., Klein, A.F., Sasseville, A.M., Lavoie, H., Dicaire, M.J., Saint-Denis, A., Page, M., Duranceau, A., Codere, F., Bouchard, J.P., Karpati, G., Rouleau, G.A., Massie, B., Langelier, Y. et Brais, B.; PABPN1 overexpression leads to upregulation of genes encoding nuclear proteins that are sequestered in oculopharyngeal muscular dystrophy nuclear inclusions, *Neurobiol Dis* (2005) 18; 551-67.
- Crisponi, L., Deiana, M., Loi, A., Chiappe, F., Uda, M., Amati, P., Bisceglia, L., Zelante, L., Nagaraja, R., Porcu, S., Ristaldi, M.S., Marzella, R., Rocchi, M., Nicolino, M., Lienhardt-Roussie, A., Nivelon, A., Verloes, A., Schlessinger, D., Gasparini, P., Bonneau, D., Cao, A. and Pilia, G.; The putative forkhead transcription factor FOXL2 is mutated in blepharophimosis/ptosis/epicanthus inversus syndrome, *Nat. Genet.* (2001) 27; 159-166.
- Davies, J.E., Berger, Z. et Rubinsztein, D.C.; Oculopharyngeal muscular dystrophy: potential therapies for an aggregate-associated disorder, *Int J Biochem Cell Biol* (2006a) 38; 1457-62.
- Davies, J.E., Sarkar, S. et Rubinsztein, D.C.; Trehalose reduces aggregate formation and delays pathology in a transgenic mouse model of oculopharyngeal muscular dystrophy, *Hum. Mol. Genet.* (2006b) 15; 23-31.
- Davies, J.E., Sarkar, S. et Rubinsztein, D.C.; Wild-type PABPN1 is Anti-Apoptotic and Reduces Toxicity of the Oculopharyngeal Muscular Dystrophy Mutation, *Hum. Mol. Genet.* (2008).

- Davies, J.E., Wang, L., Garcia-Oroz, L., Cook, L.J., Vacher, C., O'Donovan, D.G. et Rubinsztein, D.C.; Doxycycline attenuates and delays toxicity of the oculopharyngeal muscular dystrophy mutation in transgenic mice, *Nat Med* (2005) 11; 672-7.
- Davies, S.W., Turmaine, M., Cozens, B.A., DiFiglia, M., Sharp, A.H., Ross, C.A., Scherzinger, E., Wanker, E.E., Mangiarini, L. et Bates, G.P.; Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunctions in mice transgenic for the HD mutation, *Cell* (1997) 90; 537-548.
- Davis, B.M., McCurrach, M.E., Taneja, K.L., Singer, R.H. et Housman, D.E.; Expansion of a CUG trinucleotide repeat in the 3' untranslated region of myotonic dystrophy protein kinase transcripts results in nuclear retention of transcripts, *Proc Natl Acad Sci U S A* (1997) 94; 7388-93.
- De Baere, E., Beysen, D., Oley, C., Lorenz, B., Cocquet, J., De Sutter, P., Devriendt, K., Dixon, M., Fellous, M., Fryns, J.P., Garza, A., Jonsrud, C., Koivisto, P.A., Krause, A., Leroy, B.P., Meire, F., Plomp, A., Van Maldergem, L., De Paepe, A., Veitia, R. et Messiaen, L.; FOXL2 and BPES: mutational hotspots, phenotypic variability, and revision of the genotype-phenotype correlation, *Am. J. Hum. Genet.* (2003) 72; 478-87.
- de la Mata, M. et Kornblihtt, A.R.; RNA polymerase II C-terminal domain mediates regulation of alternative splicing by SRp20, *Nat Struct Mol Biol* (2006) 13; 973-80.
- de Swart, B.J., van der Sluijs, B.M., Vos, A.M., Kalf, J.G., Knuijt, S., Cruysberg, J.R. et van Engelen, B.G.; Ptosis aggravates dysphagia in oculopharyngeal muscular dystrophy, *J Neurol Neurosurg Psychiatry* (2006) 77; 266-8.
- Decary, S., Mouly, V., Hamida, C.B., Sautet, A., Barbet, J.P. et Butler-Browne, G.S.; Replicative potential and telomere length in human skeletal muscle: implications for satellite cell-mediated gene therapy, *Hum Gene Ther* (1997) 8; 1429-38.
- Delord, J.; Sur une forme de ptosis non congénital et héréditaire, *Presse Médicale* (1903) 11; 592.
- Dieude, M., Senecal, J.L., Rauch, J., Hanly, J.G., Fortin, P., Brassard, N. et Raymond, Y.; Association of autoantibodies to nuclear lamin B1 with thromboprotection in systemic lupus erythematosus: lack of evidence for a direct role of lamin B1 in apoptotic blebs, *Arthritis Rheum* (2002) 46; 2695-707.
- Dion, P., Shanmugam, V., Gaspar, C., Messaed, C., Meijer, I., Toulouse, A., Laganier, J., Roussel, J., Rochefort, D., Laganier, S., Allen, C., Karpati, G., Bouchard, J.P., Brais, B. et Rouleau, G.A.; Transgenic expression of an expanded (GCG)<sup>13</sup> repeat PABPN1 leads to weakness and coordination defects in mice, *Neurobiol Dis* (2005) 18; 528-36.
- Dominski, Z.; Nucleases of the metallo-beta-lactamase family and their role in DNA and RNA metabolism, *Crit Rev Biochem Mol Biol* (2007) 42; 67-93.
- Dominski, Z. et Marzluff, W.F.; Formation of the 3' end of histone mRNA: getting closer to the end, *Gene* (2007) 396; 373-90.

- Draghici, S., Khatri, P., Bhavsar, P., Shah, A., Krawetz, S.A. et Tainsky, M.A.; Onto-Tools, the toolkit of the modern biologist: Onto-Express, Onto-Compare, Onto-Design and Onto-Translate, *Nucleic Acids Res.* (2003) 31; 3775-81.
- Duranceau, A.; Cricopharyngeal myotomy in the management of neurogenic and muscular dysphagia, *Neuromuscular Disorders* (1997) 7; S85-S89.
- Dutil, A.; Note sur une forme de ptosis non congénital et héréditaire, *Le Progrès Médical* (1892) 16; 401-403.
- Ebraldize, A., Wang, Y., Petkova, V., Ebraldize, K. et Junghans, R.P.; RNA leaching of transcription factors disrupts transcription in myotonic dystrophy, *Science* (2004) 303; 383-7.
- Expert-Bezancou, A., Sureau, A., Durosay, P., Salesse, R., Groeneveld, H., Lecaer, J.P. et Marie, J.; hnRNP A1 and the SR proteins ASF/SF2 and SC35 have antagonistic functions in splicing of beta-tropomyosin exon 6B, *J. Biol. Chem.* (2004) 279; 38249-59.
- Fan, X., Dion, P., Laganier, J., Brais, B. et Rouleau, G.A.; Oligomerization of polyalanine expanded PABPN1 facilitates nuclear protein aggregation that is associated with cell death, *Hum. Mol. Genet.* (2001) 10; 2341-51.
- Fan, X., Messaed, C., Dion, P., Laganier, J., Brais, B., Karpati, G. et Rouleau, G.A.; HnRNP A1 and A/B interaction with PABPN1 in oculopharyngeal muscular dystrophy, *Can. J. Neurol. Sci.* (2003a) 30; 244-51.
- Fan, X. et Rouleau, G.A.; Progress in understanding the pathogenesis of oculopharyngeal muscular dystrophy, *Can. J. Neurol. Sci.* (2003b) 30; 8-14.
- Fenteany, G. et Schreiber, S.L.; Lactacystin, proteasome function, and cell fate, *J. Biol. Chem.* (1998) 273; 8545-8.
- Fondon, J.W., 3rd et Garner, H.R.; Molecular origins of rapid and continuous morphological evolution, *Proc Natl Acad Sci U S A* (2004) 101; 18058-63.
- Forood, B., Pérez-Payá, E., Houghten, R.A. et Blondelle, S.E.; Formation of an extremely stable polyalanine B-sheet macromolecule, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1995) 211; 7-13.
- Fuchs, E.; Ueber isolirte doppelseitige Ptosis, *Archives für Ophthal* (1890) 36; 234-259.
- Furling, D., Coiffier, L., Mouly, V., Barbet, J.P., St Guily, J.L., Taneja, K., Gourdon, G., Junien, C. et Butler-Browne, G.S.; Defective satellite cells in congenital myotonic dystrophy, *Hum. Mol. Genet.* (2001) 10; 2079-87.
- Gatchel, J.R. et Zoghbi, H.Y.; Diseases of unstable repeat expansion: mechanisms and common principles, *Nat Rev Genet* (2005) 6; 743-55.
- Giri, K., Bhattacharyya, N.P. et Basak, S.; pH-dependent self-assembly of polyalanine peptides, *Biophys J* (2007) 92; 293-302.

- Goodman, F.R., Bacchelli, C., Brady, A.F., Brueton, L.A., Fryns, J.P., Mortlock, D.P., Innis, J.W., Holmes, L.B., Donnfeld, A.E., Feingold, M., Beemer, F.A., Hennekam, R.C. et Scambler, P.J.; Novel HOXA13 mutations and the phenotypic spectrum of hand-foot-genital syndrome, *Am. J. Hum. Genet.* (2000) 67; 197-202.
- Goodman, F.R., Mundlos, S., Muragaki, Y., Donnai, D., Giovannucci-Uzielli, M.L., Lapi, E., Majewski, F., McGaughan, J., McKeown, C., Reardon, W., Upton, J., Winter, R.M., Olsen, B.R. et Scambler, P.J.; Synpolydactyly phenotypes correlate with size of expansions in HOXD13 polyalanine tract, *Proc Natl Acad Sci U S A* (1997) 94; 7458-63.
- Guil, S. et Caceres, J.F.; The multifunctional RNA-binding protein hnRNP A1 is required for processing of miR-18a, *Nat Struct Mol Biol* (2007) 14; 591-6.
- Hardiman, O., Halperin, J.J., Farrell, M.A., Shapiro, B.E., Wray, S.H. et Brown, R.H., Jr.; Neuropathic findings in oculopharyngeal muscular dystrophy. A report of seven cases and a review of the literature, *Arch Neurol* (1993) 50; 481-8.
- Hargous, Y., Hautbergue, G.M., Tintaru, A.M., Skrisovska, L., Golovanov, A.P., Stevenin, J., Lian, L.Y., Wilson, S.A. et Allain, F.H.; Molecular basis of RNA recognition and TAP binding by the SR proteins SRp20 and 9G8, *EMBO J.* (2006) 25; 5126-37.
- Hebbar, S., Webberley, M.J., Lunt, P. et Robinson, D.O.; Siblings with recessive oculopharyngeal muscular dystrophy, *Neuromuscul Disord* (2007) 17; 254-7.
- Herrero, J., Al-Shahrour, F., Diaz-Uriarte, R., Mateos, A., Vaquerizas, J.M., Santoyo, J. et Dopazo, J.; GEPAS: A web-based resource for microarray gene expression data analysis, *Nucleic Acids Res.* (2003) 31; 3461-7.
- Hill, M.E., Creed, G.A., McMullan, T.F., Tyers, A.G., Hilton-Jones, D., Robinson, D.O. et Hammans, S.R.; Oculopharyngeal muscular dystrophy: phenotypic and genotypic studies in a UK population, *Brain* (2001) 124; 522-526.
- Hino, H., Araki, K., Uyama, E., Takeya, M., Araki, M., Yoshinobu, K., Miike, K., Kawazoe, Y., Maeda, Y., Uchino, M. et Yamamura, K.; Myopathy phenotype in transgenic mice expressing mutated PABPN1 as a model of oculopharyngeal muscular dystrophy, *Hum. Mol. Genet.* (2004) 13; 181-90.
- Ho, T.H., Bundman, D., Armstrong, D.L. et Cooper, T.A.; Transgenic mice expressing CUG-BP1 reproduce splicing mis-regulation observed in myotonic dystrophy, *Hum. Mol. Genet.* (2005a) 14; 1539-47.
- Ho, T.H., Charlet, B.N., Poulos, M.G., Singh, G., Swanson, M.S. et Cooper, T.A.; Muscleblind proteins regulate alternative splicing, *EMBO J.* (2004) 23; 3103-12.
- Ho, T.H., Savkur, R.S., Poulos, M.G., Mancini, M.A., Swanson, M.S. et Cooper, T.A.; Colocalization of muscleblind with RNA foci is separable from mis-regulation of alternative splicing in myotonic dystrophy, *J. Cell. Sci.* (2005b) 118; 2923-33.
- Hosoda, N., Lejeune, F. et Maquat, L.E.; Evidence that poly(A) binding protein C1 binds nuclear pre-mRNA poly(A) tails, *Mol. Cell. Biol.* (2006) 26; 3085-97.
- Huang, Y. et Steitz, J.A.; Splicing factors SRp20 and 9G8 promote the nucleocytoplasmic export of mRNA, *Mol. Cell.* (2001) 7; 899-905.

- Ishigaki, Y., Li, X., Serin, G. et Maquat, L.E.; Evidence for a pioneer round of mRNA translation: mRNAs subject to nonsense-mediated decay in mammalian cells are bound by CBP80 and CBP20, *Cell* (2001) 106; 607-17.
- Jayaraman, T. et Marks, A.K.; Rapamycin-FKBP12 blocks proliferation, induces differentiation, and inhibits cdc2 kinase activity in a myogenic cell line, *J. Biol. Chem.* (1993) 268; 25385-8.
- Kanadia, R.N., Johnstone, K.A., Mankodi, A., Lungu, C., Thornton, C.A., Esson, D., Timmers, A.M., Hauswirth, W.W. et Swanson, M.S.; A muscleblind knockout model for myotonic dystrophy, *Science* (2003) 302; 1978-80.
- Kaufmann, I., Martin, G., Friedlein, A., Langen, H. et Keller, W.; Human Fip1 is a subunit of CPSF that binds to U-rich RNA elements and stimulates poly(A) polymerase, *EMBO J.* (2004) 23; 616-26.
- Keller, R.W., Kuhn, U., Aragon, M., Bornikova, L., Wahle, E. et Bear, D.G.; The nuclear poly(A) binding protein, PABP2, forms an oligomeric particle covering the length of the poly(A) tail, *J Mol Biol* (2000) 2973.
- Kerwitz, Y., Kuhn, U., Lilie, H., Knoth, A., Scheuermann, T., Friedrich, H., Schwarz, E. et Wahle, E.; Stimulation of poly(A) polymerase through a direct interaction with the nuclear poly(A) binding protein allosterically regulated by RNA, *EMBO J.* (2003) 22; 3705-3714.
- Khatri, P., Draghici, S., Ostermeier, G.C. et Krawetz, S.A.; Profiling gene expression using onto-express, *Genomics* (2002) 79; 266-70.
- Kim, I.M., Ackerson, T., Ramakrishna, S., Tretiakova, M., Wang, I.C., Kalin, T.V., Major, M.L., Gusarova, G.A., Yoder, H.M., Costa, R.H. et Kalinichenko, V.V.; The Forkhead Box m1 transcription factor stimulates the proliferation of tumor cells during development of lung cancer, *Cancer Res* (2006) 66; 2153-61.
- Kim, Y.J., Noguchi, S., Hayashi, Y.K., Tsukahara, T., Shimizu, T. et Arahata, K.; The product of an oculopharyngeal muscular dystrophy gene, poly(A)-binding protein 2, interacts with SKIP and stimulates muscle-specific gene expression, *Hum. Mol. Genet.* (2001) 10; 1129-1139.
- Kita, H., Carmichael, J., Swartz, J., Muro, S., Wytenbach, A., Matsubara, K., Rubinsztein, D.C. et Kato, K.; Modulation of polyglutamine-induced cell death by genes identified by expression profiling, *Hum. Mol. Genet.* (2002) 11; 2279-87.
- Kitiphongspattana, K., Mathews, C.E., Leiter, E.H. et Gaskins, H.R.; Proteasome inhibition alters glucose-stimulated (pro)insulin secretion and turnover in pancreatic {beta}-cells, *J. Biol. Chem.* (2005) 280; 15727-34.
- Kopito, R.R.; Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation, *Trends Cell Biol* (2000) 10; 524-30.
- Krause, S., Fakan, S., Weis, K. et Wahle, E.; Immunodetection of poly(A) binding protein II in cell nucleus, *Exp. Cell. Res.* (1994) 214; 75-82.
- Kuhn, U., Nemeth, A., Meyer, S. et Wahle, E.; The RNA binding domains of the nuclear poly(A)-binding protein, *J. Biol. Chem.* (2003) 278; 16916-25.

- Kuhn, U. et Wahle, E.; Structure and function of poly(A) binding proteins, *Biochim Biophys Acta* (2004) 1678; 67-84.
- Lamond, A.I. et Spector, D.L.; Nuclear speckles: a model for nuclear organelles, *Nat Rev Mol Cell Biol* (2003) 4; 605-12.
- Lampson, M.A. et Kapoor, T.M.; The human mitotic checkpoint protein BubR1 regulates chromosome-spindle attachments, *Nat Cell Biol* (2005) 7; 93-8.
- Laumonnier, F., Ronce, N., Hamel, B.C., Thomas, P., Lespinasse, J., Raynaud, M., Paringaux, C., Van Bokhoven, H., Kalscheuer, V., Fryns, J.P., Chelly, J., Moraine, C. et Briault, S.; Transcription factor SOX3 is involved in X-linked mental retardation with growth hormone deficiency, *Am. J. Hum. Genet.* (2002) 71; 1450-5.
- Lavoie, H., Debeane, F., Trinh, Q.D., Turcotte, J.F., Corbeil-Girard, L.P., Dicaire, M.J., Saint-Denis, A., Page, M., Rouleau, G.A. et Brais, B.; Polymorphism, shared functions and convergent evolution of genes with sequences coding for polyalanine domains, *Hum. Mol. Genet.* (2003) 12; 2967-79.
- Leclerc, A., Tomé, F.M.S. et Fardeau, M.; Ubiquitin and beta-amyloid-protein in inclusion body myositis (IBM), familial IBM-like disorder and oculopharyngeal muscular dystrophy: an immunocytochemical study, *Neuromuscular Disorders* (1993) 3; 283-291.
- Lee, Y.J., Ahn, J.K. et Chung, J.H.; Expression of murine poly(A) binding protein II gene in testis, *IUBMB Life* (2000) 49; 57-61.
- Letendre, J., Tétreault, C. et Barbeau, A.; Dystrophie musculaire oculo-pharyngienne, *Montréal Médical* (1966) 17; 11-13.
- Li, Z.F., Wu, X., Jiang, Y., Liu, J., Wu, C., Inagaki, M., Izawa, I., Mizisin, A.P., Engvall, E. et Shelton, G.D.; Non-pathogenic protein aggregates in skeletal muscle in MLF1 transgenic mice, *J Neurol Sci* (2007).
- Little, B.W. et Perl, D.P.; Oculopharyngeal muscular dystrophy. An autopsied case from the French-Canadian kindred, *Journal of the Neurological Sciences* (1982) 53; 145-158.
- Liu, G., Loraine, A.E., Shigeta, R., Cline, M., Cheng, J., Valmeekam, V., Sun, S., Kulp, D. et Siani-Rose, M.A.; NetAffx: Affymetrix probesets and annotations, *Nucleic Acids Res.* (2003) 31; 82-6.
- Liu, Q. et Dreyfuss, G.; In vivo and in vitro arginine methylation of RNA-binding proteins, *Mol. Cell. Biol.* (1995) 15; 2800-8.
- Lodderstedt, G., Hess, S., Hause, G., Scheuermann, T., Scheibel, T. et Schwarz, E.; Effect of oculopharyngeal muscular dystrophy-associated extension of seven alanines on the fibrillation properties of the N-terminal domain of PABPN1, *Febs J* (2007) 274; 346-55.
- Ma, B. et Nussinov, R.; Molecular dynamics simulations of alanine rich beta-sheet oligomers: Insight into amyloid formation, *Protein Sci.* (2002) 11; 2335-50.

- Mahadevan, M., Tsilfidis, C., Sabourin, L., Shutler, G., Amemiya, C., Jansen, G., Neville, C., Narang, M., Barcelo, J., O'Hoy, K. et al.; Myotonic dystrophy mutation: an unstable CTG repeat in the 3' untranslated region of the gene, *Science* (1992) 255; 1253-5.
- Mandel, C.R., Kaneko, S., Zhang, H., Gebauer, D., Vethantham, V., Manley, J.L. et Tong, L.; Polyadenylation factor CPSF-73 is the pre-mRNA 3'-end-processing endonuclease, *Nature* (2006) 444; 953-6.
- Mangus, D.A., Evans, M.C. et Jacobson, A.; Poly(A)-binding proteins: multifunctional scaffolds for the post-transcriptional control of gene expression, *Genome Biol* (2003) 4; 223.
- Marubuchi, S., Wada, Y., Okuda, T., Hara, Y., Qi, M.L., Hoshino, M., Nakagawa, M., Kanazawa, I. et Okazawa, H.; Polyglutamine tract-binding protein-1 dysfunction induces cell death of neurons through mitochondrial stress, *J Neurochem* (2005) 95; 858-70.
- Massie, B., Couture, F., Lamoureux, L., Mosser, D.D., Guilbault, C., Jolicoeur, P., Belanger, F. et Langelier, Y.; Inducible overexpression of a toxic protein by an adenovirus vector with a tetracycline-regulatable expression cassette, *J. Virol.* (1998a) 72; 2289-2296.
- Massie, B., Mosser, D.D., Koutroumanis, M., Vitte-Mony, I., Lamoureux, L., Couture, F., Paquet, L., Guilbault, C., Dionne, J., Chahla, D., Jolicoeur, P. et Langelier, Y.; New adenovirus vectors for protein production and gene transfer, *Cytotechnology* (1998b) 28; 53-64.
- Matera, I., Bachetti, T., Puppo, F., Di Duca, M., Morandi, F., Casiraghi, G.M., Cilio, M.R., Hennekam, R., Hofstra, R., Schober, J.G., Ravazzolo, R., Ottonello, G. et Ceccherini, I.; PHOX2B mutations and polyalanine expansions correlate with the severity of the respiratory phenotype and associated symptoms in both congenital and late onset Central Hypoventilation syndrome, *J. Med. Genet.* (2004) 41; 373-80.
- McCampbell, A., Taylor, J.P., Taye, A.A., Robitschek, J., Li, M., Walcott, J., Merry, D., Chai, Y., Paulson, H., Sobue, G. et Fischbeck, K.H.; CREB-binding protein sequestration by expanded polyglutamine, *Hum. Mol. Genet.* (2000) 9; 2197-202.
- Messaed, C., Dion, P.A., Abu-Baker, A., Rochefort, D., Laganriere, J., Brais, B. et Rouleau, G.A.; Soluble expanded PABPN1 promotes cell death in oculopharyngeal muscular dystrophy, *Neurobiol Dis* (2007).
- Meyer, S., Urbanke, C. et Wahle, E.; Equilibrium studies on the association of the nuclear poly(A) binding protein with poly(A) of different lengths, *Biochemistry* (2002) 41; 6082-9.
- Michalik, A. et Van Broeckhoven, C.; Pathogenesis of polyglutamine disorders: aggregation revisited, *Hum. Mol. Genet.* (2003) 12; R173-86.
- Mirabella, M., Silvestri, G., de Rosa, G., Di Giovanni, S., Di Muzio, A., Uncini, A., Tonali, P. et Servidei, S.; GCG genetic expansions in Italian patients with oculopharyngeal muscular dystrophy, *Neurology* (2000) 54; 608-14.

- Misteli, T., Caceres, J.F. et Spector, D.L.; The dynamics of a pre-mRNA splicing factor in living cells, *Nature* (1997) 387; 523-7.
- Mortlock, D.P. et Innis, J.W.; Mutation of HOXA13 in hand-foot-genital syndrome, *Nat. Genet.* (1997) 15; 179-80.
- Moss, F.P. et Leblond, C.P.; Satellite cells as the source of nuclei in muscles of growing rats, *Anat Rec* (1971) 170; 421-35.
- Muller, T., Deschauer, M., Kolbe-Fehr, F. et Zierz, S.; Genetic heterogeneity in 30 German patients with oculopharyngeal muscular dystrophy, *J Neurol* (2006) 253; 892-5.
- Muller, T., Schroder, R. et Zierz, S.; GCG repeats and phenotype in oculopharyngeal muscular dystrophy, *Muscle and Nerve* (2001) 24; 120-122.
- Mundlos, S.; Cleidocranial dysplasia: clinical and molecular genetics, *J. Med. Genet.* (1999) 36; 177-82.
- Mundlos, S., Otto, F., Mundlos, C., Mulliken, J.B., Aylsworth, A.S., Albright, S., Lindhout, D., Cole, W.G., Henn, W., Knoll, J.H.M., Owen, M.J., Mertelsmann, R., Zabel, B.U. et Olsen, B.R.; Mutations involving the transcription factor CBFA1 cause cleidocranial dysplasia, *Cell* (1997) 89; 773-779.
- Muragaki, Y., Mundlos, S., Upton, J. et Olsen, B.R.; Altered growth and branching patterns in synpolydactyly caused by mutations in HOXD13, *Science* (1996) 272; 548-51.
- Nakamoto, M., Nakano, S., Kawashima, S., Ihara, M., Nishimura, Y., Shinde, A. et Kakizuka, A.; Unequal crossing-over in unique PABP2 mutations in Japanese patients: a possible cause of oculopharyngeal muscular dystrophy, *Archives of Neurology* (2002) 59; 474-477.
- Nasrallah, I.M., Minarcik, J.C. et Golden, J.A.; A polyalanine tract expansion in Arx forms intranuclear inclusions and results in increased cell death, *J. Cell. Biol.* (2004) 167; 411-6.
- Nemeth, A., Krause, S., Blank, D., Jenny, A., Jenö, P., Lustig, A. et Wahle, E.; Isolation of genomic and cDNA clones encoding bovine poly(A) binding protein II, *Nucleic Acids Res.* (1995) 23; 4034-4041.
- Nguyen, H.D. et Hall, C.K.; Molecular dynamics simulations of spontaneous fibril formation by random-coil peptides, *Proc Natl Acad Sci U S A* (2004) 101; 16180-5.
- Nguyen, H.D. et Hall, C.K.; Kinetics of fibril formation by polyalanine peptides, *J. Biol. Chem.* (2005) 280; 9074-82.
- Nguyen, H.D. et Hall, C.K.; Spontaneous fibril formation by polyalanines; discontinuous molecular dynamics simulations, *J Am Chem Soc* (2006) 128; 1890-901.
- Oma, Y., Kino, Y., Sasagawa, N. et Ishiura, S.; Intracellular localization of homopolymeric amino acid-containing proteins expressed in mammalian cells, *J. Biol. Chem.* (2004) 279; 21217-22.
- Oma, Y., Kino, Y., Sasagawa, N. et Ishiura, S.; Comparative analysis of the cytotoxicity of homopolymeric amino acids, *Biochim Biophys Acta* (2005) 1748; 174-9.

- Orr, H.T. et Zoghbi, H.Y.; Trinucleotide repeat disorders, *Annu Rev Neurosci* (2007) 30; 575-621.
- Osborne, R.J. et Thornton, C.A.; RNA-dominant diseases, *Hum. Mol. Genet.* (2006) 15 Spec No 2; R162-9.
- Otto, F., Kanegane, H. et Mundlos, S.; Mutations in the RUNX2 gene in patients with cleidocranial dysplasia, *Hum Mutat* (2002) 19; 209-16.
- Pelczar, P. et Filipowicz, W.; The host gene for intronic U17 small nucleolar RNAs in mammals has no protein-coding potential and is a member of the 5'-terminal oligopyrimidine gene family, *Mol. Cell. Biol.* (1998) 18; 4509-18.
- Perie, S., Mamchaoui, K., Mouly, V., Blot, S., Bouazza, B., Thornell, L.E., St Guily, J.L. et Butler-Browne, G.; Premature proliferative arrest of cricopharyngeal myoblasts in oculo-pharyngeal muscular dystrophy: Therapeutic perspectives of autologous myoblast transplantation, *Neuromuscul Disord* (2006) 16; 770-81.
- Philips, A.V., Timchenko, L.T. et Cooper, T.A.; Disruption of splicing regulated by a CUG-binding protein in myotonic dystrophy, *Science* (1998) 280; 737-41.
- Pinol-Roma, S. et Dreyfuss, G.; Shuttling of pre-mRNA binding proteins between nucleus and cytoplasm, *Nature* (1992) 355; 730-2.
- Porschke, H., Kress, W., Reichmann, H., Goebel, H.H. et Grimm, T.; Oculopharyngeal muscular dystrophy and carnitine deficiency in a Northern German family, *Neuromuscular Disorders* (1997a) 7; S57-S62.
- Porschke, H., Kress, W., Reichmann, H., Goebel, H.H. et Grimm, T.; Oculopharyngeal muscular dystrophy in a northern German family linked to chromosome 14q, and presenting carnitine deficiency, *Neuromuscular Disorders* (1997b) 7; S57-S62.
- Probst, A., Tackmann, W., Stoeckli, H.R., Jerusalem, F. et Ulrich, J.; Evidence for a chronic axonal atrophy in oculopharyngeal "muscular dystrophy", *Acta Neuropathol. (Berl.)* (1982) 57; 209-216.
- Proudfoot, N.; New perspectives on connecting messenger RNA 3' end formation to transcription, *Curr Opin Cell Biol* (2004) 16; 272-8.
- Qin, X.X., Coyne, K.J. et Waite, J.H.; Tough tendons. Mussel byssus has collagen with silk-like domains, *J. Biol. Chem.* (1997) 272; 32623-7.
- Rankin, J., Wyttenbach, A. et Rubinsztein, D.C.; Intracellular green fluorescent protein-polyalanine aggregates are associated with cell death, *Biochemical Journal* (2000) 348; 15-19.
- Ranum, L.P. et Day, J.W.; Myotonic dystrophy: RNA pathogenesis comes into focus, *Am. J. Hum. Genet.* (2004) 74; 793-804.
- Ravikumar, B., Duden, R. et Rubinsztein, D.C.; Aggregate-prone proteins with polyglutamine and polyalanine expansions are degraded by autophagy, *Hum. Mol. Genet.* (2002) 11; 1107-17.
- Robinson, D.O., Hammans, S.R., Read, S.P. et Sillibourne, J.; Oculopharyngeal muscular dystrophy (OPMD): analysis of the PABPN1 gene expansion sequence in 86

- patients reveals 13 different expansion types and further evidence for unequal recombination as the mutational mechanism, *Hum. Genet.* (2005) 116; 267-71.
- Rodrigue, D. et Molgat, Y.M.; Surgical correction of blepharoptosis in oculopharyngeal muscular dystrophy, *Neuromuscular Disorders* (1997) 7; S82-S84.
- Rodriguez, M., Camejo, C., Bertoni, B., Braida, C., Rodriguez, M.M., Brais, B., Medici, M. et Roche, L.; (GCG)<sub>11</sub> founder mutation in the PABPN1 gene of OPMD Uruguayan families, *Neuromuscul Disord* (2005) 15; 185-90.
- Rowland, L.P., Hirano, M., DiMauro, S. et Schon, E.A.; Oculopharyngeal muscular dystrophy, other ocular myopathies, and progressive external ophthalmoplegia, *Neuromuscular Disorders* (1997) 7; S15-S21.
- Roy, G., De Crescenzo, G., Khaleghpour, K., Kahvejian, A., O'Connor-McCourt, M. et Sonenberg, N.; Paip1 interacts with poly(A) binding protein through two independent binding motifs, *Mol. Cell. Biol.* (2002) 22; 3769-82.
- Ruegg, S., Lehky Hagen, M., Hohl, U., Kappos, L., Fuhr, P., Plasilov, M., Muller, H. et Heinemann, K.; Oculopharyngeal muscular dystrophy - an under-diagnosed disorder?, *Swiss Med Wkly* (2005) 135; 574-86.
- Ryan, K., Calvo, O. et Manley, J.L.; Evidence that polyadenylation factor CPSF-73 is the mRNA 3' processing endonuclease, *Rna* (2004) 10; 565-73.
- Sasaki, A., Kanai, M., Kijima, K., Akaba, K., Hashimoto, M., Hasegawa, H., Otaki, S., Koizumi, T., Kusuda, S., Ogawa, Y., Tuchiya, K., Yamamoto, W., Nakamura, T. et Hayasaka, K.; Molecular analysis of congenital central hypoventilation syndrome, *Hum. Genet.* (2003) 114; 22-6.
- Sasseville, A.M.J., Caron, A.W., Bourget, L., Klein, A.F., Dicaire, M.J., Rouleau, G.A., Massie, B., Langelier, Y. et Brais, B.; The dynamism of PABPN1 nuclear inclusions during the cell cycle, *Neurobiol Dis* (2006) 23; 621-9.
- Saucier, J.; The clinical significance of ptosis with special reference to ptosis of late onset, *The Journal of Nervous and Mental Diseases* (1954) 119; 148-158.
- Scacheri, P.C., Garcia, C., Hebert, R. et Hoffman, E.P.; Unique PABP2 mutations in "Cajuns" suggest multiple founders of oculopharyngeal muscular dystrophy in populations with French ancestry, *Am J Med Genet* (1999) 86; 477-81.
- Scheuermann, T., Schulz, B., Blume, A., Wahle, E., Rudolph, R. et Schwarz, E.; Trinucleotide expansions leading to an extended poly-L-alanine segment in the poly (A) binding protein PABPN1 cause fibril formation, *Protein Sci.* (2003) 12; 2685-92.
- Schmitt, H.P. et Krause, K.H.; An autopsy study of a familial oculopharyngeal muscular dystrophy (OPMD) with distal spread and neurogenic involvement, *Muscle & Nerve* (1981) 4; 296-305.
- Schober, R., Kress, W., Grahmann, F., Kellermann, S., Baum, P., Gunzel, S. et Wagner, A.; Unusual triplet expansion associated with neurogenic changes in a family with oculopharyngeal muscular dystrophy, *Neuropathology* (2001) 21; 45-52.

- Schroder, M. et Kaufman, R.J.; The mammalian unfolded protein response, *Annu Rev Biochem* (2005) 74; 739-89.
- Seglen, P.O. et Gordon, P.B.; 3-Methyladenine: specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes, *Proc Natl Acad Sci U S A* (1982) 79; 1889-92.
- Shanmugam, V., Dion, P., Rochefort, D., Laganier, J., Brais, B. et Rouleau, G.A.; PABP2 polyalanine tract expansion causes intranuclear inclusions in oculopharyngeal muscular dystrophy, *Ann. Neurol.* (2000) 48; 798-802.
- Shimohata, T., Onodera, O. et Tsuji, S.; Interaction of expanded polyglutamine stretches with nuclear transcription factors leads to aberrant transcriptional regulation in polyglutamine diseases, *Neuropathology* (2000) 20; 326-33.
- Shinchuk, L.M., Sharma, D., Blondelle, S.E., Reixach, N., Inouye, H. et Kirschner, D.A.; Poly-(L-alanine) expansions form core beta-sheets that nucleate amyloid assembly, *Proteins* (2005) 61; 579-89.
- Shoubridge, C., Cloosterman, D., Parkinson-Lawrence, E., Brooks, D. et Gecz, J.; Molecular pathology of expanded polyalanine tract mutations in the *Aristaless*-related homeobox gene, *Genomics* (2007) 90; 59-71.
- Simmons, A.H., Michal, C.A. et Jelinski, L.W.; Molecular orientation and two-component nature of the crystalline fraction of spider dragline silk, *Science* (1996) 271; 84-87.
- Smith, J.J., Rucknagel, K.P., Schierhorn, A., Tang, J., Nemeth, A., Linder, M., Herschman, H.R. et Wahle, E.; Unusual sites of arginine methylation in Poly(A)-binding protein II and in vitro methylation by protein arginine methyltransferases PRMT1 and PRMT3, *J. Biol. Chem.* (1999) 274; 13229-34.
- Soto, P., Baumketner, A. et Shea, J.E.; Aggregation of polyalanine in a hydrophobic environment, *J Chem Phys* (2006) 124; 134904.
- Spector, D.L.; Macromolecular domains within the cell nucleus, *Annual Review of Cell Biology* (1993) 9; 265-315.
- Spector, D.L., Fu, X.D. et Maniatis, T.; Associations between distinct pre-mRNA splicing components and the cell nucleus, *EMBO J.* (1991) 10; 3467-81.
- Stajich, J.M., Gilchrist, J.M., Lennon, F., Lee, A., Yamaoka, L., Rosi, B., Gaskell, P.C., Pritchard, M., Donald, L., Roses, A.D., Vance, J.M. et Pericak-Vance, M.A.; Confirmation of linkage of oculopharyngeal muscular dystrophy to chromosome 14q11.2-q13 in American families suggests the existence of a second causal mutation, *Neuromuscul Disord* (1997) 7 Suppl 1; S75-81.
- Stromme, P., Mangelsdorf, M.E., Shaw, M.A., Lower, K.M., Lewis, S.M., Bruyere, H., Lutchterath, V., Gedeon, A.K., Wallace, R.H., Scheffer, I.E., Turner, G., Partington, M., Frints, S.G., Fryns, J.P., G.R., S., Mulley, J.C. et Gecz, J.; Mutations in the human ortholog of *Aristaless* cause X-linked mental retardation and epilepsy, *Nat. Genet.* (2002) 30; 441-445.

- Sugaya, K., Matsubara, S., Miyamoto, K., Kawata, A. et Hayashi, H.; An aggregate-prone conformational epitope in trinucleotide repeat diseases, *Neuroreport* (2003) 14; 2331-5.
- Suzuki, T., Nakagawa, M., Yoshikawa, A., Sasagawa, N., Yoshimori, T., Ohsumi, Y., Nishino, I., Ishiura, S. et Nonaka, I.; The first molecular evidence that autophagy relates rimmed vacuole formation in chloroquine myopathy, *J Biochem (Tokyo)* (2002) 131; 647-51.
- Taneja, K.L.; Localization of trinucleotide repeat sequences in myotonic dystrophy cells using a single fluorochrome-labeled PNA probe, *Biotechniques* (1998) 24; 472-6.
- Taneja, K.L., McCurrach, M., Schalling, M., Housman, D. et Singer, R.H.; Foci of trinucleotide repeat transcripts in nuclei of myotonic dystrophy cells and tissues, *J. Cell. Biol.* (1995) 128; 995-1002.
- Tavanez, J.P., Calado, P., Braga, J., Lafarga, M. et Carmo-Fonseca, M.; In vivo aggregation properties of the nuclear poly(A)-binding protein PABPN1, *Rna* (2005) 11; 752-62.
- Taylor, E.W.; Progressive vagus-glossopharyngeal paralysis with ptosis: a contribution to the group of family diseases, *The Journal of Nervous and Mental Diseases* (1915) 42; 129-139.
- Timchenko, L.T., Miller, J.W., Timchenko, N.A., DeVore, D.R., Datar, K.V., Lin, L., Roberts, R., Caskey, C.T. et Swanson, M.S.; Identification of a (CUG)<sub>n</sub> triplet repeat RNA-binding protein and its expression in myotonic dystrophy, *Nucleic Acids Res.* (1996) 24; 4407-14.
- Timchenko, L.T., Tapscott, S.J., Cooper, T.A. et Monckton, D.G.; Myotonic dystrophy: discussion of molecular basis, *Adv. Exp. Med. Biol.* (2002) 516; 27-45.
- Timchenko, N.A., Cai, Z.J., Welm, A.L., Reddy, S., Ashizawa, T. et Timchenko, L.T.; RNA CUG repeats sequester CUGBP1 and alter protein levels and activity of CUGBP1, *J. Biol. Chem.* (2001) 276; 7820-6.
- Timchenko, N.A., Patel, R., Iakova, P., Cai, Z.J., Quan, L. et Timchenko, L.T.; Overexpression of CUG triplet repeat binding protein, CUGBP1, in mice inhibits myogenesis, *J. Biol. Chem.* (2004a) 279; 13129-39.
- Timchenko, N.A., Patel, R., Iakova, P., Cai, Z.J., Quan, L. et Timchenko, L.T.; Overexpression of CUG triplet repeat-binding protein, CUGBP1, in mice inhibits myogenesis, *J. Biol. Chem.* (2004b) 279; 13129-39.
- Timchenko, N.A., Welm, A.L., Lu, X. et Timchenko, L.T.; CUG repeat binding protein (CUGBP1) interacts with the 5' region of C/EBPbeta mRNA and regulates translation of C/EBPbeta isoforms, *Nucleic Acids Res.* (1999) 27; 4517-25.
- Tirrell, D.A.; Putting a new spin on spider silk, *Science* (1996) 271; 39-40.
- Tome, F.M., Chateau, D., Helbling-Leclerc, A. et Fardeau, M.; Morphological changes in muscle fibers in oculopharyngeal muscular dystrophy, *Neuromuscul Disord* (1997) 7 Suppl 1; S63-9.

- Tomé, F.M.S., Askanas, V., Engel, W.K., Alvarez, R.B. et Lee, C.-S.; Nuclear inclusions in innervated cultured muscle fibers from patients with oculopharyngeal muscular dystrophy, *Neurology* (1989) 39; 926-932.
- Tomé, F.M.S. et Fardeau, M.; Nuclear inclusions in oculopharyngeal muscular dystrophy, *Acta Neuropathol. (Berl.)* (1980) 49; 85-87.
- Trochet, D., Hong, S.J., Lim, J.K., Brunet, J.F., Munnich, A., Kim, K.S., Lyonnet, S., Goridis, C. et Amiel, J.; Molecular consequences of PHOX2B missense, frameshift and alanine expansion mutations leading to autonomic dysfunction, *Hum. Mol. Genet.* (2005) 14; 3697-708.
- Turk, R., Sterrenburg, E., van der Wees, C.G., de Meijer, E.J., de Menezes, R.X., Groh, S., Campbell, K.P., Noguchi, S., van Ommen, G.J., den Dunnen, J.T. et t Hoen, P.A.; Common pathological mechanisms in mouse models for muscular dystrophies, *Faseb J* (2006) 20; 127-9.
- Uyama, E., Tsukahara, T., Goto, K., Kurano, Y., Ogawa, M., Kim, Y.J., Uchino, M. et Arahata, K.; Nuclear accumulation of expanded PABP2 gene product in oculopharyngeal muscular dystrophy, *Muscle Nerve* (2000) 23; 1549-1554.
- van der Sluijs, B.M., van Engelen, B.G. et Hoefsloot, L.H.; Oculopharyngeal muscular dystrophy (OPMD) due to a small duplication in the PABPN1 gene, *Hum Mutat* (2003) 21; 553.
- Verheesen, P., de Kluijver, A., van Koningsbruggen, S., de Brij, M., de Haard, H.J., van Ommen, G.J., van der Maarel, S.M. et Verrips, C.T.; Prevention of oculopharyngeal muscular dystrophy-associated aggregation of nuclear polyA-binding protein with a single-domain intracellular antibody, *Hum. Mol. Genet.* (2006) 15; 105-11.
- Victor, M., Hayes, R. et Adams, R.D.; Oculopharyngeal muscular dystrophy: a familial disease of late life characterized by dysphagia and progressive ptosis of the eyelids, *New England Journal of Medicine* (1962) 267; 1267-1272.
- Vinciguerra, P. et Stutz, F.; mRNA export: an assembly line from genes to nuclear pores, *Curr Opin Cell Biol* (2004) 16; 285-92.
- Wahle, E.; A novel poly(A)-binding protein acts as a specificity factor in the second phase of messenger RNA polyadenylation, *Cell* (1991) 66; 759-768.
- Wahle, E.; 3'-end cleavage and polyadenylation of mRNA precursors, *Biochim Biophys Acta* (1995) 1261; 183-194.
- Wahle, E. et Ruegsegger, U.; 3'-End processing of pre-mRNA in eukaryotes, *FEMS Microbiol Rev* (1999) 23; 277-295.
- Wang, I.C., Chen, Y.J., Hughes, D., Petrovic, V., Major, M.L., Park, H.J., Tan, Y., Ackerson, T. et Costa, R.H.; Forkhead box M1 regulates the transcriptional network of genes essential for mitotic progression and genes encoding the SCF (Skp2-Cks1) ubiquitin ligase, *Mol. Cell. Biol.* (2005a) 25; 10875-94.
- Wang, Q. et Bag, J.; Ectopic expression of a polyalanine expansion mutant of poly(A)-binding protein N1 in muscle cells in culture inhibits myogenesis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2006) 340; 815-22.

- Wang, Q., Mosser, D.D. et Bag, J.; Induction of HSP70 expression and recruitment of HSC70 and HSP70 in the nucleus reduce aggregation of a polyalanine expansion mutant of PABPN1 in HeLa cells, *Hum. Mol. Genet.* (2005b) 14; 3673-84.
- Wang, S., Hasham, M.G., Isordia-Salas, I., Tsygankov, A.Y., Colman, R.W. et Guo, Y.L.; Upregulation of Cdc2 and cyclin A during apoptosis of endothelial cells induced by cleaved high-molecular-weight kininogen, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* (2003) 284; H1917-23.
- Webb, J.L., Ravikumar, B. et Rubinsztein, D.C.; Microtubule disruption inhibits autophagosome-lysosome fusion: implications for studying the roles of aggresomes in polyglutamine diseases, *Int J Biochem Cell Biol* (2004) 36; 2541-50.
- Welm, A.L., Mackey, S.L., Timchenko, L.T., Darlington, G.J. et Timchenko, N.A.; Translational induction of liver-enriched transcriptional inhibitory protein during acute phase response leads to repression of CCAAT/enhancer binding protein alpha mRNA, *J. Biol. Chem.* (2000) 275; 27406-13.
- Wilkinson, M.F. et Shyu, A.B.; RNA surveillance by nuclear scanning?, *Nat Cell Biol* (2002) 4; E144-7.
- Wirtschafter, J.D., Ferrington, D.A. et McLoon, L.K.; Continuous remodeling of adult extraocular muscles as an explanation for selective craniofacial vulnerability in oculopharyngeal muscular dystrophy, *J Neuroophthalmol* (2004) 24; 62-7.

## **Annexe 1 : Accords des co-auteurs**

### ANNEXE III

Sujet: DEMANDE D'AUTORISATION DE REDIGER PAR ARTICLES

---

#### 1 – Identification de l'étudiant

Nom de l'étudiant: KLEIN Arnaud  
[REDACTED]

#### 2 – [REDACTED] de l'unité académique:

Faculté des Études Supérieures

#### 3 – Nom du programme:

Ph.D. en Biologie Moléculaire

#### 4 - Liste des articles proposés:

##### 1<sup>er</sup> article:

Ordre des auteurs: Corbeil-Girard Louis-Philippe, Klein Arnaud F., Sasseville A. Marie-Josée, Lavoie Hugo, Dicaire Marie-Josée, St-Denis Anick, Pagé Martin, Duranceau André, Codère François, Bouchard Jean-Pierre, Karpati Georges, Rouleau Guy A., Massie Bernard, Langelier Yves et Brais Bernard

Titre de l'article: "PABPN1 overexpression leads to upregulation of genes encoding nuclear proteins that are sequestered in oculopharyngeal muscular dystrophy nuclear inclusions".

L'article a été publié dans la revue *Neurobiology of Disease* (Vol. 18/3 (2005): 551-567)

##### 2ieme article:

Ordre des auteurs: Arnaud F. Klein, Mitsuru Ebihara, Christine Alexander, Marie-Josée Dicaire, A. Marie-Josée Sasseville, Yves Langelier, Guy A. Rouleau et Bernard Brais

Titre de l'article: " PABPN1 polyalanine domain deletion and long expansions modify its aggregation pattern and expression".

L'article a été soumis dans la revue *Experimental Cell Research*, et est actuellement en phase de révision.

## 6 – Avis et signature du Directeur de Recherche.

Le candidat a contribué de façon essentielle à la préparation du premier article et a complété presque toutes les expériences qui sous-tendent le deuxième. Les deux sont des articles complexes qui intègrent des données de manipulations souvent très différentes. Il est clair que le candidat a produit des articles de qualité qui sont le fruit d'un travail considérable. Dans ce contexte, il me semble approprié qu'il dépose sa thèse doctorale sous forme d'articles colligés.

Bernard Brais

Nom du directeur de recherche

2007-09-07

date

## 7 – Décision ou recommandation et signature du directeur de Programme

Trang Hoang

Nom du directeur de programme

24/10/07

date

## 5 – Signature et Déclaration de l'étudiant concernant les articles:

### 1<sup>er</sup> article

L'étudiant Arnaud Klein est co-1er auteur de cet article. L'étudiant a effectué la majorité du travail de biologie cellulaire, en particulier l'immunohistochimie dans le modèle cellulaire et les tissus de patients. De plus il a participé à l'analyse préliminaire des études d'expression qui a abouti à l'identification de candidats à tester sur le modèle cellulaire de la DMOP décrit dans l'article. L'étudiant a par ailleurs effectué les corrections (texte et expériences) demandées pour l'acceptation et la publication de l'article. Il a contribué largement à l'élaboration des figures et à l'écriture du texte

Louis-Philippe Corbeil-Girard, qui était alors étudiant à la maîtrise dans le laboratoire du Dr Brais, a utilisé cet article, dans une version soumise non corrigée, dans son mémoire de maîtrise du programme de Biochimie de l'Université de Montréal. Louis-Philippe Corbeil Girard a participé à toutes les étapes du projet, en particulier a été impliqué dans les études d'expression par puce Affymetrix et Northern blot, et l'analyse des résultats. Il a contribué largement à l'élaboration des figures et à l'écriture du texte.

### 2<sup>ème</sup> Article

L'étudiant Arnaud Klein est le 1<sup>er</sup> auteur de ce long article. Il a écrit l'intégralité du manuscrit. Il a effectué plus de 80% des expériences et est à l'origine de toutes les figures de l'article. Ces expériences comprennent aussi bien de la biologie moléculaire et cellulaire, que de la microscopie et des statistiques. Il a effectué toutes les corrections demandées (texte et expériences) pour le processus de révision.

KLEIN Arnaud

Nom de l'étudiant

07/09/2007

date

## ACCORD DES COAUTEURS

### 1 - Identification de l'étudiant et du programme

Arnaud Klein  
Étudiant au Programme de Biologie Moléculaire,  
Faculté de Médecine, Université de Montréal

### 2 – Description de l'article :

Corbeil-Girard Louis-Philippe\*, Klein Arnaud F.\*, Sasseville A. Marie-Josée, Lavoie Hugo, Dicaire Marie-Josée, St-Denis Anik, Pagé Martin, Duranceau André, Codère François, Bouchard Jean-Pierre, Karpati Georges, Rouleau Guy A., Massie Bernard, Langelier Yves et Brais Bernard.  
***PABPN1* overexpression leads to upregulation of genes encoding nuclear proteins that are sequestered in oculopharyngeal muscular dystrophy nuclear inclusions.**

Publié dans *Neurobiology of Disease* Vol. 18/3 (2005): 551-567

### 3 – Déclaration des co-auteurs

À titre de co-auteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Arnaud Klein inclut cet article dans sa thèse de doctorat qui a pour titre "Les inclusions intranucléaires dans la DMOP : relation entre composition, localisation et expression."

MARIE-JOSÉE DICAIRE

Coauteur

2007/10/19

Date

Bernard Brais

Coauteur

2007-10-29

Date

Coauteur

Signature

Date

Coauteur

Signature

Date

### ACCORD DES COAUTEURS

#### 1 - Identification de l'étudiant et du programme.

Arnaud Klein

Étudiant au Programme de Biologie Moléculaire,  
Faculté de Médecine, Université de Montréal

#### 2 - Description de l'article :

Corbeil-Girard Louis-Philippe\*, Klein Arnaud F.\*, Sasseville A. Marie-josée, Lavoie Hugo, Dicaire Marie-josée, St-Denis Anik, Pagé Martin, Duranceau André, Codère François, Bouchard Jean-Pierre, Karpati Georges, Rouleau Guy A., Massie Bernard, Langelier Yves et Brais Bernard.

**PABPNI overexpression leads to upregulation of genes encoding nuclear proteins that are sequestered in oculopharyngeal muscular dystrophy nuclear inclusions.**

Publié dans *Neurobiology of Disease* Vol. 18/3 (2005): 551-567

#### 3 - Déclaration des co-auteurs

À titre de co-auteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Arnaud Klein inclut cet article dans sa thèse de doctorat qui a pour titre "Les inclusions intranucléaires dans la DMOP : relation entre composition, localisation et expression."

<i>MARTIN PAGE</i>		<i>25 oct 2007</i>
-----		-----
Coauteur		Date
-----		-----
Coauteur	Signature	Date
-----	-----	-----
Coauteur	Signature	Date
-----	-----	-----
Coauteur	Signature	Date

## ACCORD DES COAUTEURS

### 1 - Identification de l'étudiant et du programme.

Arnaud Klein

Étudiant au Programme de Biologie Moléculaire,

Faculté de Médecine, Université de Montréal

### 2 – Description de l'article :

Corbeil-Girard Louis-Philippe\*, Klein Arnaud F.\*, Sasseville A. Marie-josée, Lavoie Hugo, Dicaire Marie-josée, St-Denis Anik, Pagé Martin, Duranceau André, Codère François, Bouchard Jean-Pierre, Karpati Georges, Rouleau Guy A., Massie Bernard, Langelier Yves et Brais Bernard.  
***PABPN1* overexpression leads to upregulation of genes encoding nuclear proteins that are sequestered in oculopharyngeal muscular dystrophy nuclear inclusions.**

Publié dans *Neurobiology of Disease* Vol. 18/3 (2005): 551-567

### 3 – Déclaration des co-auteurs

À titre de co-auteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Arnaud Klein inclut cet article dans sa thèse de doctorat qui a pour titre "Les inclusions intranucléaires dans la DMOP : relation entre composition, localisation et expression."

A. Marie-Josée Sasseville

Coauteur

19 oct 2007

Date

YVES LANGELIER

Coauteur

21 octobre 2007

Date

Coauteur

Signature

Date

Coauteur

Signature

Date

## ACCORD DES COAUTEURS

### 1 - Identification de l'étudiant et du programme

Arnaud Klein

Étudiant au Programme de Biologie Moléculaire,  
Faculté de Médecine, Université de Montréal

### 2 - Description de l'article :

Corbeil-Girard Louis-Philippe\*, Klein Arnaud F.\*, Sasseville A. Marie-Josée, Lavoie Hugo, Dicaire Marie-Josée, St-Denis Anik, Pagé Martin, Duranceau André, Codère François, Bouchard Jean-Pierre, Karpati Georges, Rouleau Guy A., Massie Bernard, Langelier Yves et Brais Bernard.  
***PABPN1* overexpression leads to upregulation of genes encoding nuclear proteins that are sequestered in oculopharyngeal muscular dystrophy nuclear inclusions.**

Publié dans *Neurobiology of Disease* Vol. 18/3 (2005): 551-567

### 3 - Déclaration des co-auteurs

À titre de co-auteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Arnaud Klein inclut cet article dans sa thèse de doctorat qui a pour titre "Les inclusions intranucléaires dans la DMOP : relation entre composition, localisation et expression."

	<p style="text-align: right; font-size: 1.2em;">23/10/07</p>	<p>-----</p> <p style="text-align: right;">Date</p>
<p>Coauteur</p>	<p>Signature</p>	<p>Date</p>
<p>Coauteur</p>	<p>Signature</p>	<p>Date</p>
<p>Coauteur</p>	<p>Signature</p>	<p>Date</p>

## ACCORD DES COAUTEURS

### 1 - Identification de l'étudiant et du programme

Arnaud Kléin

Étudiant au Programme de Biologie Moléculaire,

Faculté de Médecine, Université de Montréal

### 2 - Description de l'article :

Corbeil-Girard Louis-Philippe\*, Klein Arnaud F.\*, Sasseville A. Marie-Josée, Lavoie Hugo, Dicaire Marie-Josée, St-Denis Anik, Pagé Martin, Duranceau André, Codère François, Bouchard Jean-Pierre, Karpati Georges, Rouleau Guy A., Massie Bernard, Langelier Yves et Brais Bernard.

***PABPN1* overexpression leads to upregulation of genes encoding nuclear proteins that are sequestered in oculopharyngeal muscular dystrophy nuclear inclusions.**

Publié dans *Neurobiology of Disease* Vol. 18/3 (2005): 551-567

### 3 - Déclaration des co-auteurs

À titre de co-auteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Arnaud Klein inclut cet article dans sa thèse de doctorat qui a pour titre "Les inclusions intranucléaires dans la DMOP : relation entre composition, localisation et expression."

FRANCOIS CODERE  
Coauteur

22oct-2007  
Date

-----  
Coauteur

Signature

-----  
Date

-----  
Coauteur

Signature

-----  
Date

-----  
Coauteur

Signature

-----  
Date

### ACCORD DES COAUTEURS

#### 1 - Identification de l'étudiant et du programme

Arnaud Klein

Étudiant au Programme de Biologie Moléculaire,

Faculté de Médecine, Université de Montréal

#### 2 - Description de l'article :

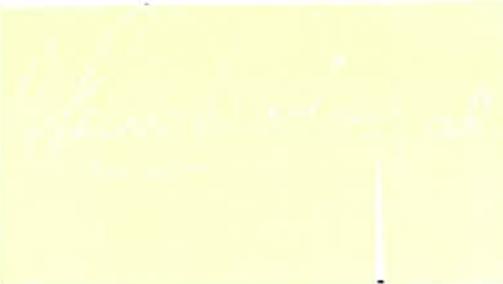
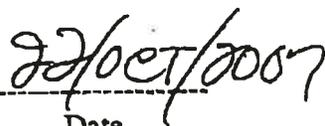
Corbeil-Girard Louis-Philippe<sup>1</sup>, Klein Arnaud F.<sup>2</sup>, Sasseville A. Marie-Josée, Lavoie Hugo, Dicaire Marie-Josée, St-Denis Anik, Pagé Martin, Duranceau André, Codère François, Bouchard Jean-Pierre, Karpati Georges, Rouleau Guy A., Massie Bernard, Langelier Yves et Brais Bernard.

***PABPNI* overexpression leads to upregulation of genes encoding nuclear proteins that are sequestered in oculopharyngeal muscular dystrophy nuclear inclusions.**

Publié dans *Neurobiology of Disease* Vol. 18/3 (2005): 551-567

#### 3 - Déclaration des co-auteurs

À titre de co-auteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Arnaud Klein inclut cet article dans sa thèse de doctorat qui a pour titre "Les inclusions intranucléaires dans la DMOP : relation entre composition, localisation et expression."

J H 14 ----- ----- -----			 ----- Date
Coauteur		Signature	Date
----- ----- -----		----- ----- -----	----- ----- -----
Coauteur		Signature	Date

## ACCORD DES COAUTEURS

### 1 - Identification de l'étudiant et du programme

Arnaud Klein  
 Étudiant au Programme de Biologie Moléculaire,  
 Faculté de Médecine, Université de Montréal

### 2 – Description de l'article :

Corbeil-Girard Louis-Philippe\*, Klein Arnaud F.\*, Sasseville A. Marie-Josée, Lavoie Hugo, Dicaire Marie-Josée, St-Denis Anik, Pagé Martin, Duranceau André, Codère François, Bouchard Jean-Pierre, Karpati Georges, Rouleau Guy A., Massie Bernard, Langelier Yves et Brais Bernard.  
***PABPN1* overexpression leads to upregulation of genes encoding nuclear proteins that are sequestered in oculopharyngeal muscular dystrophy nuclear inclusions.**

Publié dans *Neurobiology of Disease* Vol. 18/3 (2005): 551-567

### 3 – Déclaration des co-auteurs

À titre de co-auteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Arnaud Klein inclut cet article dans sa thèse de doctorat qui a pour titre "Les inclusions intranucléaires dans la DMOP : relation entre composition, localisation et expression."

BERNARD MASSIE

Coauteur

19/10/07

Date

Coauteur

Signature

Date

Coauteur

Signature

Date

Coauteur

Signature

Date

### ACCORD DES COAUTEURS

#### 1 - Identification de l'étudiant et du programme.

Arnaud Klein  
Étudiant au Programme de Biologie Moléculaire,  
Faculté de Médecine, Université de Montréal

#### 2 - Description de l'article :

Corbeil-Girard Louis-Philippe\*, Klein Arnaud F.\*, Sasseville A. Marie-josée, Lavoie Hugo, Dicaire Marie-josée, St-Denis Anik, Pagé Martin, Duranceau André, Codère François, Bouchard Jean-Pierre, Karpati Georges, Rouleau Guy A., Massie Bernard, Langelier Yves et Brais Bernard.  
**PABPNI overexpression leads to upregulation of genes encoding nuclear proteins that are sequestered in oculopharyngeal muscular dystrophy nuclear inclusions.**  
Publié dans *Neurobiology of Disease* Vol. 18/3 (2005): 551-567

#### 3 - Déclaration des co-auteurs

À titre de co-auteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Arnaud Klein inclut cet article dans sa thèse de doctorat qui a pour titre "Les inclusions intranucléaires dans la DMOP : relation entre composition, localisation et expression."

Anik St-Denis ----- Coauteur		22-10-07. ----- Date
----- Coauteur		----- Date
----- Coauteur	----- Signature	----- Date
----- Coauteur	----- Signature	----- Date

## ACCORD DES COAUTEURS

### 1 - Identification de l'étudiant et du programme.

Arnaud Klein

Étudiant au Programme de Biologie Moléculaire,

Faculté de Médecine, Université de Montréal

### 2 - Description de l'article :

Corbeil-Girard Louis-Philippe\*, Klein Arnaud F.\*, Sasseville A. Marie-josée, Lavoie Hugo, Dicaire Marie-josée, St-Denis Anik, Pagé Martin, Duranceau André, Codère François, Bouchard Jean-Pierre, Karpati Georges, Rouleau Guy A., Massie Bernard, Langelier Yves et Brais Bernard.

***PABPN1* overexpression leads to upregulation of genes encoding nuclear proteins that are sequestered in oculopharyngeal muscular dystrophy nuclear inclusions.**

Publié dans *Neurobiology of Disease* Vol. 18/3 (2005): 551-567

### 3 - Déclaration des co-auteurs

À titre de co-auteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Arnaud Klein inclut cet article dans sa thèse de doctorat qui a pour titre "Les inclusions intranucléaires dans la DMOP : relation entre composition, localisation et expression."

Louis-Philippe Corbeil Girard

Coauteur

19 oct 2007

Date

Coauteur

Signature

Date

Coauteur

Signature

Date

Coauteur

Signature

Date

## ACCORD DES COAUTEURS

### 1 - Identification de l'étudiant et du programme.

Arnaud Klein

Étudiant au Programme de Biologie Moléculaire,

Faculté de Médecine, Université de Montréal

### 2 – Description de l'article :

Corbeil-Girard Louis-Philipp<sup>e</sup>, Klein Arnaud F., Sasseville A. Marie-josée, Lavoie Hugo, Dicaire Marie-josée, St-Denis Anik, Pagé Martin, Duranceau André, Codère François, Bouchard Jean-Pierre, Karpati Georges, Rouleau Guy A., Massie Bernard, Langelier Yves et Brais Bernard.  
***PABPN1* overexpression leads to upregulation of genes encoding nuclear proteins that are sequestered in oculopharyngeal muscular dystrophy nuclear inclusions.**

Publié dans *Neurobiology of Disease* Vol. 18/3 (2005): 551-567

### 3 – Déclaration des co-auteurs

À titre de co-auteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Arnaud Klein inclut cet article dans sa thèse de doctorat qui a pour titre "Les inclusions intranucléaires dans la DMOP : relation entre composition, localisation et expression."

HUGO LAVOIE

Coauteur

2007-10-18

Date

Coauteur

Signature

Date

Coauteur

Signature

Date

Coauteur

Signature

Date

## ACCORD DES COAUTEURS

### 1 - Identification de l'étudiant et du programme

Arnaud Klein

Étudiant au Programme de Biologie Moléculaire,

Faculté de Médecine, Université de Montréal

### 2 - Description de l'article :

Corbeil-Girard Louis-Philippe<sup>1</sup>, Klein Arnaud F.<sup>2</sup>, Sasseville A. Marie-Josée, Lavoie Hugo, Dicaire Marie-Josée, St-Denis Anik, Pagé Martin, Duranceau André, Codère François, Bouchard Jean-Pierre, Karpati Georges, Rouleau Guy A., Massie Bernard, Langelier Yves et Brais Bernard.

***PABPN1* overexpression leads to upregulation of genes encoding nuclear proteins that are sequestered in oculopharyngeal muscular dystrophy nuclear inclusions.**

Publié dans *Neurobiology of Disease* Vol. 18/3 (2005): 551-567

### 3 - Déclaration des co-auteurs

À titre de co-auteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Arnaud Klein inclut cet article dans sa thèse de doctorat qui a pour titre "Les inclusions intranucléaires dans la DMOP : relation entre composition, localisation et expression."

Dr. Guy A. Rouleau

-----  
Coauteur



-----  
- 19/10/07

Date

-----  
Coauteur

Signature

Date

-----  
Coauteur

Signature

Date

-----  
Coauteur

Signature

Date

FAX 514-412-7525

### ACCORD DES COAUTEURS

#### 1 - Identification de l'étudiant et du programme

Arnaud Klein  
Étudiant au Programme de Biologie Moléculaire,  
Faculté de Médecine, Université de Montréal

#### 2 - Description de l'article :

Corbeil-Girard Louis-Philippe\*, Klein Arnaud F.\*, Sasseville A. Marie-Josée, Lavoie Hugo, Dicaire Marie-Josée, St-Denis Anik, Pagé Martin, Duranceau André, Codère François, Bouchard Jean-Pierre, Karpati Georges, Rouleau Guy A., Massie Bernard, Langelier Yves et Brais Bernard.  
***PABPN1* overexpression leads to upregulation of genes encoding nuclear proteins that are sequestered in oculopharyngeal muscular dystrophy nuclear inclusions.**  
Publié dans *Neurobiology of Disease* Vol. 18/3 (2005): 551-567

#### 3 - Déclaration des co-auteurs

À titre de co-auteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Arnaud Klein inclut cet article dans sa thèse de doctorat qui a pour titre "Les inclusions intranucléaires dans la DMOP : relation entre composition, localisation et expression."

GEORGE KARPATI		Oct 19 / 07
-----	S	-----
Coauteur		Date
-----		-----
Coauteur	Signature	Date
-----		-----
Coauteur	Signature	Date
-----		-----
Coauteur	Signature	Date



## ACCORD DES COAUTEURS

### 1 - Identification de l'étudiant et du programme.

Arnaud Klein

Étudiant au Programme de Biologie Moléculaire,

Faculté de Médecine de l'université de Montréal

### 2 – Description de l'article :

Arnaud F. Klein, Mitsuru Ebihara, Christine Alexander, Marie-Josée Dicaire, A. Marie-Josée Sasseville, Yves Langelier, Guy A. Rouleau et Bernard Brais

**PABPN1 polyalanine domain deletion and long expansions modify its expression and aggregation pattern**

Soumis à *Experimental Cell research*

### 3 – Déclaration des co-auteurs

À titre de co-auteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Arnaud Klein inclut cet article dans sa thèse de doctorat qui a pour titre "Les inclusions intranucléaires dans la DMOP : relation entre composition, localisation et expression."

A. Marie-Josée Sasseville

Coauteur

19 oct 2007

Date

YVES LANGELIER

Coauteur

21 octobre 2007

Date

Coauteur

Signature

Date

Coauteur

Signature

Date

## ACCORD DES COAUTEURS

### 1 - Identification de l'étudiant et du programme.

Arnaud Klein

Étudiant au Programme de Biologie Moléculaire,

Faculté de Médecine de l'université de Montréal

### 2 – Description de l'article :

Arnaud F. Klein, Mitsuru Ebihara, Christine Alexander, Marie-Josée Dicaire, A. Marie-Josée Sasseville, Yves Langelier, Guy A. Rouleau et Bernard Brais

**PABPN1 polyalanine domain deletion and long expansions modify its expression and aggregation pattern**

Soumis à *Experimental Cell research*

### 3 – Déclaration des co-auteurs

À titre de co-auteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Arnaud Klein inclut cet article dans sa thèse de doctorat qui a pour titre "Les inclusions intranucléaires dans la DMOP : relation entre composition, localisation et expression."

Christine Alexander

Coauteur



24/10/2007

Date

Coauteur

Signature

Date

Coauteur

Signature

Date

Coauteur

Signature

Date

## ACCORD DES COAUTEURS

### 1 - Identification de l'étudiant et du programme.

Arnaud Klein

Étudiant au Programme de Biologie Moléculaire,

Faculté de Médecine de l'université de Montréal

### 2 - Description de l'article :

Arnaud F. Klein, Mitsuru Ebihara, Christine Alexander, Marie-Josée Dicaire, A. Marie-Josée Sasseville, Yves Langelier, Guy A. Rouleau et Bernard Brais

**PABPN1 polyalanine domain deletion and long expansions modify its expression and aggregation pattern**

Soumis à *Experimental Cell research*

### 3 - Déclaration des co-auteurs

À titre de co-auteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Arnaud Klein inclut cet article dans sa thèse de doctorat qui a pour titre "Les inclusions intranucléaires dans la DMOP : relation entre composition, localisation et expression."

Mitsuru Ebihara

Oct 22, 2007

-----  
Coauteur

-----  
Date

-----  
Coauteur

-----  
Date

-----  
Coauteur

-----  
Signature

-----  
Date

-----  
Coauteur

-----  
Signature

-----  
Date

**ACCORD DES COAUTEURS****1 - Identification de l'étudiant et du programme.**

Arnaud Klein

Étudiant au Programme de Biologie Moléculaire,

Faculté de Médecine de l'université de Montréal

**2 – Description de l'article :**

Arnaud F. Klein, Mitsuru Ebihara, Christine Alexander, Marie-Josée Dicaire, A. Marie-Josée Sasseville, Yves Langelier, Guy A. Rouleau et Bernard Brais

**PABPN1 polyalanine domain deletion and long expansions modify its expression and aggregation pattern**

Soumis à *Experimental Cell research*

**3 – Déclaration des co-auteurs**

À titre de co-auteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Arnaud Klein inclut cet article dans sa thèse de doctorat qui a pour titre "Les inclusions intranucléaires dans la DMOP : relation entre composition, localisation et expression."

Dr. Guy A. Rouleau

----- Coauteur		----- Date
----- Coauteur	----- Signature	----- Date
----- Coauteur	----- Signature	----- Date
----- Coauteur	----- Signature	----- Date

19/10/07

## **Annexe 2 : Permissions des éditeurs**

**ELSEVIER LIMITED LICENSE  
TERMS AND CONDITIONS**

Oct 09, 2007

This is a License Agreement between Arnaud F Klein ("You") and Elsevier Limited ("Elsevier Limited"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Elsevier Limited, and the payment terms and conditions.

License Number	1804810328238
License date	Oct 09, 2007
Licensed content publisher	Elsevier Limited
Licensed content publication	Neuromuscular Disorders
Licensed content title	Recent studies on oculopharyngeal muscular dystrophy in Québec
Licensed content author	Jean-Pierre Bouchard, Bernard Brais, Denis Brunet, Peter V. Gould and Guy A. Rouleau
Licensed content date	October 1997
Volume number	7
Issue number	ment 1
Pages	1
Type of Use	Thesis / Dissertation
Portion	Figures/table/illustration/abstracts
Quantity	5
Format	Print
You are an author of the Elsevier article	No
Are you translating?	No
Purchase order number	
Expected publication date	Feb 2008
Elsevier VAT number	GB 494 6272 12
Permissions price	0.00 USD
Value added tax 0.0%	0.00 USD
Total	0.00 USD

Terms and Conditions

**INTRODUCTION**

The publisher for this copyrighted material is Elsevier. By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the Billing and Payment terms and conditions established by Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC"), at the time that you opened your Rightslink account and that are available at <http://myaccount.copyright.com>).

**OXFORD UNIVERSITY PRESS LICENSE  
TERMS AND CONDITIONS**

Oct 10, 2007

This is a License Agreement between Arnaud F Klein ("You") and Oxford University Press ("Oxford University Press"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Oxford University Press, and the payment terms and conditions.

License Number	1805531446957
License date	Oct 10, 2007
Licensed content title	Nuclear inclusions in oculopharyngeal muscular dystrophy consist of poly(A) binding protein 2 aggregates which sequester poly(A) RNA
Licensed content author	Angelo Calado, et. al.
Licensed content publication	Human Molecular Genetics
Licensed content publisher	Oxford University Press
Licensed content date	Sep 1, 2000
Type of Use	Thesis / Dissertation
Institution name	Univeristé de Montréal
Title of your work	les inclusions intranucléaires dans la DMOP
Publisher of your work	Université de Montréal
Expected publication date	Février 2008
Permissions cost	\$0.00
Value added tax	\$0.00
Total	\$0.00

Terms and Conditions

**STANDARD TERMS AND CONDITIONS FOR REPRODUCTION OF MATERIAL  
FROM AN OXFORD UNIVERSITY PRESS JOURNAL**

1. Use of the material is restricted to your license details specified during the order process.
2. This permission covers the use of the material in the English language in the following territory: world. For permission to translate any material from an Oxford University Press journal into another language, please email [journals.permissions@oxfordjournals.org](mailto:journals.permissions@oxfordjournals.org)
3. This permission is limited to the particular use authorized in (1) above and does not allow you to sanction its use elsewhere in any other format other than specified above, nor does it apply to quotations, images, artistic works etc that have been reproduced from other sources which may be part of the material to be used.
4. No alteration, omission or addition is made to the material without our written consent. Permission must be re-cleared with Oxford University Press if/when you decide to reprint.
5. The following credit line appears wherever the material is used: author, title, journal, year, volume, issue number, pagination, by permission of Oxford University Press or the sponsoring society if the journal is a society journal. Where a journal is being published on