

Direction des bibliothèques

AVIS

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

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

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

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

Facteurs de sévérité et rôle des protéines à domaine polyalanine
dans la Dystrophie Musculaire Oculopharyngée

Par
Christine Alexander

Programmes de biologie moléculaire
Faculté des Études Supérieures (FES)

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention d'une Maîtrise ès Sciences (M.Sc.)
en biologie moléculaire

Août, 2006

©, Christine Alexander, 2006



Université de Montréal
Faculté des Études Supérieures

Ce mémoire intitulé :

Facteurs de sévérité et rôle des protéines à domaine polyalanine

dans la Dystrophie Musculaire Oculopharyngée

Présenté par :

Christine Alexander, B.Sc.

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Christian F. Deschepper, M.D.

président-rapporteur

Bernard Brais, M.D., Ph.D.

directeur de recherche

codirecteur (s'il y a lieu)

Michael Sinnreich, M.D., Ph.D.

membre du jury

Résumé

Problématique: La Dystrophie Musculaire Oculopharyngée (DMOP) est une maladie à transmission autosomique dominante dont la prévalence est élevée au Québec (1 :1000). La maladie se manifeste en général après l'âge de 40 ans par une chute des paupières et des problèmes de déglutition. Il peut s'y ajouter, dans les formes les plus sévères, une faiblesse proximale importante. Les mutations responsables de la DMOP provoquent une élongation du domaine polyalanine de la protéine PABPN1 (Poly(A)-Binding Protein Nuclear 1). Cette élongation entraîne l'accumulation de PABPN1 dans des inclusions intranucléaires. **Objectifs :** Ce projet de maîtrise visait à 1) déterminer si la deuxième copie du gène PABPN1 influence la sévérité de la DMOP, 2) déterminer si la sévérité suit un mode de transmission mendélien, 3) d'établir si d'autres protéines avec des domaines polyalanine ont une tendance à l'agrégation et 4) d'établir si d'autres protéines avec des domaines polyalanines ont tendance à co-agréger avec PABPN1. **Méthodes :** 1) L'haplotypage et l'analyse des arbres généalogiques de patients sévères ont été effectués afin de déterminer les éléments génétiques de la sévérité. 2) Transfections de protéines contenant des domaines polyalanine avec ou sans PABPN1 mutée afin de déterminer le rôle des domaines polyalanine dans la DMOP. **Conclusions :** 1) La deuxième copie du gène *PABPN1* n'influence pas la sévérité dans notre cohorte. 2) Il semble tout de même y avoir un mode de transmission dominant à la sévérité. 3) Les protéines avec des domaines polyalanine ont une tendance à l'agrégation. 4) Il n'y a pas de co-agrégation entre PABPN1 et les protéines avec des domaines polyalanine.

Mots clés :

Polyalanine
Dystrophie Musculaire Oculopharyngée (DMOP)
Poly(A)-Binding Protein Nuclear 1 (PABPN1)
Inclusions intranucléaires
Sévérité

Abstract

Problem: Oculopharyngeal muscular dystrophy (OPMD) is an adult-onset disease with a worldwide distribution. It has a high prevalence of 1:1000 in Quebec. OPMD usually presents in the fifth decade with progressive eyelid drooping and swallowing difficulty. A more severe phenotype is associated with a proximal limb weakness. Dominant OPMD is caused by short (GCN) expansions in the polyadenylate-binding protein nuclear 1 gene (PABPN1). The mutations cause the lengthening of the polyalanine domain at the N-terminus of PABPN1. This leads to the accumulation of PABPN1 in intranuclear inclusions (INIs) of skeletal muscles. **Objectives:** This M.Sc. project aimed to 1) determine if the second copy of the PABPN1 gene has an influence on the severity of OPMD, 2) determine the type of genetic inheritance of the severe phenotype of OPMD, 3) determine if other proteins with polyalanine domains have a tendency to aggregate and 4) determine if PABPN1 recruits other proteins with polyalanine domains in the INIs. **Methods:** 1) Haplotypes and pedigrees of families with severe cases were analyzed to determine the genetic aspect of severity. 2) Polyalanine containing proteins were transfected in HeLa cells with or without PABPN1 in order to determine the role of polyalanine domains in OPMD. **Conclusions:** 1) The trans copy of the PABPN1 gene does not influence severity. 2) Severity in our cohort seems to be autosomal dominant. 3) Proteins with polyalanine domains have a tendency to aggregate. 4) PABPN1 does not seem to recruit other proteins with polyalanine domains in the INIs.

Key Words

Polyalanine
Oculopharyngeal muscular dystrophy (OPMD)
Poly(A)-Binding Protein Nuclear 1 (PABPN1)
Intranuclear inclusions (INIs)
Severity

Table des Matières

Identification du jury.....	ii
Résumé.....	iii
Abstract.....	iv
Table des matières.....	v
Liste des figures.....	x
Liste des tableaux.....	xii
Liste des sigles et abréviations.....	xiii
Remerciements.....	xvi
Avant-propos.....	xvii

1. Chapitre 1 : Introduction générale à la Dystrophie Musculaire Oculopharyngée..1

1.1	Caractéristiques cliniques de la DMOP.....	1
1.1.1	Phénotype : la ptose et la dysphagie.....	1
1.1.2	Phénotype : autre signes et symptômes de la DMOP.....	2
1.1.3	Diagnostic clinique.....	2
1.1.4	Pronostique.....	4
1.1.5	Prévalence et incidence.....	4
1.2	Génétique de la DMOP.....	6
1.2.1	Mode de transmission.....	6
1.2.2	Mutations responsables de la DMOP.....	6
1.2.2.1	Expansions GCG.....	7
1.2.2.2	Expansions cryptiques (GCN).....	7
1.2.2.3	Mutation ponctuelle (GGG → GCG).....	9
1.2.3	Pénétrance.....	9
1.2.4	Mécanisme des mutations responsables de la DMOP.....	9
1.3	Caractéristiques du gène <i>PABPN1</i>	10
1.3.1	Structure du gène <i>PABPN1</i>	10
1.3.2	Expression du gène <i>PABPN1</i>	10
1.4	Rôles de PABPN1.....	12

1.4.1	La polyadénylation.....	12
1.4.1.1	Clivage de l'ARNm.....	12
1.4.1.2	La polyadénylation.....	13
1.4.2	Régulation de l'expression de gènes spécifiques au muscle.....	15
1.5	Caractéristiques de la protéine PABPN1.....	16
1.5.1	Localisation cellulaire.....	16
1.5.1.1	Sous-localisation nucléaire.....	16
1.5.2	Structure.....	16
1.5.2.1	Domaine polyalanine.....	17
1.5.2.2	Domaine coiled-coil.....	17
1.5.2.3	Domaine de liaison à l'ARN (RRM).....	17
1.5.2.4	Signal de localisation nucléaire.....	19
1.5.3	Modifications post-traductionnelles de PABPN1.....	19
1.5.4	Interactions protéine-protéine.....	19
1.6	Histopathologie de la DMOP.....	20
1.6.1	Les inclusions intranucléaires (IIN).....	20
1.6.1.1	Structures et caractéristiques des IINs.....	20
1.6.1.2	La composition des IINs.....	21
1.6.2	Les vacuoles bordées.....	23
1.6.2.1	Structures et caractéristiques.....	23
1.6.2.2	La composition des vacuoles bordées.....	23
1.7	Questions et approches expérimentales.....	23
2.	Chapitre 2 : Étude des formes sévères de la DMOP.....	25
2.1	Phénotype sévère.....	25
2.2	Corrélation génotype-phénotype.....	25
2.2.1	Homozygotes.....	25
2.2.2	Hétérozygotes composés.....	26
2.2.3	Longueurs de l'expansion et pathologies.....	28
2.3	Neuropathie.....	29

2.4	Créatine Kinase.....	29
2.5	Objectifs de l'étude	30
2.5.1	Déterminer les caractéristiques cliniques de nos cas sévères	30
2.5.2	Déterminer si la deuxième copie du gène <i>PABPN1</i> influence la sévérité de la DMOP	30
2.5.3	Déterminer le mode de transmission de la sévérité	31
2.6	Matériels et Méthodes.....	31
2.6.1	Recrutement des patients canadiens-français.....	31
2.6.2	Diagnostic de la sévérité chez les patients canadiens-français	31
2.6.3	Analyses Statistiques.....	33
2.6.4	Extraction de l'ADN génomique et vérification de la taille de l'expansion.....	33
2.6.5	Haplotypage et création des arbres généalogiques.....	33
2.6.6	Analyse de liaison.....	34
2.7	Résultats.....	34
2.7.1	Caractéristiques des patients sévères et classiques.....	34
2.7.2	L'âge de la première manifestation de la DMOP.....	34
2.7.3	Faiblesse Musculaire	37
2.7.4	Limitation des Mouvements Oculaires.....	39
2.7.5	Les réflexes ostéotendineux.....	39
2.7.6	Créatine Kinase.....	41
2.7.7	Analyse de la deuxième copie du gène <i>PABPN1</i>	44
2.7.8	Détermination du mode de transmission de la DMOP sévère.....	47
2.7.9	Analyse de liaison du chromosome 14	50

3. Chapitre 3 : Le rôle des protéines à domaine polyalanine dans la DMOP

3.1	Oligomères de polyalanine.....	53
3.1.1	Propriétés des oligomères de polyalanine	53
3.1.1.1	Tendance à l'agrégation.....	53
3.1.1.2	Résistance à la dégradation et à la dénaturation.....	53
3.1.2	Propriétés des oligomères de polyalanine <i>in vitro</i>	54
3.2	PABPN1 et l'agrégation.....	54

3.2.1	L'agrégation dans les modèles cellulaires de la DMOP.....	54
3.2.2	L'agrégation dans les modèles transgéniques de la DMOP.....	55
3.2.3	Essai thérapeutique : l'anti-agrégation.....	55
3.3	Gain de fonction et mécanismes pathophysiologiques de la DMOP.....	56
3.4	Autres protéines avec des domaines polyalanines.....	56
3.4.1	Fonction de la polyalanine dans le contexte protéique.....	56
3.4.2	Maladies causées par une expansion du domaine polyalanine.....	57
3.4.2.1	L'agrégation dans les maladies à polyalanine.....	57
3.5	Objectifs.....	58
3.6	Matériels et méthodes.....	61
3.6.1	Explication de la méthode de Clonage Gateway®.....	61
3.6.1.1	Première étape de recombinaison : réaction BP.....	61
3.6.1.2	Deuxième étape de recombinaison : réaction LR.....	61
3.6.2	Clonage.....	63
3.6.2.1	Acquisition des cDNA.....	63
3.6.2.2	Transformations.....	63
3.6.2.3	Extractions de l'ADN plasmidique.....	63
3.6.2.4	Digestions.....	63
3.6.2.5	Purifications des cDNA.....	65
3.6.2.6	PCR pour ajouter les sites de recombinaison attB.....	65
3.6.2.7	Réaction BP.....	67
3.6.2.8	Séquençage des cDNA.....	67
3.6.2.9	Réaction LR.....	67
3.6.3	Lignées et cultures cellulaires.....	71
3.6.4	Transfections.....	71
3.6.5	Western blot.....	71
3.6.6	Immunofluorescence.....	72
3.7	Résultats.....	73
3.7.1	Les constructions expriment les protéines de fusion dans le bon cadre de lecture.....	73
3.7.2	Les protéines avec des domaines polyalanines ont une tendance à l'agrégation.....	75

3.7.3	Il n'y a pas de co-agrégation entre PABPN1 et les protéines avec des domaines polyalanines sélectionnés.....	77
-------	--	----

4. Chapitre 4 : Discussion des résultats et conclusions

4.1	Résumé des résultats et conclusions générales.....	79
4.1.1	Résumé du chapitre 2.....	79
4.1.2	Résumé du chapitre 3.....	79
4.2	Phénotype de la sévérité chez nos patients canadiens-français.....	80
4.3	Génétique de la sévérité chez nos patients canadiens-français.....	80
4.3.1	Analyse de la deuxième copie du gène PABPN1.....	80
4.3.2	Mode de transmission et analyse de liaison du chr. 14.....	82
4.4	L'agrégation des protéines avec des domaines polyalanines.....	83
4.5	PABPN1 ne recrute pas d'autres protéines polyalanine pour former les IINs...	85
4.6	Rôles possibles des inclusions intranucléaires dans la DMOP.....	85
4.7	Atteinte sélective de certains tissus dans la DMOP.....	89
4.8	Conclusion générale.....	90
	Bibliographie.....	91

Liste des Figures

Figure 1	Phénotype de la DMOP.....	2
Figure 2	Distribution géographique des cas de DMOP.....	5
Figure 3	Les mutations dans PABPN1.....	8
Figure 4	Structure du gène PABPN1.....	11
Figure 5	La réaction de la polyadénylation.....	14
Figure 6	La protéine PABPN1.....	18
Figure 7	Les inclusions intranucléaires.....	22
Figure 8	Les vacuoles bordées.....	22
Figure 9	La DMOP est causée par des mutations (GCN) ₁₂₋₁₇ dans le gène PABPN1.....	27
Figure 10	Distribution d'âge.....	36
Figure 11	Comparaison de la faiblesse musculaire entre patients sévères et classiques.....	38
Figure 12	Comparaison de la limitation des mouvements oculaires entre patients sévères et classiques	40
Figure 13	Comparaison de l'aréflexie entre patients sévères et classiques	40
Figure 14	Niveau de créatine kinase (CK) plasmatique de patients sévères et classiques.....	42
Figure 15	Courbe ROC pour le niveau plasmatique de CK	43
Figure 16	Haplotypage d'une famille canadienne-française avec l'expansion (GCN) ₁₃ afin d'analyser si le deuxième allèle influence la sévérité.....	45
Figure 17	Arbres généalogiques de 23 familles canadiennes-françaises atteintes de la DMOP sévères avec l'expansion (GCN) ₁₃	48
Figure 18	Carte physique du locus de la DMOP et analyse de liaison paramétrique multipoint du chromosome 14 chez neuf familles canadiennes-françaises	51
Figure 19	Représentation schématique des protéines sélectionnées.....	60
Figure 20	Méthode de clonage Gateway®.....	62
Figure 21	Sites de restrictions et caractéristiques du vecteur pOTB7.....	64
Figure 22	Vecteur pDONR221.....	68

Figure 23	Vecteur pcDNA-DEST53.....	70
Figure 24	Western blot démontrant que les constructions Gateway expriment les protéines de fusion dans le bon cadre de lecture.....	74
Figure 25	Formation d'inclusions par surexpression de protéines avec un domaine polyalanine.....	76
Figure 26	PABPN1 ne recrute pas d'autres protéines polyalanines pour former les INIs.....	78
Figure 27	Mécanisme pathophysiologique possible de la DMOP impliquant des facteurs de transcription.....	88

Liste des tableaux

Tableau I	Critères cliniques permettant l'identification des cas sévère de la DMOP.....	32
Tableau II	Échelle clinique de la force musculaire.....	32
Tableau III	Caractéristiques des patients sévères et classiques atteints de la DMOP.....	35
Tableau IV	Degré de partage du deuxième allèle de PABPN1 entre patients apparentés	46
Tableau V	Nombre de patients sévères et classiques apparentés chez 23 familles canadiennes-françaises avec l'expansion (GCN) ₁₃	49
Tableau VI	Amorces conçues pour l'ajout de la séquence attB1 et attB2 au cDNA d'intérêt.....	66
Tableau VII	Temps d'hybridation et d'élongation des PCR pour l'addition du site de recombinaison attB au cDNA d'intérêt.....	66
Tableau VIII	Amorces utilisées pour le séquençage automatique des cDNA.....	69

Liste des sigles et abréviations

ARNpolIII	ARN polymérase II
ARX	Aristaless related homeobox
BPESII	Blepharophimosis/ptosis/epicanthus-invertus de type II
BHLHB3	Basic helix-loop-helix class B, 3
CAG	Chicken beta Actin promoter with CMV enhancer
CBP	CREB Binding Protein
CCD	Cleidocranial dysplasia
CCHS	Congenital central hypoventilation syndrome
CF I	Cleavage factor I
CF II	Cleavage factor II
CK	Créatine Kinase
CPSF	Cleavage and polyadénylation specificity factor
CRE	cAMP Response Element
CSfF	Cleavage Stimulatory factor
CUGBP1	CUG Binding Protein
DES	Distal Sequence Element
DMEM	Dulbecco's Modification of Eagle's Medium
DMOP	Dystrophie Musculaire Oculopharyngée
DR	Différence de Risque
EIF4G	Eukaryotic Initiation Factor 4G
FOXL2	Forkhead-box L2

GST	Glutathione-S-Transferase
HFGS	hand foot genital syndrome
HOXA13	Homeobox A13
HOXD13	Homeobox D13
HPE5	Holoprocéphalie type 5
HNRPA1	Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A1
HSA	Human Skeletal Actin promoter
HSP40	Heat Shock Protein 40
HSP70	Heat Shock Protein 70
IC-95 %	Intervalle de Confiance
ID4	DNA-binding inhibitor ID-4
IIN	Inclusion Intranucléaire
LB	Luria Broth
MI	Membres Inférieurs
MS	Membres Supérieurs
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NLS	Nuclear Localisation Signal
NPL	Non-Parametric Linkage
NS1A	Influenza A NS1 protein
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Men
OPMD	Oculopharyngeal Muscular Dystrophy
PABPN1	Poly(A)-Binding Protein Nuclear 1
PAP	PolyA polymerase

PCR	Polymerase Chain Reaction
PHOX2B	Paired-type homeobox 2B
Poly(A)	PolyAdénylate
PRMT1	HMT1 hnRP methyltransferase-like1
PRMT3	HMT1 hnRP methyltransferase-like3
RUNX2	Runt-Related Transcription factor 2
ROC	Receiver Operator Characteristics
ROT	Réflexe Ostéotendineux
RR	Risque Relatif
RRM	RNA Recognition Motif
SBF	Sérum de Boeuf Fœtal
SKIP	SKI-interacting protein
SNP	Système Nerveux Périphérique
SOX3	Sex determining region Y-box 3
SFRS3	splicing factor, arginine/serine-rich 2
SPD	Sympolydactylie
TBX2	T-box 2
UTR	Untranslated Region
YFP	Yellow Fluorescent Protein
ZIC2	Zic family member 2
ZNF358	Zinc Finger protein 358

NB : Pour les acides aminés le code classique de 1 ou 3 lettres est employé

Remerciements

Je tiens à remercier sincèrement mon directeur de recherche, le Dr Bernard Brais, de m'avoir permis d'entreprendre ce stage de maîtrise dans son laboratoire et de m'avoir encouragée à poursuivre la médecine.

Je tiens également à remercier toutes les personnes du laboratoire qui m'ont aidée à la réalisation de mon projet. Un grand merci à Marie-Josée Dicaire pour son support et son assistance technique. Mes remerciements les plus sincères à Lina Loisel, infirmière de recherche, pour le recrutement des patients sévères. Un merci tout spécial à Véronique Bolduc, Arnaud Klein, Martine Tétreault et Isabelle Thiffault pour leur support et à la relecture du manuscrit.

Je réserve un merci tout spécial à mon mari, Patrick, ainsi qu'à ma famille : Ross, Claudette, Kathleen et Jason. Ils m'ont toujours épaulée et encouragée à poursuivre des études universitaires. Leur soutien a été pour moi un atout déterminant dans la réussite de mes objectifs.

Avant-Propos

Depuis mon enfance, j'ai toujours été passionnée par la science. Ceci m'a mené à faire des études universitaires en sciences fondamentales. Plus particulièrement un baccalauréat en biochimie et une maîtrise en biologie moléculaire. Toutefois, bien que j'aime toujours les sciences fondamentales, j'envisage une carrière en médecine. En effet, j'ai été attirée par la médecine, par ses côtés scientifique et humanitaire. Ainsi, je suis présentement une étudiante en 3^{ième} année de médecine à l'Université de Montréal.

Malgré ma préférence pour la médecine, je réalise qu'il y a une relation étroite entre les sciences fondamentales et la médecine clinique. En effet, la médecine a multiplié ses voies d'investigation, perfectionné ses outils de diagnostic et de soins grâce aux avancées des sciences fondamentales. En effet, les fondements de tout traitement médical reposent sur les percées de la recherche fondamentale.

Ce mémoire porte sur la Dystrophie Musculaire Oculopharyngée (DMOP). Celle-ci est une maladie à transmission autosomique dominante dont la prévalence est élevée chez les canadiens-français. Elle se caractérise par une difficulté à avaler, une chute des paupières ainsi qu'une faiblesse proximale des membres. Jusqu'à présent, il n'y a pas de traitement pour la DMOP. J'espère donc que les résultats et conclusions présentés dans ce mémoire pourront contribuer à l'avancement des connaissances pour qu'un jour les patients atteints de la DMOP puissent prendre avantage des progrès de la recherche fondamentale.

1. Chapitre 1

Introduction générale à la Dystrophie Musculaire Oculopharyngée

1.1 Caractéristiques cliniques de la DMOP

1.1.1 Phénotype : la ptose et la dysphagie

La dystrophie musculaire oculopharyngée (DMOP) est une maladie insidieuse à manifestation tardive dont les symptômes apparaissent entre l'âge de 40 et de 50 ans. Elle se manifeste par deux symptômes: une chute des paupières (ptose) et des problèmes de déglutition (dysphagie).

La ptose occasionnée par une faiblesse au niveau des muscles élévateurs de paupières (levator palpebrae) est toujours bilatérale, mais peut être asymétrique. Celle-ci cause un rétrécissement au niveau des fentes palpébrales, provoquant ainsi une limitation du champ visuel. Afin de contrer cette limitation, il y a une inclinaison de la tête vers l'arrière et un recrutement des muscles frontaux (Brais et Tomé 2004). Ceci provoque un plissement du front et l'élévation des sourcils (figure 1). Malgré ces compensations, sans chirurgie (blepharoplastie) il peut y avoir fermeture complète des fentes palpébrales.

La dysphagie est provoquée par une faiblesse au niveau des muscles bucco-pharyngés. Elle survient le plus souvent lors de la prise d'aliments solides, puis s'aggrave progressivement se produisant ensuite lors de l'ingestion de liquides. La dysphagie peut s'accompagner de fausses-routes alimentaires : des régurgitations et des aspirations trachéales (Brais et Tomé 2004). Conséquemment, la dysphagie peut mener à une perte de poids et des pneumonies d'aspirations. La myotomie (ablation du tissu musculaire) du muscle crycopharyngé permet d'améliorer la déglutition chez les patients (Duranceau, 1997).



FIGURE 1 : Phénotype de la DMOP. Apparence d'une patiente de 76 ans souffrant de la DMOP. Malgré une chirurgie antérieure, la patiente présente une ptose bilatérale symétrique et conséquemment, une diminution des fentes palpébrales. Notez l'élévation des sourcils, le plissement du front, et l'atrophie des muscles du visage (masséters et temporaux).

1.1.2 Phénotype : autre signes et symptômes de la DMOP

Au départ, l'atteinte par la DMOP est surtout restreinte aux muscles élévateurs des paupières et les muscles bucco-pharyngés. Toutefois, il y a également une atteinte sélective d'autres muscles squelettiques. Ainsi, il y a d'autres signes et symptômes associés à la DMOP.

L'atteinte des muscles extraoculaires peut entraîner une perte de la mobilité de l'œil (ophtalmoparésie) et occasionnellement de la diplopie (vision double), tandis que l'atteinte des muscles du larynx provoque un changement au niveau de la voix (dysphonie). Dans plusieurs cas la langue est aussi gravement touchée (Bouchard *et al.* 1997, Brais *et al.* 1998). L'atrophie et la faiblesse de la langue contribuent aux fausses-routes alimentaires (aspirations trachéales).

Fréquemment, une faiblesse proximale au niveau des membres inférieurs est associée à la DMOP. Celle-ci est secondaire à une atteinte des muscles de la ceinture pelvienne (dont l'iliopsoas). Cette faiblesse peut provoquer une diminution de la mobilité. Ainsi, certains patients nécessitent un fauteuil roulant (Bouchard *et al.* 1997).

Il y a également une faiblesse proximale au niveau des membres supérieurs. Cependant, cette faiblesse est moins fréquente que celle des membres inférieurs. L'affaiblissement des membres supérieurs (proximaux) est causé par une atteinte des muscles de la ceinture scapulaire (dont les deltoïdes).

1.1.3 Diagnostic clinique

Les critères cliniques suivants sont utilisés pour poser un diagnostic de la DMOP : (1) une histoire familiale positive pour la DMOP, (2) au moins une fente palpébrale au repos mesurant moins de 8 mm (ou des antécédents de blépharoplastie) et (3) un temps de déglutition de plus de 7 secondes lors de l'ingestion de 80 mL d'eau froide (Brais *et al.* 1995).

1.1.4 Pronostique

La DMOP est une maladie à progression lente. Néanmoins, il y a une diminution de la qualité de vie. Les principales causes de décès reliées à la maladie sont des conséquences de la dysphagie, soit (1) la malnutrition et (2) la pneumonie d'aspiration (surtout chez les patients d'âges avancés) (Brais 2003). Toutefois, la durée de vie chez les patients atteints de la DMOP n'est pas écourtée (Brais et Tomé 2004).

1.1.5 Prévalence et incidence

L'incidence et la prévalence de la DMOP sont faibles. Malgré cela, la DMOP a une distribution mondiale avec des cas rapportés dans plus de 30 pays (figure 2) (Brais, Tomé 2004). Toutefois, la présence d'effets fondateurs démontre une fréquence plus élevée de la DMOP dans la population juive Bukhara en Israël (1 :600) et au Québec (1 :1000) (Blumen *et al.* 1997; Barbeau 1966; Brais *et al.* 1995). Par ailleurs, des groupes de malades sont bien caractérisés en Angleterre (Hill *et al.* 2001), en France (Brunet *et al.* 1997; Perie *et al.* 1997), en Uruguay (Medici *et al.* 1997, Rodriguez *et al.* 2005), dans la population hispano-américaine du Nouveau-Mexique (Becher *et al.* 2001), en Italie (Meola *et al.* 1997; Mirabella *et al.* 2000) et au Japon (Uyama *et al.* 1996; Uyama *et al.* 1997; Nagashima *et al.* 2000).

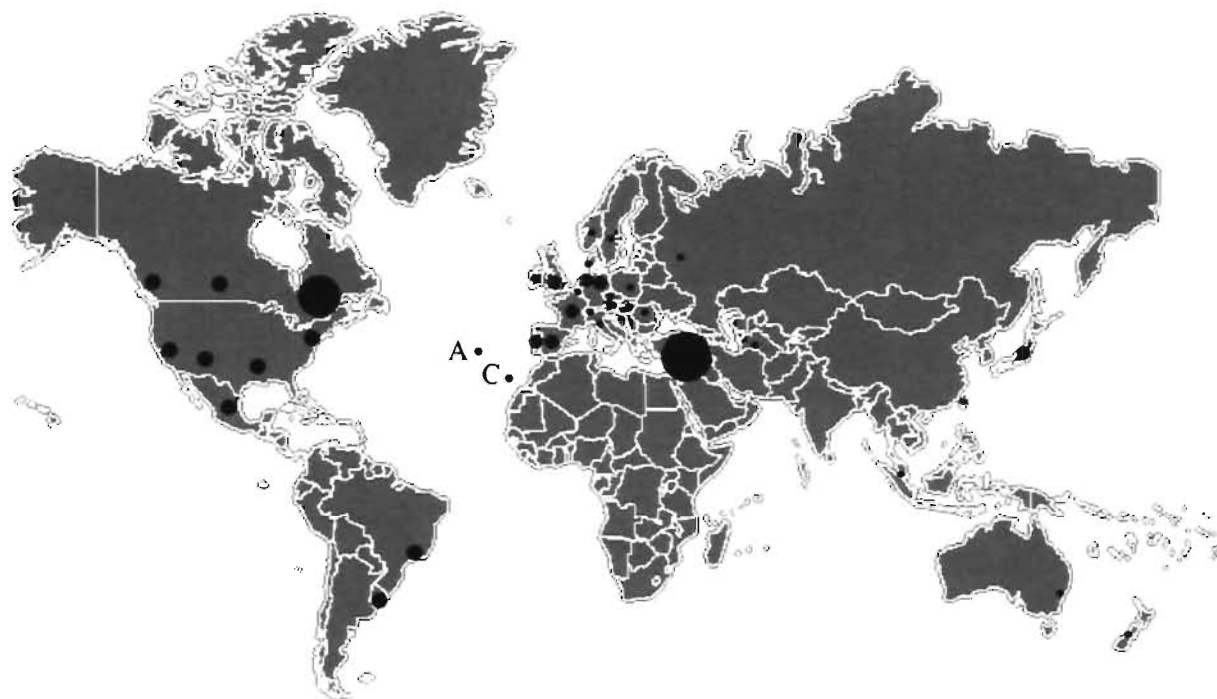


FIGURE 2 : Distribution géographique des cas de DMOP. La DMOP est une maladie à distribution mondiale, dont la prévalence est plus élevée au Québec (1 :1000) et dans la population juive Bukhara en Israël (1 :600). A: Azores & C: Canary island.

1.2 Génétique de la DMOP

1.2.1 Mode de transmission

La DMOP est une maladie le plus souvent héritée sous un mode autosomique dominant (OMIM : 164300). Il existe aussi une forme récessive de la DMOP (OMIM :257950), dont l'apparition des symptômes est plus tardif (Brais *et al.* 1998). La fréquence de la DMOP récessive est beaucoup plus faible que celle de la dominante (Hill *et al.* 2001). Au Québec, la fréquence de la forme récessive est de 2 % (Brais *et al.* 1998).

1.2.2 Mutations responsables de la DMOP

Les mutations responsables de la DMOP provoquent une élongation du domaine polyalanine dans la protéine PABPN1 (Poly(A)-Binding Protein Nuclear 1) (Brais *et al.* 1998). Normalement, le domaine polyalanine du gène *PABPN1*, situé sur le chromosome 14q11.2, est encodé par un triplet répété de (GCG)₆ suivi de la séquence (GCA)₃ GCG pour un total de 10 codon GCN; (GCN)₁₀. Les codons GCN codent pour l'acide aminé alanine. Chez les patients atteints de la forme autosomique dominante de la DMOP, il y a une expansion des triplets répétés allant de (GCN)₁₂ jusqu'à (GCN)₁₇. Les patients atteints de la forme autosomique récessive de la DMOP sont homozygote pour l'expansion (GCN)₁₁ (Brais *et al.* 1998).

L'élongation du domaine polyalanine de PABPN1 est provoquée par différents types d'expansion, soit par des codons GCG purs ou par des permutations de GCG et GCA (expansions cryptiques). Il y a également une mutation ponctuelle au niveau du gène *PABPN1* qui crée une élongation du domaine polyalanine de la protéine PABPN1.

1.2.2.1 Expansions GCG

Dans la majorité des familles, les mutations sont composées uniquement d'expansion de triplets GCG, c'est-à-dire, qu'il y a une insertion de 2 à 7 triplets (GCG) aux 6 triplets (GCG) préalablement présents (Brais *et al.* 1998) (figure 2C). Le génotype des patients atteints de la forme dominante correspond donc à $(GCG)_6(GCG)_{2-7}(GCA)_3GCG$. Ceci correspond à un domaine de 12 à 17 alanines.

Chez les patients atteints de la forme récessive, il y a insertion d'un seul triplet GCG. Le génotype récessif correspond à $(GCG)_6GCG(GCA)_3GCG$ (figure 2B). Bien entendu, les patients atteints de la forme récessive de la DMOP sont homozygotes pour ce génotype. Au niveau protéique, ceci correspond à un domaine de 11 alanines.

La fréquence relative des différentes tailles de mutation est variable selon le pays (Brais, Tomé 2004). Au Canada, en France, et aux États-unis, la majorité des familles présentent l'insertion $(GCG)_3$ correspondant à un domaine de 13 alanines. Alors qu'en Allemagne et en Angleterre, on retrouve aussi bien des insertions $(GCG)_3$ que $(GCG)_4$ (Hill *et al.*, 2001).

1.2.2.2 Expansions cryptiques (GCN)

Dans d'autres familles, les mutations consistent en des permutations de GCG et GCA. C'est le cas de la mutation identifiée chez les Cajuns où une insertion GCA $(GCG)_2$ a été observée (Scacheri *et al.* 1999, Schober *et al.* 2001). Une insertion $(GCA)_2(GCG)_2$ a aussi été observée dans une famille néerlandaise (van der Sluijs *et al.* 2003). Au Japon, des insertions GCA $(GCG)_3$ et $(GCA)_3(GCG)_2$ ont été observées chez deux familles différentes (Nakamoto *et al.* 2002) (figure 2C). Finalement, l'insertion $(GCA)_3GCG$ a été observée en Angleterre (Robinson *et al.* 2005) et en Allemagne (Muller *et al.* 2006).

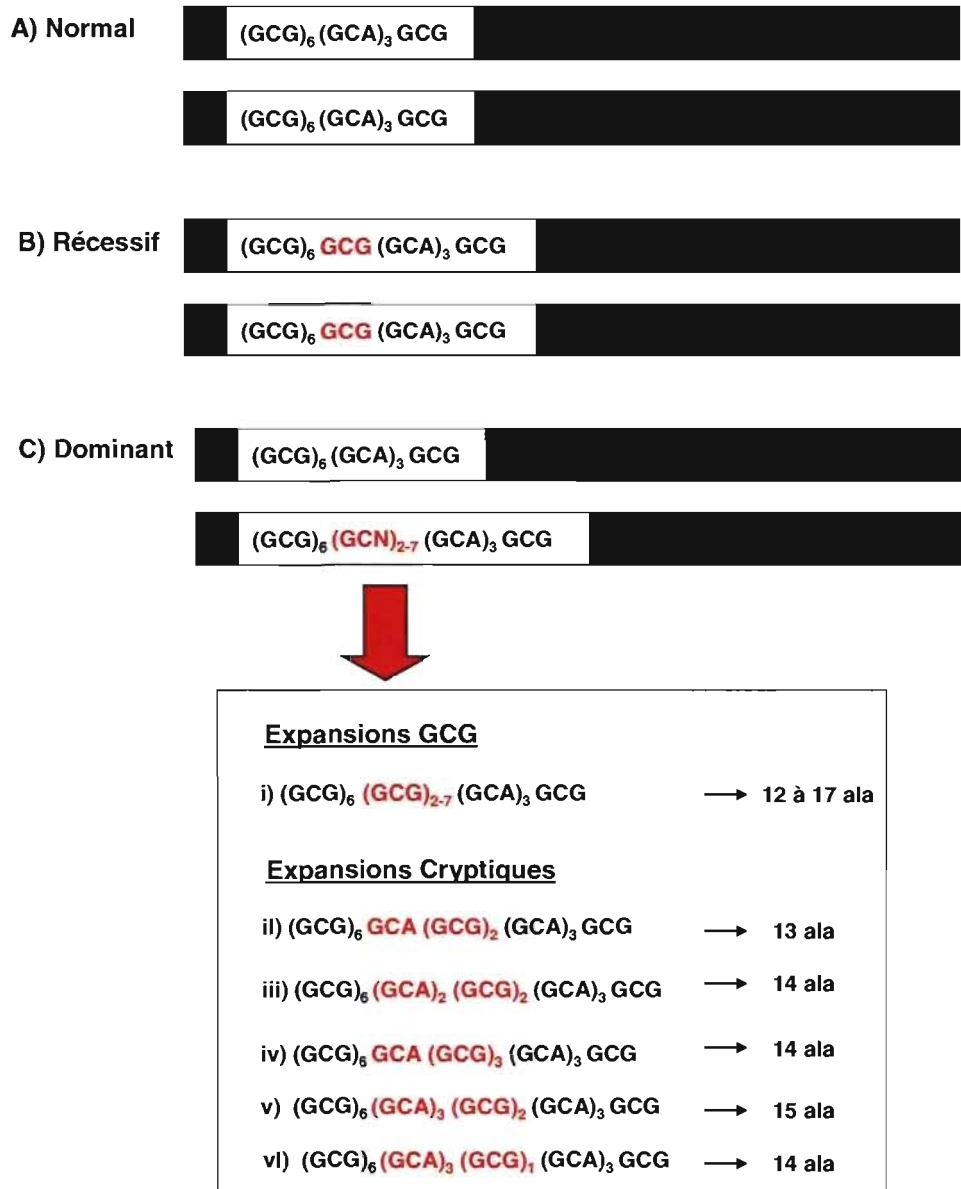


FIGURE 3. Les mutations dans *PABPN1*. La mutation dans *PABPN1* consiste en une expansion de triplet (GCN)_n codant pour un domaine polyalanine dans le N-terminal de *PABPN1*. A) Génotype normal de *PABPN1*. B) Génotype de la forme autosomique récessive de la DMOP, il y a insertion d'un seul triplet GCG. C) Génotype de la forme autosomique dominante de la DMOP, où il peut y avoir des insertions de 2 jusqu'à 7 triplets GCN. Il existe deux grands types d'expansion dans la forme dominante où il peut y avoir (i) une expansion de triplet GCG pure ou (ii)-(v) une expansion cryptique. ii) insertions cryptiques observées dans deux familles cajuns. (iii) Insertion (GCA)₂(GCG)₂ observée dans deux familles danoise. (iv)-(v) Insertions (GCA)(GCG)₃ et (GCA)₃(GCG)₂ observées dans deux familles japonaises. (vi) Insertion (GCA)₃ GCG a été observée dans quatre familles en Angleterre et en Allemagne.

1.2.2.3 Mutation ponctuelle (GGG → GCG)

Tout récemment, Robinson et collaborateurs ont décrit le cas d'une patiente d'origine européenne ayant une substitution 35G→C dans le gène *PABPN1* (Robinson *et al.*, 2006). La séquence codant pour le domaine polyalanine du gène *PABPN1*, (GCG)₆(GCA)₃GCG, est suivie des codons GGG GCT GCG. Chez cette patiente, la substitution (35G→C) provoque un changement d'acide aminé au niveau du codon (GGG) : Gly12Ala. Il y a donc 13 codons GCN consécutifs. Puisque les codons (GCN) codent pour l'acide aminé alanine, il y a un domaine de 13 alanines.

Ce cas est intéressant, car il s'agit du premier cas dont l'élongation du domaine polyalanine de *PABPN1* n'est pas due à une expansion de triplets (GCN). Cliniquement, selon les auteurs, la patiente semble avoir une forme plus légère de la DMOP (Robinson *et al.* 2006).

1.2.3 Pénétrance

La DMOP a une pénétrance qui varie selon l'âge. Selon Brais et collaborateurs, la pénétrance est de 1% chez les moins de 40 ans, 6 % pour les patients de 40 à 49 ans, 31 %, de 50-59 ans, 63%, de 60 à 69 ans, et 98.7 % chez les patients ayant plus de 69 ans. Ainsi, la DMOP est complètement pénétrante après l'âge de 70 ans. Autrement dit, après l'âge de 70 ans, tous les porteurs de mutations dans le gène *PABPN1* vont présenter des signes et symptômes de la DMOP (Brais *et al.*, 1997).

1.2.4 Mécanisme des mutations responsable de la DMOP

La découverte récente d'expansions cryptiques a permis d'établir le mécanisme responsable de l'expansion : la recombinaison homologue inégale (Nakamoto *et al.* 2002, Robinson *et al.* 2005, Muller *et al.* 2006). Cependant, plusieurs familles canadiennes-françaises partagent le même haplotype de part et d'autre du gène *PABPN1* malgré le fait d'avoir une expansion de triplet (GCN)_n (Brais *et al.*, 1998). Ceci favorise l'hypothèse que l'expansion soit occasionnée par un glissement de l'ADN polymérase durant la

réplication. Il semblerait donc que la DMOP soit causée par deux mécanismes distincts; la recombinaison inégale et le ‘*slippage*’.

1.3 Caractéristiques du gène *PABPN1*

1.3.1 Structure du gène *PABPN1*

Le gène *PABPN1*, situé sur le chromosome 14q11, a une séquence génomique d’environ 6 kb et il comporte 7 exons et 6 introns (figure 4). Les régions codantes du gène *PABPN1* sont conservées entre les différentes espèces soit la souris, le singe et l’humain (Brais *et al.* 1998). Le promoteur de *PABPN1* ne semble pas contenir de boîte TATA. Le signal de polyadénylation AATAAA se trouve dans la région 3’ non codante.

1.3.2 Expression du gène *PABPN1*

L’expression de *PABPN1* est ubiquitaire. Par ailleurs, le gène *PABPN1* est exprimé sous la forme de 3 transcrits (3.5, 2.3, et 1.3 kb) (Nemeth *et al.* 1995). La variation de longueur semble être due à la préservation des introns 1 et 6 chez les transcrits humains (Brais *et al.* 1998) et bovins (Nemeth *et al.* 1995). Le transcrit de 1.3 kb correspond au transcrit complètement épissé, alors que le transcrit de 3.5 kb contient à la fois la région 3’ non codante ainsi que les introns 1 et 6.

Le rôle, ainsi que la provenance de ces transcrits, n’est pas connu. Cependant, certains auteurs estiment que le gène *PABPN1* contient des promoteurs alternatifs (Lee YJ, 1998). Ainsi, les différents transcrits seraient possiblement le résultat d’un épissage alternatif entraînant la rétention d’introns.

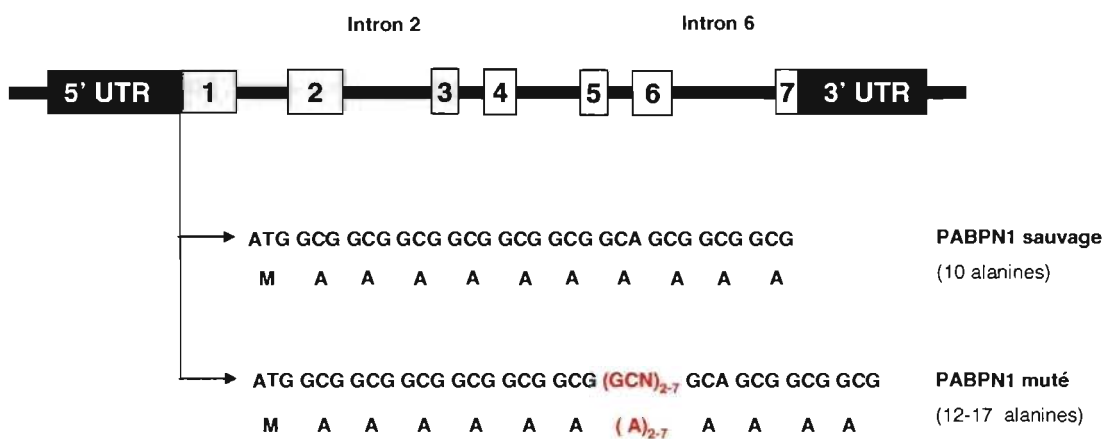


FIGURE 4. Structure du gène *PABPN1*. Le gène *PABPN1* contient 7 exons et 6 introns, dont deux d'entre eux sont conservés dans certains transcrits. La mutation dominante de la DMOP correspond à une expansion de triplet (GCN)₂₋₇ codant pour un domaine polyalanine dans le N-terminal de la protéine.

1.4 Rôles de PABPN1

1.4.1 La polyadénylation

Les ARNm matures des eucaryotes ont des extrémités 3' bien caractérisées : presque tous ont une queue poly(A). En fait, les seuls ARNm matures qui n'ont pas de queue poly(A) sont ceux des histones (Proudfoot *et al.* 2002). La queue poly(A) assure (1) l'exportation de l'ARNm du noyau au cytoplasme (Sachs *et al.* 1997); (2) la stabilité des ARNm dans le cytoplasme, car les ARNm non adénylés sont rapidement dégradés (Beelman *et al.*, 1995); et (3) l'initiation de la traduction des ARNm (Eckner *et al.*, 1991). En effet, la queue poly(A), en combinaison avec la coiffe en 5' du transcrit est nécessaire à l'efficacité maximale de la traduction (Bechler, 1997; Preiss *et al.*, 1998). Ainsi, la polyadénylation est une étape essentielle au bon fonctionnement de la cellule.

La polyadénylation des ARN pré-messagers s'effectue en deux étapes successives : dans un premier temps, l'ARN pré-messager est clivé au niveau d'un site spécifique, puis une queue poly(A) est ajoutée à l'extrémité 3' du produit de clivage (figure 5) (Wahle & Ruegsegger, 1999). PABPN1 ne participe pas au clivage des ARNm, mais joue un rôle crucial dans la polyadénylation en stimulant la formation des queues poly(A) et en assurant une longueur normale de 250 résidus adénines (Wahle, 1995, Wahle, 1996).

1.4.1.1 Clivage de l'ARNm

Le clivage requiert l'assemblage d'une multitude de protéines dont CPSF (cleavage and polyadenylation specificity factor), CStF (Cleavage Stimulatory Factor), CF I (Cleavage Factor I), CF II (Cleavage Factor II) et la PAP (Poly(A) Polymerase). Ces protéines vont interagir avec l'ARN pré-messager via 2 sites : (1) la séquence AAUAAA et (2) la séquence riche en U ou GU, parfois appelée DES (Distal Sequence Element). Il y a clivage lorsque toutes les protéines du complexe de clivage sont assemblées sur l'ARN pré-messager (figure 5). Le site de clivage se situe entre l'hexamère AAUAAA et la séquence riche en GU (ou U).

1.4.1.2 La polyadénylation

La polyadénylation requiert l'activité de la PAP, ainsi que la présence de PABPN1 et du complexe CPSF (figure 5). La PAP peut, à elle seule, catalyser la synthèse de la queue poly(A). Cependant, cette réaction est lente et processive (la PAP se dissocie à chaque adénine qu'elle incorpore) sans l'ajout de PABPN1 (Wahle 1995). Ainsi, PABPN1 vient se lier à la queue naissante lorsque celle-ci atteint une longueur de 10 à 15 résidus alanines (Wahle 1991). Le complexe formé, en conjonction avec CPSF, stimule la PAP, accélérant ainsi la synthèse de la queue poly(A) (Kerwitz *et al.* 2003). De plus, en présence de PABPN1 et de CPSF, la PAP change d'un mode processif à un mode distributif (elle peut incorporer jusqu'à 250 nucléotides sans se dissocier de l'ARN). Afin de maintenir l'efficacité, des monomères de PABPN1 vont continuer à se lier séquentiellement aux queues naissantes jusqu'à ce que la queue poly(A) atteigne une longueur optimale (250 résidus adénines).

Le mécanisme de contrôle de la longueur de la queue poly(A) est peu connu. Toutefois, il semble qu'une fois la longueur optimale atteinte, PABPN1 cesse de stimuler la PAP, entraînant alors un retour vers la polyadénylation lente (Kerwitz *et al.* 2003). Ainsi, PABPN1 joue également une autre fonction dans la réaction de polyadénylation, c'est-à-dire, la régulation de la longueur des queues poly(A) pour que celle-ci n'excède pas 250 adénines (Wahle 1995).

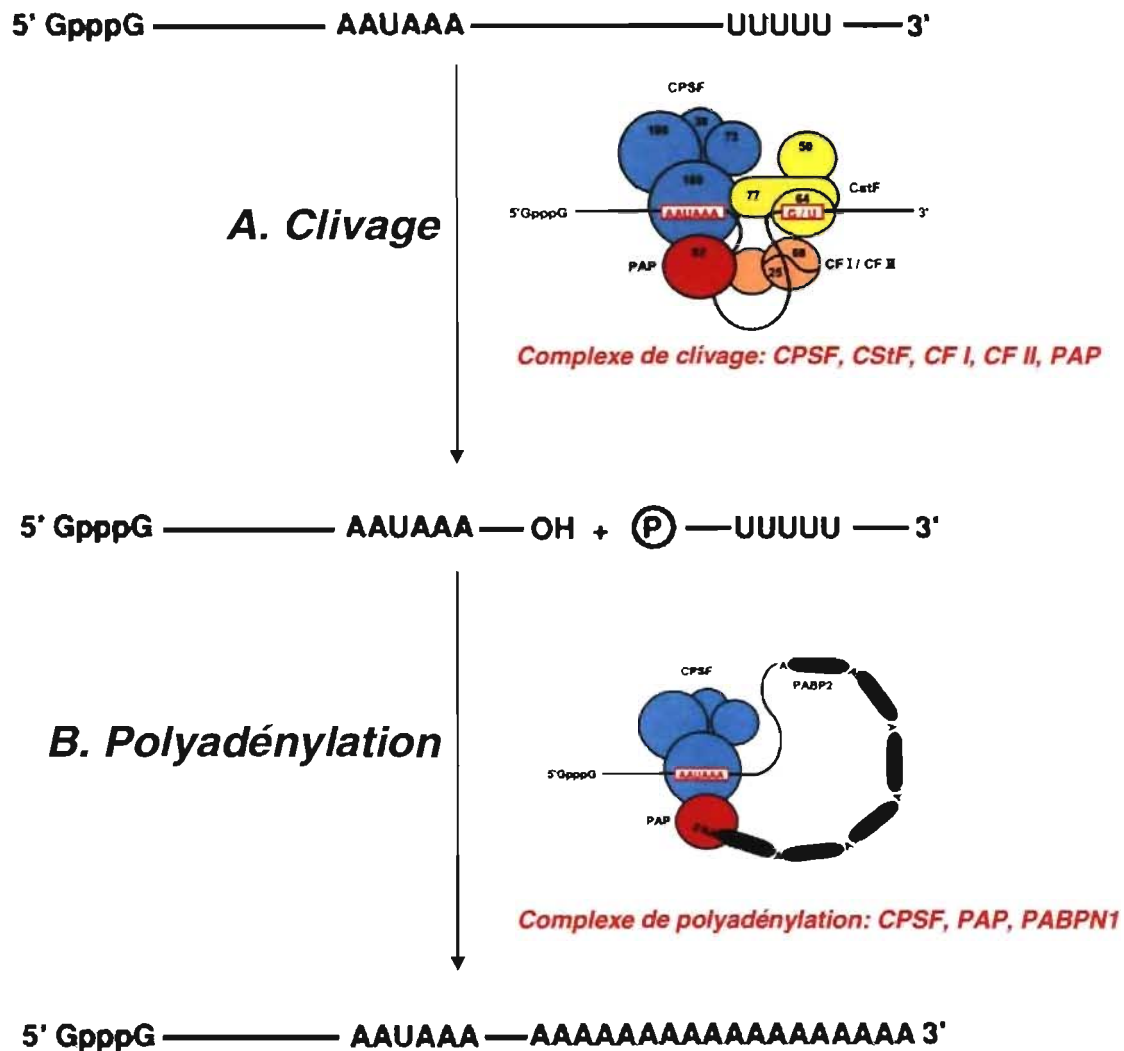


FIGURE 5 : La réaction de la polyadénylation. La polyadénylation des ARN pré-messagers s'effectue en deux étapes successives. (A) le clivage des ARNm en 3' nécessite la formation du complexe de clivage au niveau des séquences AAUAAA et DES (séquence riche en U ou GU) de l'ARN pré-messager. Le site de clivage se situe entre l'hexamère AAUAAA et la séquence riche en GU (ou U). (B) Une fois le clivage effectué, des adénines sont rajoutées au groupe 3' OH suite à la formation d'un complexe de polyadénylation composé de CPSF, PAP et PABPN1. PABPN1 participe à la réaction de polyadénylation en stimulant l'addition d'adénines par la PAP et régule la longueur des queues poly(A) ainsi générées (figure adaptée de Wahle et Ruegsegger, 1999).

1.4.2 Régulation de l'expression de gènes spécifiques au muscle

Kim *et al.* (2001) ont mis en évidence que la surexpression stable de PABPN1 dans une lignée myoblastique provenant de muscle strié squelettique causait une augmentation de la différenciation de ces myoblastes en myotubes via une augmentation de l'expression de marqueurs myogéniques. Ils ont démontré que le facteur de transcription MyoD et la myogénine étaient surexprimés dans ces lignées stables surexprimant PABPN1.

Cette étude a également mené à identifier un partenaire d'interaction de PABPN1, SKIP (un co-regulateur de la transcription). Un essai rapporteur a permis de mettre en évidence que PABPN1 agit en synergie avec SKIP pour activer la transcription de gènes possédant une boîte E liée par MyoD. Ces résultats suggèrent que PABPN1 et SKIP peuvent contrôler l'expression de certains gènes spécifiques du muscle.

1.5 Caractéristiques de la protéine PABPN1

La protéine PABPN1 a d'abord été identifiée chez le bœuf (Nemeth *et al.* 1995) avant d'être identifiée chez l'humain (Brais *et al.* 1998), la souris (Lee *et al.* 1998), la drosophile (Benoit *et al.* 1999) et *C. elegans* (Kamath *et al.* 2003).

1.5.1 Localisation cellulaire

PABPN1, qui possède un NLS (nuclear localisation signal), est une protéine nucléaire. Toutefois, PABPN1 effectue un va-et-vient entre le noyau et le cytoplasme (Calado *et al.*, 2000a). La sortie de PABPN1 du noyau requiert la liaison à l'ARNm et est un processus dépendant d'énergie (Calado *et al.*, 2000a), tandis que l'import de PABPN1 est médié par la liaison à la transportine via une interaction dépendante de la présence de RAN-GTP (Calado *et al.*, 2000a).

1.5.1.1 Sous-localisation nucléaire

PABPN1 se retrouve en grande concentration dans les *speckles nucléaires*. Les speckles sont le lieu de biogenèse des ARNm puisqu'ils correspondent au lieu où sont recrutés les complexes participant à la maturation des ARNm (Lamond & Earnshaw, 1998). Ainsi, la distribution de PABPN1 ressemble en définitive à celle de plusieurs facteurs responsables de la maturation des ARNm, dont les facteurs de polyadénylation PAP et CPSF (Schul *et al.* 1998, Krause *et al.* 1994). Par ailleurs, la concentration de PABPN1 dans le reste du noyau est faible.

1.5.2 Structure

La masse prédite de PABPN1 est de 32.8 kDa. L'extrémité N-terminal de PABPN1 est riche en glutamate et est généralement considérée comme étant acide, tandis que l'extrémité C-terminal, riche en arginines, est considérée comme étant basique. De plus, le C-terminal est essentiel pour l'oligomérisation de PABPN1 (Fan *et al.* 2001; Scheuermann *et al.* 2003). PABPN1 est une protéine de 306 acides aminés. Cette protéine comporte au moins 4 domaines distincts : le domaine polyalanine (a.a. 2-11), le domaine

de type coiled-coil (a.a. 118-152), le domaine de liaison à l'ARN (a.a. 161-256) et le signal de localisation nucléaire (a.a. 257-306) (figure 6).

1.5.2.1 Domaine polyalanine

Il s'agit ici du domaine comportant les mutations responsables de la DMOP. Jusqu'à présent, le rôle du domaine polyalanine de PABPN1 n'est pas connu. Cependant, il semble que le domaine polyalanine de PABPN1 ne soit pas nécessaire à sa fonction première, c'est-à-dire, la polyadénylation des ARNm. Ceci est corroboré par le fait que malgré l'absence de domaine polyalanine, l'orthologue de PABPN1 chez la drosophile se comporte comme le PABPN1 chez les mammifères lors d'essais de polyadénylation *in vitro*. De plus, il possède la même spécificité pour la queue poly(A) (Benoit *et al.* 1999).

1.5.2.2 Domaine coiled-coil

Une séquence d'environ 30 acides aminés situés en amont du domaine de liaison à l'ARN correspond à un domaine de type '*coiled-coil*'. Ce domaine est caractérisé par une répétition de 7 acides aminés (a-b-c-D-e-f-g). La structure en hélice alpha de ce fragment de la protéine fut confirmée en employant la spectroscopie par dichroïsme circulaire (Kerwitz *et al.* 2003). Bien que le domaine *coiled-coil* puisse théoriquement permettre à PABPN1 de former des dimères ou trimères, il ne semble pas essentiel à l'agrégation de celle-ci. Des mutations ponctuelles au niveau de ce domaine diminuent l'effet stimulateur de PABPN1 sur PAP (Kerwitz *et al.* 2003).

1.5.2.3 Domaine de liaison à l'ARN (RRM)

La liaison à la queue poly(A) des ARNm par PABPN1 dépend d'un domaine de liaison à l'ARN appelé *RNA Recognition Motif* (RRM). Le RRM de PABPN1 correspondant aux acides aminés 161 à 256, est essentiel pour sa fonction de polyadénylation. Une mutation au niveau de la tyrosine 217 élimine la liaison à l'ARN (Lisbin MJ, 2000). Cet acide aminé est généralement conservé dans les domaines RRM chez les autres protéines capables de lier l'ARN.



FIGURE 6 : La protéine PABPN1. PABPN1 possède un domaine polyalanine en N-terminal, un domaine *coiled-coil* vers le centre de la protéine, un domaine de liaison à l'ARN et un domaine NLS en C-terminal. Les mutations responsables de la DMOP provoquent une élévation du domaine polyalanine.

1.5.2.4 Signal de localisation nucléaire

Le NLS de PABPN1 fut premièrement localisé à une portion qui correspond aux acides aminés 257 à 306 à l'extrémité C-terminal de PABPN1 (Calado *et al.* 2000a). Le domaine fut ensuite réduit à 15 acides aminés par Abu-Baker et collaborateurs, qui ont aussi confirmé le rôle du NLS dans la localisation nucléaire de PABPN1 (Abu-Baker *et al.* 2005)

1.5.3 Modifications post-traductionnelles de PABPN1

Il a été démontré que PABPN1 est méthylé *in vitro* par les méthyltransférases PRMT1 et PRMT3 (Smith *et al.* 1999). Ce sont les arginines du côté C-terminal de la protéine qui sont préférentiellement méthylées. Il reste à voir si ces modifications viennent changer l'affinité de PABPN1 pour d'autres protéines ou même pour différents types d'ARNm.

1.5.4 Interactions protéines-protéines

En plus d'interagir avec elle-même, PABPN1 interagit avec les protéines CPSF-30, HNRPA1 et PAP (Chen *et al.* 1999; Fan *et al.* 2003; Kerwitz *et al.* 2003). En effet, Chen *et al.* (1999) ont démontré par *GST-pull-down* que PABPN1 interagit directement avec CPSF-30. Ce lien est intéressant, car ces deux protéines participent à la polyadénylation. De plus, cette interaction établit une relation indirecte entre le domaine C-terminale de l'ARN polymérase II et PABPN1, puisque CPSF-30 interagit directement avec le domaine C-terminal de l'ARNpol II (McCracken *et al.* 1997). D'autre part, une interaction entre PABPN1 et HNRPA1 (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1) a récemment été détectée lors d'un essai double-hybride (Fan *et al.* 2003). La protéine HNRPA1 est requise pour le clivage au site de polyadénylation et le transport de l'ARNm mature vers le cytoplasme (Colgan and Manley, 1997; Kessler *et al.* 1997). Finalement, PABPN1 interagit avec PAP de manière RNA dépendante (Kerwitz *et al.* 2003).

Il a été démontré par essai double-hybride que PABPN1 interagit avec HNRPA/B, SKIP, HSP40, BRG1 (Kim *et al.* 2001; Fan *et al.* 2003), et la protéine virale NS1A (Chen *et al.* 1999). Ishigaki *et al.* ont démontré par immunoprécipitation que PABPN1 interagit

également avec CBP80, CBP20, EIF4G, UPF2 et UPF3, protéines nécessaires au maintien de la coiffe en 5' et à l'initiation de la traduction (Ishigaki *et al.* 2001).

1.6 Histopathologie de la DMOP

Les muscles squelettiques des patients atteints de la DMOP démontrent des modifications dystrophiques qui sont également communes à plusieurs autres dystrophies musculaires. En général, les muscles ont un aspect pâle et présentent un haut niveau de remplacement adipeux qui peut parfois atteindre près de 80 % des fibres musculaires (Little & Perl, 1982).

Cependant, il y a deux types de modifications morphologiques particulières à la DMOP au niveau des muscles squelettiques: il s'agit des inclusions intranucléaires et des vacuoles bordées.

1.6.1 Les inclusions intranucléaires (IIN)

Le changement le plus important de la DMOP est la présence d'inclusions intranucléaires. La présence de ces inclusions au sein des fibres musculaires (en microscopie électronique) est désormais considérée pathognomonique de la maladie et a, pendant près de 20 ans, servi de marqueur diagnostique de la DMOP.

1.6.1.1 Structures et caractéristiques des IINs

Les inclusions intranucléaires consistent en des filaments tubulaires ayant un diamètre extérieur de 8.5 nm et un diamètre intérieur de 3 nm (figure 7). Ces filaments ne comportent pas de branches, sont souvent rectilinéaires, et apparaissent striés avec une périodicité de 7-7,5 nm. Ils ont une longueur pouvant atteindre 0,25 µm. Ceux-ci sont organisés en palissades très structurées au sein des noyaux des fibres musculaires squelettiques des patients atteints de la DMOP (Tomé et Fardeau 1980).

Ces inclusions sont retrouvées exclusivement au niveau des noyaux des fibres musculaires, elles n'ont jamais été retrouvées au niveau de leur cytoplasme. De plus, les inclusions n'ont jamais été observées dans d'autres types de cellules (cellules satellites,

fibroblastes, cellules endothéliales, adipocytes, cellules de Schwann). La région du noyau occupée par ces inclusions varie d'un noyau à l'autre.

Les inclusions ont été décrites pour la première fois par Tomé et Fardeau en 1980. Entre temps, plusieurs autres études ont confirmé la présence de ces inclusions intranucléaires (Blumen *et al.*, 1996; Brunet *et al.* 1997), incluant des études chez des patients canadiens-français (Bouchard *et al.* 1989).

1.6.1.2 La composition des IINs

Il a été démontré que les inclusions intranucléaires de la DMOP sont composées d'une forme mutante de PABPN1 (Calado *et al.* 2000b; Uyama *et al.* 2000; Becher *et al.* 2000). De plus, les inclusions sont immunoréactives pour de l'ubiquitine et des sous-unités du protéasome (Calado *et al.* 2000b). Les inclusions séquestrent également les chaperones HSP40 (Calado *et al.* 2000b) et HSP70 (Bao *et al.* 2004). Ainsi, la présence de chaperones, de l'ubiquitine et des sous-unités du protéasome semble indiquer que la protéine PABPN1 mutée a subi un changement de conformation. D'autre part, les IINs séquestrent l'ARN poly(A), mais excluent l'ADN (Calado *et al.* 2000b). D'autres études récentes ont démontré que les inclusions contiennent également HNRPA1 (Fan *et al.* 2003), CUGBP1, SFRS3, et FKBP1A (Corbeil-Girard *et al.*, 2005), qui sont des facteurs de maturation des ARNm.

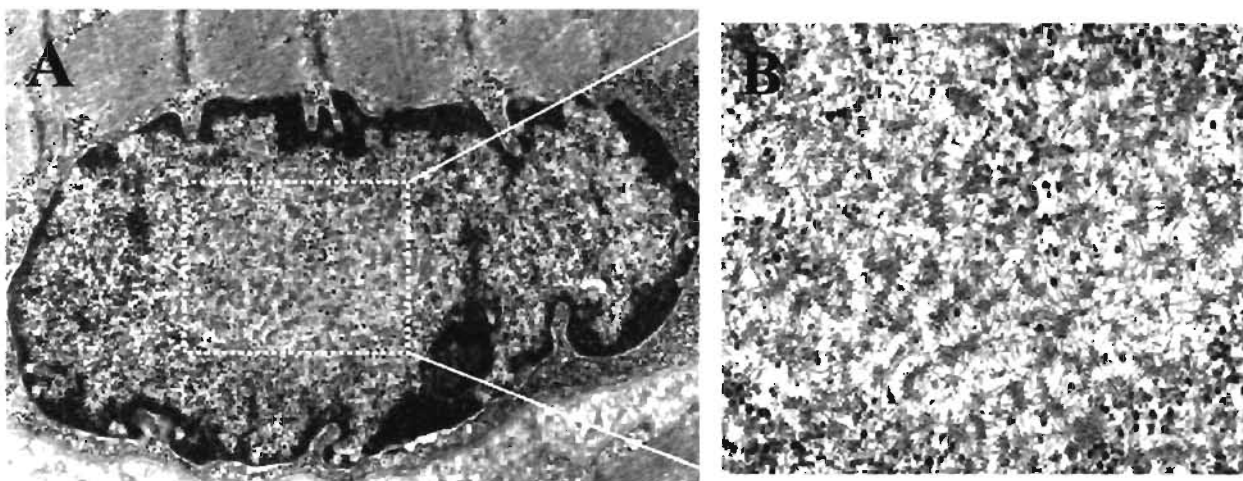


FIGURE 7: Les inclusions intranucléaires. A) Apparence des inclusions intranucléaires observées dans les fibres musculaires striées squelettiques de patients atteints de la DMOP (Microscopie électronique, X500) B) Les inclusions intranucléaires sont constituées de filaments tubulaires de 7 nm de diamètre et d'une longueur d'environ 250 nm organisées en palissades (X20 000).

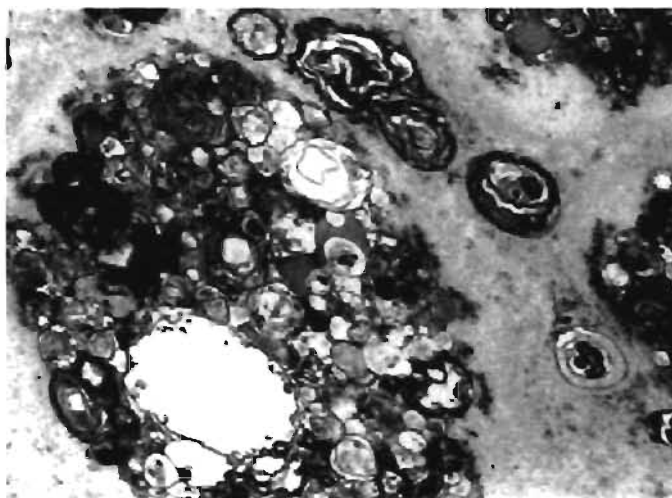


FIGURE 8 : Les vacuoles bordées. Apparence des vacuoles bordées, en microscopie électronique, observées dans les fibres musculaires squelettiques de patients atteints de la DMOP (X17 000) (tirée de Schober *et al.* 2001).

1.6.2 Les vacuoles bordées

Une étude de 29 cas de DMOP a démontré que 26 d'entre possédaient des vacuoles bordées dans leurs muscles (Tomé *et al.* 1997). Ceci indique que les vacuoles bordées, bien qu'elles ne soient pas toujours présentes dans la DMOP, sont une caractéristique de cette maladie. Elles étaient d'ailleurs utilisées comme marqueurs de la maladie avant la découverte des IIN en 1980.

1.6.2.1 Structures et caractéristiques

Les vacuoles bordées ont l'apparence de petites zones claires aux contours ronds et irréguliers. Elles sont situées au niveau du cytoplasme et varient en taille (figure 8).

1.6.2.2 La composition des vacuoles bordées

Les vacuoles bordées sont composées de petites vacuoles entourées de granules basophiles contenant l'acide phosphatase, un enzyme lysosomiale (Dubowitz & Brooke 1973; Fukuhara N 1982). Des études récentes suggèrent que ces vacuoles sont d'origine autophagique (Kumamoto T 2000; Suzuki T 2002). Les vacuoles bordées contiennent également des structures myéloïdes, des granules de glycogènes et des débris cellulaires.

1.7 Questions et approches expérimentales

Malgré les avancées dans l'étude de la DMOP, il reste toutefois plusieurs questions sans réponse. Certains patients atteints de la DMOP ont un phénotype sévère. Cependant, la corrélation entre le phénotype sévère et le génotype reste difficile à cerner. La caractérisation clinique et l'étude génétique de nos 89 cas sévères nous ont permis d'aborder la question. En effet, plusieurs études laissent présager qu'il existe une relation entre la sévérité du phénotype de la DMOP et le nombre de copies de *PABPNI* mutées. Ainsi, si la deuxième copie du gène *PABPNI* a un effet sur la sévérité, on devrait s'attendre à ce que nos patients sévères, ou du moins une partie d'entre eux, aient une mutation dans la deuxième copie du gène *PABPNI*. C'est donc dans ce cadre d'étude que

nous tenterons de déterminer s'il y a une composante génétique à la sévérité chez nos 89 patients sévères.

Les mécanismes régissant la pathophysiologie de la DMOP demeurent un mystère. Un mécanisme possible est que PABPN1, par sa capacité à s'agréger, entraîne avec elle des protéines avec des domaines polyalanines. Ainsi, un autre thème abordé dans ce mémoire consiste à déterminer si d'autres protéines avec des domaines polyalanines ont tendance à co-agrégier avec PABPN1.

Au chapitre 2, nos cas sévères ont été caractérisés afin de déterminer s'ils ont les mêmes caractéristiques cliniques que ceux décrits dans la littérature. De plus, l'haplotypage des patients sévères a été effectué afin de déterminer s'il y a une mutation ailleurs dans le gène *PABPN1* qui pourrait expliquer le phénotype sévère chez ces patients.

Au chapitre 3, des co-transfections de protéines contenant des domaines polyalanines avec PABPN1 mutée ont été effectuées afin de déterminer si PABPN1 entraîne la séquestration dans les inclusions d'autres protéines avec une séquence polyalanine dans les inclusions.

Au chapitre 4, les conclusions obtenues à partir des résultats présentés aux chapitres 2 et 3 seront discutées. De plus, les directions futures des travaux qui devraient suivre nos résultats y seront présentées.

2. Chapitre 2

Étude des formes sévères de la DMOP

2.1 Phénotype sévère

L'âge auquel se déclare la DMOP est l'un des critères le plus utilisés pour jauger la sévérité du phénotype d'un patient. Plus l'âge d'apparition des symptômes est jeune, plus le phénotype sera dit sévère (Hill *et al.* 2001; Brais *et al.* 1998; Blumen *et al.* 1999).

Le degré d'atteinte est un autre critère utilisé pour mesurer la sévérité. En effet, les patients sévères ont un temps de déglutition plus élevé que la normale (Brais *et al.* 1998). Ces patients ont également une faiblesse proximale plus importante au niveau de leurs membres inférieurs (MI) et une diminution considérable de la mobilité de leurs yeux comparativement aux patients dits "classiques" (ophtalmoparésie) (Blumen *et al.* 1999; Mirabella *et al.* 2000; Pou Serradell *et al.* 2004).

2.2 Corrélation génotype-phénotype

Il existe une relation entre la sévérité du phénotype de la DMOP et le nombre de copies de *PAPBN1* mutés (Brais *et al.* 1998). En effet, les homozygotes porteurs de deux allèles mutés ont un phénotype plus sévère que les hétérozygotes (Blumen *et al.* 1999). De plus, un phénotype plus sévère est observé chez les patients hétérozygotes composés pour une mutation dominante (GCN)₁₂₋₁₇ et une mutation récessive (GCN)₁₁ (Brais *et al.* 1998, Mirabella *et al.* 2000, Hill *et al.* 2001) (figure 9). Cependant, il n'est pas clair s'il existe une relation entre la sévérité et la longueur de l'expansion.

2.2.1 Homozygotes

Brais et collaborateurs ont démontré, par le biais d'un test de déglutition, que les patients homozygotes (n=3) pour l'expansion (GCN)₁₃ avaient une dysphagie plus marquée ainsi qu'un âge de début de la dysphagie plus précoce que les hétérozygotes (GCN)₁₃ (Brais *et al.* 1998). Les auteurs ont donc conclu que les patients homozygotes pour l'expansion (GCN)₁₃ ont un phénotype sévère.

Cette conclusion a été corroborée par une deuxième étude qui a démontré que les patients homozygotes (n=7) pour l'expansion (GCN)₁₃ manifestaient des symptômes 18 ans plus tôt, en moyenne, que les hétérozygotes (GCN)₁₃ (Blumen *et al.* 1999). De plus, ces patients homozygotes avaient un degré de faiblesse proximale des membres inférieurs et une ophthalmoparésie qui n'avait jamais été observée chez des hétérozygotes du même âge (Blumen *et al.* 1999). Les auteurs ont également démontré que les patients homozygotes avaient des inclusions dans 9.4 % des noyaux, comparativement à 4.9 % pour les hétérozygotes. Ces résultats confirment que les patients homozygotes, porteurs de deux allèles mutés, ont un phénotype plus sévère que les hétérozygotes au niveau clinique et pathologique.

2.2.2 Hétérozygotes composés

Plusieurs auteurs ont noté une corrélation entre le génotype des hétérozygotes composés et le phénotype sévère (Brais *et al.* 1998; Hill *et al.* 2001). Les patients hétérozygotes composés ont une mutation dominante (GCN)₁₂₋₁₇ sur un allèle et une mutation récessive (GCN)₁₁ sur l'autre allèle.

Brais et collaborateurs ont démontré que les hétérozygotes composées (n=4) pour les expansions (GCN)₁₃ et (GCN)₁₁ avaient une dysphagie plus prononcée que les hétérozygotes (GCN)₁₃ du même âge (Brais *et al.* 1998). Ainsi, la mutation récessive (GCN)₁₁ agit comme un modulateur du phénotype de la DMOP (Brais *et al.* 1998). L'étude de l'équipe du Dr Hammans supporte cette affirmation. Le groupe a démontré que les patients hétérozygotes composés (n=2) pour les expansions (GCN)₁₂ et (GCN)₁₁ avaient des symptômes à un âge plus jeune que les hétérozygotes (GCN)₁₂ (Hill *et al.* 2001).

Contrairement aux études canadiennes-françaises (Brais *et al.* 1998) et britanniques (Hill *et al.* 2001), une étude réalisée par un groupe d'Italie a mené à la conclusion que les patients hétérozygotes composés (n=4) pour les expansions (GCN)₁₂ et (GCN)₁₁ démontraient un phénotype moins sévère que les hétérozygotes (GCN)₁₃₋₁₄ (Mirabella *et al.* 2000). Toutefois, les auteurs de cette étude ont négligé d'expliquer la raison pour laquelle ils considéraient le phénotype des hétérozygotes composés comme étant moins sévère.

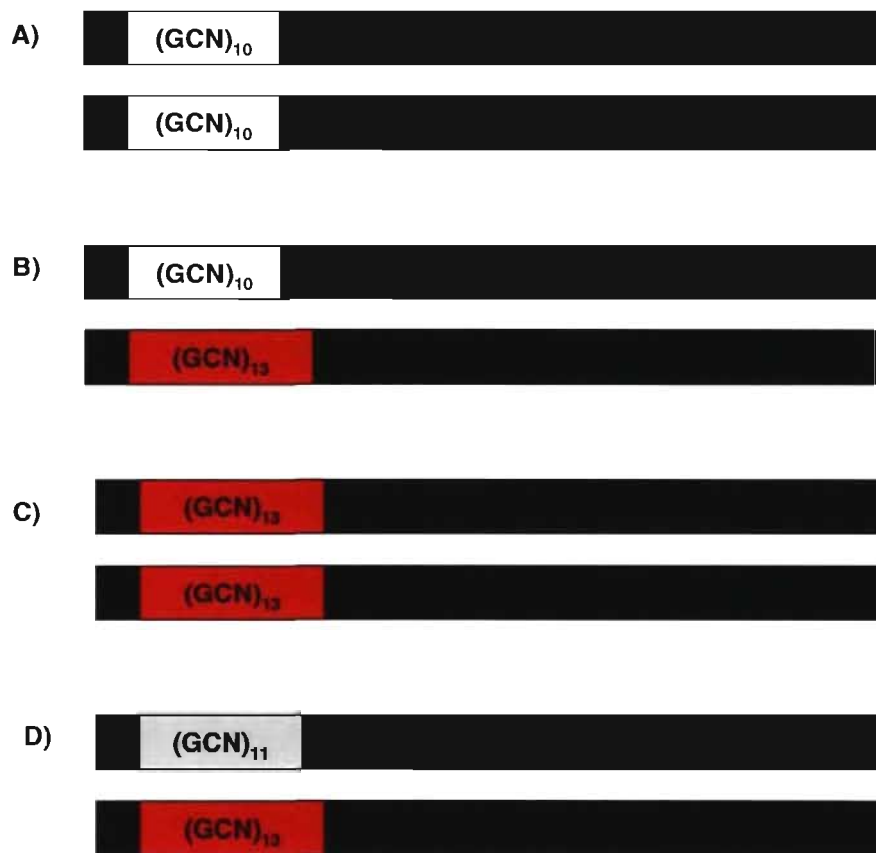


FIGURE 9 : La DMOP est causée par des mutations $(GCN)_{12-17}$ dans le gène *PABPN1*. a) Deux copies du gène *PABPN1* normal, b) La mutation canadienne-française $(GCN)_{13}$ c) Un patient homozygote pour l'expansion $(GCN)_{13}$ et d) un patient hétérozygote composé comportant une mutation dominante $(GCN)_{13}$ et une mutation récessive $(GCN)_{11}$.

2.2.3 Longueurs de l'expansion et pathologies

La taille de l'expansion d'un domaine polyalanine dans le gène *HOXD13* est fortement reliée à la sévérité de la sympoldactylie (chapitre 3) (Goodman *et al.* 1997). Bien qu'il existe une corrélation entre le phénotype et la longueur de l'expansion chez *HOXD13*, une telle corrélation reste difficile à cerner dans la DMOP. Certaines études démontrent qu'il y a effectivement une corrélation (Mirabella *et al.* 2000; Hill *et al.* 2001), tandis que d'autres démontrent qu'il n'y a aucune corrélation entre la longueur de l'expansion et le phénotype sévère (Müller *et al.* 2001; Nakamoto *et al.* 2002; Pou Serradell *et al.* 2004; Müller *et al.* 2006).

Mirabella et collaborateurs ont démontré que des patients avec une expansion (GCN)₁₄ avaient une faiblesse proximale importante au niveau de leurs membres inférieurs (Mirabella *et al.* 2000). De même, Hill et collaborateurs ont démontré que les deux patients avec l'expansion (GCN)₁₇ présentaient des symptômes de la DMOP à un âge plus précoce que le patient avec une petite expansion (GCN)₁₂ (Hill *et al.* 2001). Selon ces deux études, il existerait possiblement une corrélation entre la longueur de l'expansion et la sévérité.

D'autre part, des études récentes ont démontré qu'il n'y avait aucune corrélation entre la longueur de l'expansion et le phénotype sévère. En effet, il a été démontré qu'une faiblesse proximale des membres inférieurs est toujours présente peu importe la longueur de l'expansion (Müller *et al.* 2001), de même, qu'il n'y a pas de différence significative dans l'âge du début de la DMOP entre des patients ayant de longues expansions et d'autres avec de petites expansions (Müller *et al.* 2006). Selon l'étude de Pou Serradell, contrairement aux patients avec une expansion (GCN)₁₃, les patients avec une expansion (GCN)₁₄₋₁₅ n'avaient pas d'ophtalmoparésie ni de faiblesse des membres inférieurs avant l'âge de 70 ans.

Finalement, il existe souvent une certaine variabilité clinique chez les porteurs de la même mutation (Bouchard *et al.* 1997). Il est donc difficile de comparer les plus grandes expansions avec les autres élongations, notamment (GCN)₁₃, étant donné la grande variabilité phénotypique chez ces patients (Bouchard *et al.* 1997). D'autres études plus poussées seront nécessaires afin de déterminer s'il existe une vraie corrélation entre la longueur du domaine polyalanine de PABPN1 et la sévérité de la DMOP.

2.3 Neuropathie

La DMOP est considérée comme étant une myopathie, puisqu'elle est caractérisée par une atteinte des fibres musculaires de façon symétrique, provoquant des faiblesses musculaires. Cependant, il existe aussi, plus rarement, des cas de DMOP caractérisés par une atteinte du système nerveux périphérique (SNP) (Schmitt *et al.* 1981; Probst *et al.* 1982; Porschke *et al.* 1997; Nagashima *et al.* 2000; Mirabella *et al.* 2000; Schober *et al.* 2001; Boukriche *et al.* 2002; Nakashima *et al.* 2003). Cliniquement, une neuropathie motrice du SNP peut, mis à part la faiblesse musculaire, se manifester par des fasciculations (secousses spontanées visibles dans un muscle au repos), une atrophie des muscles, et une hyporéflexie ou aréflexie (diminution ou absence des réflexes ostéotendineux). L'association entre la DMOP et l'atteinte du SNP n'est pas claire.

La neuropathie, observée chez certains rares cas de DMOP, est considérée comme étant un phénotype sévère. Plusieurs hypothèses ont été soulevées afin d'expliquer cette composante neurogénique de la DMOP. Certains auteurs croient que la neuropathie est reliée à la longueur de l'expansion (GCN) dans le gène *PABPN1*. En effet, deux études récentes ont rapporté une neuropathie chez des individus porteurs de l'expansion (GCN)₁₇ (Schober *et al.* 2001; Nakashima *et al.* 2003). D'autre part, d'autres auteurs croient que la neuropathie peut être attribuable à d'autres loci (Creel *et al.* 1998; Schober *et al.* 2001). Finalement, certains auteurs croient que la neuropathie est simplement due à l'âge avancé des patients atteints de la DMOP (Schmitt *et al.* 1981, Bouchard *et al.* 1997).

2.4 Créatine Kinase

La créatine kinase (CK) est un enzyme qui se retrouve surtout au niveau des muscles squelettiques. Cependant, cet enzyme est également exprimé dans le cœur et le cerveau. En effet, selon le tissu, la créatine kinase est exprimée sous forme de trois isoenzymes : CK-MM (muscle squelettique), CK-MB (cœur) et CK-BB (cerveau). Les valeurs sériques de CK varient selon l'âge, le sexe, la race et l'activité physique. De plus, le niveau de CK sérique augmente dans les maladies musculaires telles que les myosites et la plupart des dystrophies musculaires (Kasper *et al.* 2005).

En ce qui concerne la DMOP, chez la plupart des patients, le niveau sérique de CK est soit normal ou légèrement augmenté (Barbeau 1966). Cependant, chez les individus avec une faiblesse musculaire proximale importante, le niveau sérique de CK est de 2 à 5 fois plus élevé (Bouchard *et al.* 1989).

2.5 Objectifs de l'étude

Pour ce projet, nous avons obtenu l'ADN et les données cliniques de 252 patients atteints de la DMOP, tous hétérozygotes pour l'expansion (GCN)₁₃. Parmi ces 252 patients, nous avons identifié 89 cas sévères à l'aide de cinq critères cliniques (voir matériels et méthodes).

2.5.1 Déterminer les caractéristiques cliniques de nos cas sévères

Les patients sévères décrits dans la littérature ont en général : 1) un âge de début de la DMOP plus précoce, 2) une faiblesse proximale importante et 3) une limitation des mouvements oculaires (ophtalmoparésie). Ainsi, nous voulons déterminer si nos cas sévères ont les mêmes caractéristiques cliniques que ceux décrits dans la littérature. De plus, puisque la neuropathie est considérée comme étant un phénotype sévère, nous voulons déterminer si nos cas sévères ont également une atteinte du SNP. Finalement, puisque le niveau de CK plasmatique est élevé chez les patients avec une faiblesse musculaire proximale importante, nous voulons déterminer si le niveau plasmatique de CK peut être utilisé comme indicateur de la sévérité.

2.5.2 Déterminer si la deuxième copie du gène *PABPNI* influence la sévérité de la DMOP

Nos patients sévères sont tous hétérozygotes pour l'expansion (GCN)₁₃. Puisqu'il existe une relation entre la sévérité du phénotype de la DMOP et le nombre de copies de *PABPNI* mutées, il pourrait y avoir une mutation ailleurs dans la deuxième copie du gène *PABPNI*, autre que les triplets répétés. Ainsi, nous voulons déterminer s'il y a une

mutation ailleurs dans le gène *PABPN1* qui pourrait expliquer le phénotype sévère chez ces patients.

2.5.3 Déterminer le mode de transmission de la sévérité

La sévérité pourrait être attribuable à d'autres loci. En effet, il pourrait y avoir des mutations dans d'autres gènes codant pour des protéines ayant interaction avec PABPN1. Cependant, la sévérité pourrait aussi être attribuable à l'environnement. Ainsi, nous voulons déterminer s'il y a un mode de transmission mendélien de la sévérité dans notre cohorte.

2.6 Matériels et Méthodes

2.6.1 Recrutement des patients canadiens-français

Nous avons recruté des patients canadiens-français en deux temps. Ainsi, nous avons donc deux cohortes canadiennes-françaises. La première cohorte a été recrutée entre 1989 et 1995 et est composée de 143 patients. La deuxième cohorte de 109 cas fut recrutée entre 1999 et 2003. Les patients de la deuxième cohorte ont été recrutés à la clinique de neurogénétique du CHUM. Nous avons recueilli 47 variables cliniques et l'ADN de tous les participants. Le projet de recherche a été approuvé par le comité d'éthique de la recherche du centre de recherche du CHUM.

2.6.2 Diagnostic de la sévérité chez les patients canadiens-français

Afin de bien distinguer les patients sévères des patients classiques (non sévères) dans notre cohorte de 206 patients canadiens-français, nous avons établi 5 critères (Tableau I). Ces critères contiennent uniquement des signes cliniques observés au moment de l'examen. Un seul des cinq critères est nécessaire pour être catégorisé comme étant sévère. Les patients avec des maladies auto-immunes ou d'autres maladies neurologiques ont été exclus de l'étude.

Tableau I. Critères cliniques permettant l'identification des cas sévères de la DMOP.

Critère	Âge d'apparition
1. Limitation des mouvements oculaires accompagnée d'une faiblesse dans les membres inférieurs (force <5, sur une échelle de 0-5)	< 60 ans
2. Faiblesse proximale des membres supérieurs	< 70 ans
3. Faiblesse proximale des jambes <3	70ans ≤
4. Faiblesse proximale des jambes <4	< 70 ans
5. Faiblesse proximale des jambes <5	< 50 ans

Tableau II. Échelle clinique de la force musculaire. La cote de 5 est la normale.

Échelle	Description
0	Aucune contraction musculaire détectée
1	Détection d'une trace de contraction musculaire
2	Mouvement actif d'un membre lorsque la gravité est éliminée
3	Mouvement actif d'un membre contre la gravité
4	Mouvement actif d'un membre contre la gravité avec un peu de résistance
5	Mouvement actif d'un membre contre la gravité avec une résistance complète (sans fatigue)

2.6.3 Analyses Statistiques

Il y a eu comparaison des patients sévères et classiques pour les variables cliniques suivantes : 1) l'âge de la première manifestation de la DMOP, 2) l'âge de la première manifestation de faiblesse musculaire, 3) la force musculaire des membres inférieurs et supérieurs, 5) les mouvements oculaires, 6) les réflexes ostéoendineux et 7) le niveau plasmatique de CK. Toutes les données obtenues ont été analysées statistiquement par le programme GraphPad Prism 4.0. Des analyses de type student t-test ou chi-square ont été effectuées selon le type de données.

2.6.4 Extraction de l'ADN génomique et vérification de la taille de l'expansion

Le sang des patients a été obtenu avec le consentement de tous les participants. L'extraction de l'ADN à partir du sang a été fait selon un protocole standard (Sambrooke *et al.* 1989). L'amplification par PCR et la mesure de la taille de l'expansion ont été faits chez tous nos patients, tel que décrit (Brais *et al.* 1998). Nous nous sommes concentrés uniquement sur les patients canadiens-français hétérozygotes pour l'expansion (GCN)₁₃. Tous les patients homozygotes ou hétérozygotes composés pour deux mutations ont été omis de l'étude.

2.6.5 Haplotypage et création des arbres généalogiques

Des haplotypes ont été créés chez les individus provenant de 16 familles canadiennes-françaises composées d'au moins deux cas sévères. Le PCR et l'électrophorèse de dénaturation pour six marqueurs polymorphiques de type STS flanquants le gène *PABPNI* ont été faits selon le protocole décrit pour les marqueurs D14S1456, D14S990, cos57, D14S1459, D14S1458, et D14S1457 (Brais *et al.* 1997). La taille des allèles pour les différents marqueurs a été déterminée. Les haplotypes ont été construits grâce aux données familiales. Les généalogies ont été construites avec le programme Cyrillic2.1.

2.6.6 Analyse de liaison

L'analyse de liaison paramétrique et non-paramétrique a été effectuée avec les haplotypes du chromosome 14 de 10 familles canadiennes-françaises. Les résultats rapportés proviennent de l'analyse multipoint du chromosome 14 avec le programme GENEHUNTER.

2.7 Résultats

2.7.1 Caractéristiques des patients sévères et classiques

Les caractéristiques de nos patients canadiens-français sévères et classiques sont représentées dans le tableau III. Il y a un total de 89 patients sévères et 163 patients classiques. La moyenne d'âge, lors de l'examen clinique, pour les patients classiques et sévères est la même : 60.8 ans.

2.7.2 L'âge de la première manifestation de la DMOP

L'objectif de cette section est de déterminer s'il y a une différence entre l'âge d'apparition de la DMOP chez les patients canadiens-français sévères comparativement aux patients classiques (non sévères). L'âge d'apparition de la première manifestation de la DMOP est considérée comme étant l'âge déclaré de la ptose ou de la dysphagie. Suite à une analyse de type student t-test, il n'y a pas de différence significative entre nos patients sévères (47.26 ± 6.867 , $n=86$) et nos patients classiques (48.61 ± 7.828 , $n=131$) (figure 10A, $P = 0.1922$). Ainsi, contrairement aux cas sévères rapportés dans la littérature, nos patients sévères n'ont pas une manifestation de la DMOP plus précoce. Toutefois, la comparaison de l'âge de la première manifestation de faiblesse musculaire entre les patients sévères et classiques démontre une différence significative (Figure 10B, $P = 0.0055$). En moyenne, l'âge d'apparition de la faiblesse musculaire chez les patients sévères ($n=72$) arrive quatre ans plus tôt que chez les patients classiques ($n=49$).

Tableau III. Caractéristiques des patients sévères et classiques atteints de la DMOP.

Caractéristiques	Sévères	Classiques
No. de sujets	89	163
Groupes d'âges (%)		
< 50 ans	10.1	16.6
50-65 ans	65.2	51.6
> 65 ans	24.7	31.8
Moyenne d'âge (ans)	60.8 ± 7.1	60.8 ± 10.2
Sexe (%)		
Femme	51	56
Homme	49	44

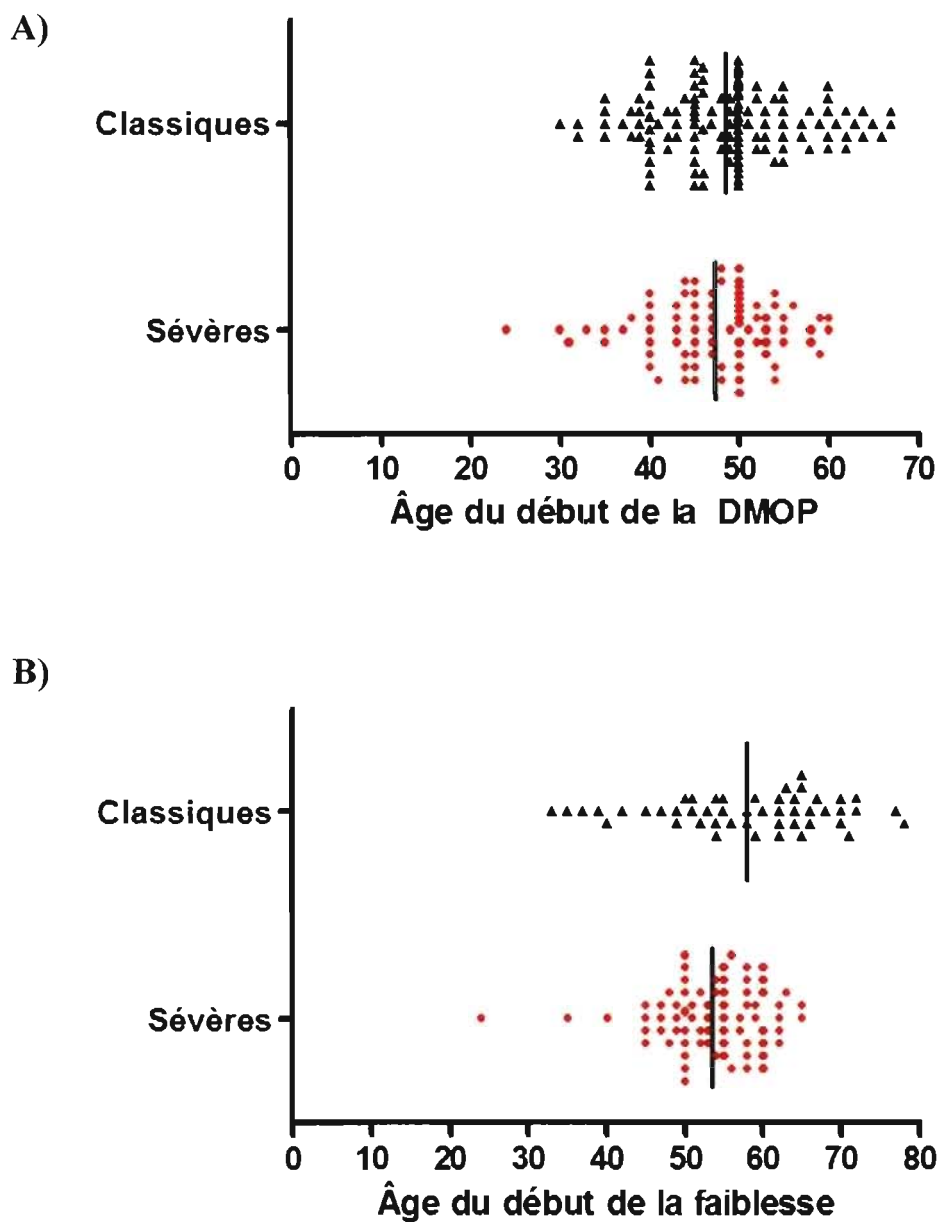


FIGURE 10: Distribution d'âge. A) L'âge de la première manifestation de la DMOP chez les patients sévères (47.26 ± 6.867 , $n=86$) et classiques (48.61 ± 7.828 , $n=131$) (P value = 0.1922), B) l'âge de la première manifestation de la faiblesse musculaire chez les patients sévères (53.42 ± 6.788 , $n=72$) et classiques (57.96 ± 10.89 , $n=49$) (P value = 0.0055).

2.7.3 Faiblesse Musculaire

L'objectif de cette section est de déterminer si la sévérité résulte en une augmentation du risque d'avoir une faiblesse musculaire proximale et distale. Les muscles les plus rapprochés du tronc sont appelés muscles proximaux, tandis que ceux les muscles les plus éloignés sont appelés muscles distaux. Afin de répondre à l'objectif mentionné ci-haut, une comparaison de la faiblesse musculaire (proximale et distale) entre les patients sévères et classiques a été effectuée (figure 11). Évidemment, puisque la faiblesse musculaire fait partie de nos critères de sévérité, on s'attend à ce que les patients sévères aient un plus grand risque de faiblesse musculaire.

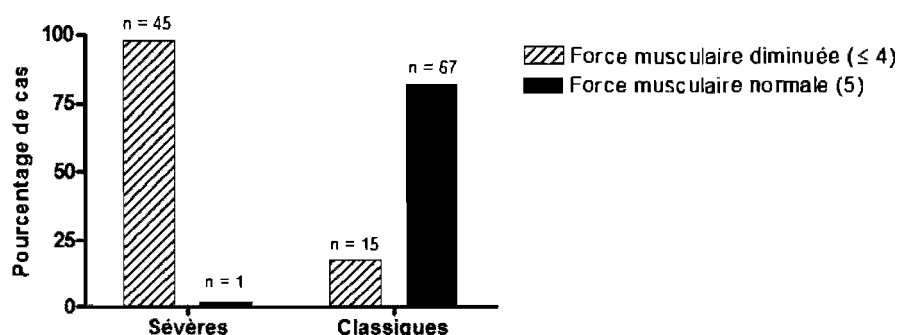
La comparaison de la faiblesse musculaire proximale des membres inférieurs (MI) entre patients sévères (n= 46) et classiques (n=82) démontre une différence significative (figure 11A, Chi-Square $P < 0.0001$). En effet, les patients sévères ont un risque 5,4 fois plus élevé de souffrir de faiblesse musculaire au niveau des MI que les patients classiques (RR = 5.4, IC-95 % = 3.4 à 8.5).

Il y a également une différence significative au niveau de la faiblesse musculaire proximale des membres supérieurs (MS) entre nos patients sévères (n=75) et classiques (n=152) (figure 11B, Chi-Square $P < 0.0001$). Les patients sévères ont une probabilité 9,7 fois plus élevée de souffrir de faiblesse musculaire au niveau des MS que les patients classiques (RR = 9.7, IC-95 % = 5.2 à 18.1).

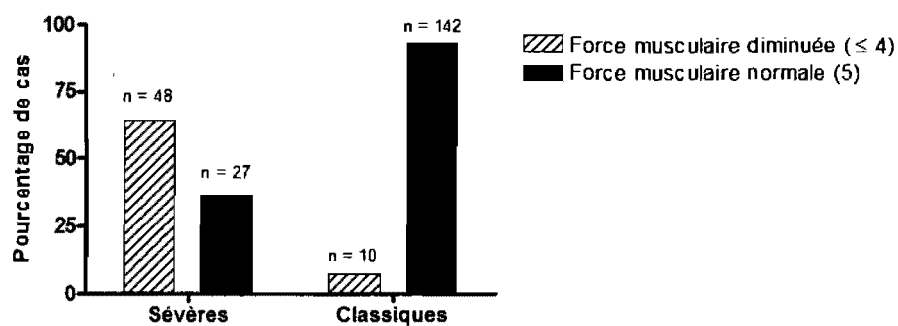
Finalement, la comparaison de la faiblesse musculaire distale entre patients sévères (n=46) et classiques (n=80) démontre aussi une différence significative (figure 11C, Chi-Square $P < 0.0001$). Les cas sévères ont 16,52 fois plus de chance d'avoir une faiblesse distale que les cas classiques (RR = 16,5, IC-95 % = 4.028 to 67.77).

Nos cas sévères ont une faiblesse proximale des MI, tout comme les cas sévères rapportés dans la littérature. Cependant, nos patients sévères ont également une faiblesse proximale des MS et une faiblesse distale.

A) Force musculaire proximale des MI



B) Force musculaire proximale des MS



C) Force musculaire distale

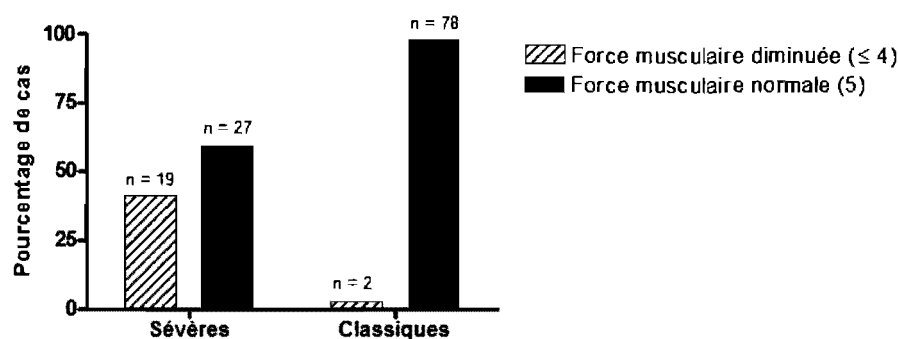


FIGURE 11: Comparaison de la faiblesse musculaire entre patients sévères et classiques. A) Force musculaire proximale des membres inférieurs ($P < 0.0001$, $RR = 5.4$, $IC-95 \% = 3.4 \text{ à } 8.5$), B) Force musculaire proximale des membres supérieurs ($P < 0.0001$, $RR = 9.7$, $IC-95 \% = 5.2 \text{ à } 18.1$), C) Force musculaire distale ($P < 0.0001$, $RR = 16,5$, $IC-95 \% = 4.028 \text{ to } 67.77$). Cliniquement, la force musculaire est mesurée sur une échelle de 0 à 5. La cote 5 représente la force musculaire normale, tandis que les différents degrés de faiblesse musculaire sont représentés par les cotes de 0 à 4 (voir tableau II).

2.7.4 Limitation des Mouvements Oculaires

L'objectif de cette section est de déterminer si la sévérité résulte en une augmentation du risque d'avoir une limitation des mouvements oculaires. Afin de répondre à cet objectif, une comparaison de la limitation des mouvements oculaires entre les patients sévères et classiques a été effectuée (figure 12). Une analyse de type Chi-square a permis de mettre en évidence une différence significative entre nos patients sévères (n= 82) et classiques (n= 140) pour une limitation des mouvements oculaires (Chi-square, $P < 0.0001$). En effet, les patients sévères ont 32 % plus de chance de souffrir d'une limitation des mouvements oculaires que les patients classiques (RR = 2.0, DR = 32 %, IC-95 % = 1.5 to 2.6).

2.7.5 Les réflexes ostéotendineux

L'un des signes d'une neuropathie est une absence des réflexes ostéotendineux (ROT). Normalement, le ROT se caractérise par une brève réaction motrice suite à la percussion d'un tendon à l'aide d'un marteau réflexe. Ainsi, l'objectif de cette section est de déterminer si la sévérité résulte en une augmentation du risque d'avoir une aréflexie (absence de ROT).

La comparaison d'aréflexie entre patients sévères (n=56) et classiques (n=85) démontre une différence significative (figure 13A, Chi-Square $P = 0.0088$). En effet, les patients sévères ont 22.5 % plus de chance d'avoir une absence de ROT (aréflexie) que les patients classiques (RR = 1.6, DR = 22.5 %, IC-95 % = 0.05 to 0.4).

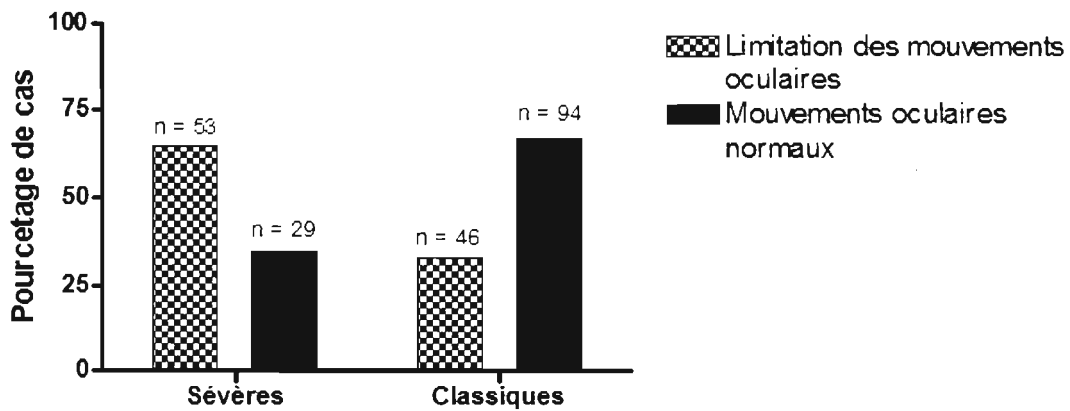


Figure 12 : Comparaison de la limitation des mouvements oculaires entre patients sévères (n= 82) et classiques (n=140) ($P < 0.0001$, RR = 2.0, IC-95 % = 1.5 to 2.6).

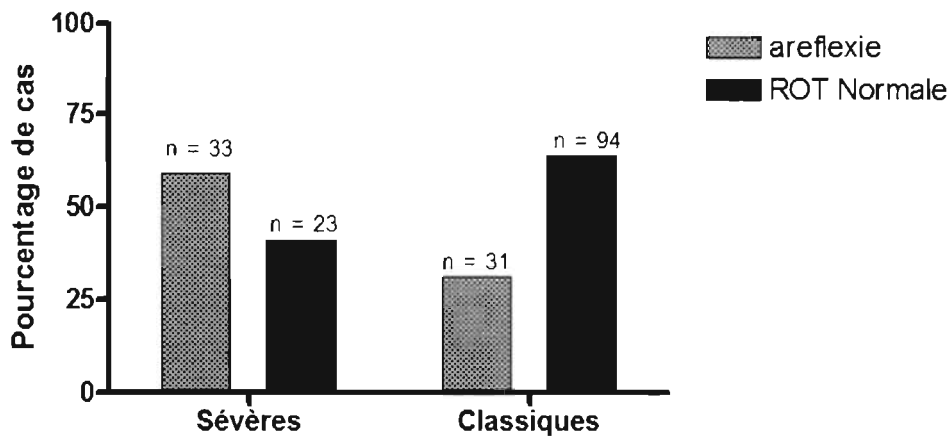


Figure 13 : Comparaison de l'aréflexie entre patients sévères (n= 56) et classiques (n=85) ($P = 0.0088$, RR = 1.6, IC-95 % = 0.05 to 0.4). L'aréflexie représente une absence des réflexes ostéotendineux.

2.7.6 Créatine Kinase

En premier lieu, l'objectif est de déterminer si nos patients sévères ont une augmentation de leur niveau de CK plasmatique. Afin de répondre à l'objectif, nous avons comparé le niveau de CK plasmatique entre les patients sévères et classiques. Suite à une analyse de type student t-test, nous observons une différence significative du niveau de CK sérique entre nos patients sévères (2.6 ± 3.6 , $n=50$) et nos patients classiques (1.6 ± 1.3 , $n=68$) (figure 14, $P = 0.0379$). Toutefois, la différence est plus importante entre les patients sévères (2.8 ± 3.8 , $n=42$) et classiques (1.3 ± 0.9 , $n=37$) âgés de 50 à 70 ans ($P = 0,0229$).

La faiblesse musculaire engendre une limitation des activités de la vie quotidienne. Il est donc important d'identifier les patients sévères afin de mieux les encadrer, surtout les individus âgés de 50 à 70 ans. Pour cette raison, nous voulons déterminer si le niveau plasmatique de CK peut être utilisé comme indicateur de la sévérité. Afin d'évaluer ce test prédictif, une courbe ROC (Receiver Operator Characteristics) a été construite à partir des niveaux de CK plasmatique des patients sévères et classiques âgés de 50 à 70 ans. La courbe ROC représente la spécificité et la sensibilité du test prédictif à chaque niveau de CK plasmatique. Afin de pouvoir faire une distinction entre les individus sévères et classiques, un niveau de CK avec une sensibilité et une spécificité appropriée doit être choisi. La sensibilité représente la capacité du test à fournir un résultat positif quand les personnes sont réellement sévères, tandis que la spécificité du test représente la capacité du test à fournir un résultat négatif quand les personnes ne sont pas sévères. Étant donné qu'il n'existe pas de traitement encore pour la DMOP, il est préférable de privilégier la spécificité, car les répercussions des faux positifs sont trop grandes (avoir à gérer avec l'idée d'avoir une forme sévère, peut causer de l'anxiété). Donc, selon nous, un diagnostic de sévérité doit être fait lorsque le niveau de CK est plus élevé que 1.9 (spécificité = 81 %, sensibilité= 43%). L'aire sous la courbe ROC (figure 15) représente la capacité du test prédictif à discriminer entre les patients sévères et classiques. Un test prédictif idéal doit avoir une aire sous la courbe de 1.00, tandis qu'un test diagnostique inutile a une aire sous la courbe de 0.5. Notre test a une aire de 0.7 ($p=0.0064$, $IC-95\%= 0.6$ à 0.8). Ainsi, bien que notre test puisse faire une distinction entre les patients sévères et classiques, il n'est pas absolu.

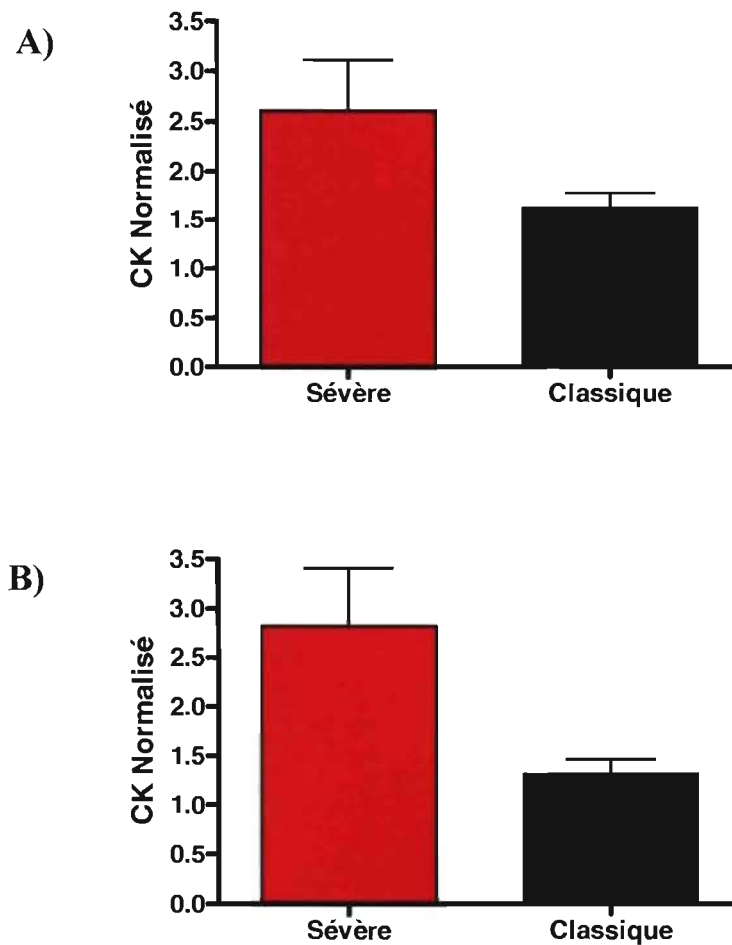


FIGURE 14: Niveau de créatine kinase (CK) plasmatique de patients sévères et classiques. A) Comparaison des taux de CK entre patients sévères (2.6 ± 3.6 , $n=50$) et patients classiques (1.6 ± 1.3 , $n=68$) ($P = 0.0379$), B) Comparaison des taux de CK entre les patients sévères (2.8 ± 3.8 , $n=42$) et classiques (1.3 ± 0.9 , $n=37$) âgés de 50 à 70 ans ($P = 0,0229$).

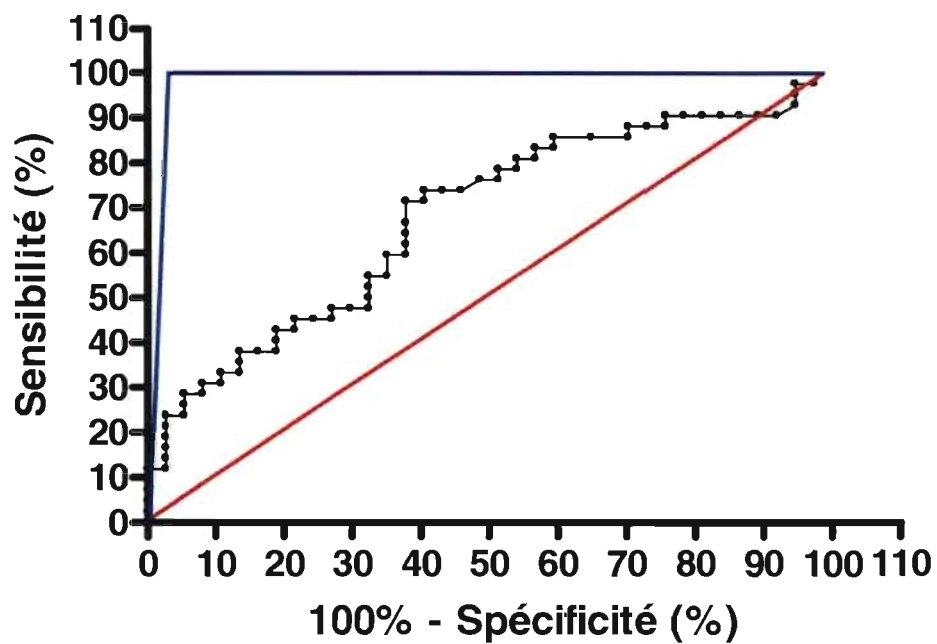


FIGURE 15 : Courbe ROC pour le niveau plasmatique de CK. Cette courbe a été construite partir des valeurs de CK normalisées de patients sévères et classiques âgés de 50 à 70 ans. L'aire sous la courbe ROC est de 0.7 ($p=0.0064$, IC-95%= 0.6 à 0.8). L'aire sous la courbe ROC représente la capacité du test prédictif à discriminer entre les patients sévères et classiques. Un test prédictif idéal doit avoir une aire sous la courbe de 1.00 (—), tandis qu'un test diagnostique inutile a une aire sous la courbe de 0.5 (—).

2.7.7 Analyse de la deuxième copie du gène *PABPN1*

Nos patients canadiens-français ne sont ni homozygotes pour l'expansion (GCN)₁₃, ni hétérozygotes composés. Cependant, certains d'entre eux sont sévères. Le fait que nos patients soient tous hétérozygotes pour l'expansion (GCN)₁₃ n'exclut pas la possibilité qu'une deuxième mutation se retrouve ailleurs dans la deuxième copie du gène *PABPN1*. Ainsi, l'objectif de cette section est de déterminer si l'autre copie du gène *PABPN1* est responsable de la sévérité. Pour y parvenir, les haplotypes des patients classiques et sévères apparentés ont été comparés.

Les individus atteints de la famille représentée à la figure 16 partagent l'allèle (GCN)₁₃ pour l'un des chromosomes parentaux (en rouge). Si la sévérité est due au deuxième allèle de *PABPN1*, les individus sévères et classiques de cette famille devraient avoir reçu des allèles différents provenant de l'autre parent. Or, on observe que le patient d) (sévère) et e) (classique) partagent le même deuxième allèle pour *PABPN1*, donc la sévérité ne peut être attribuée à la deuxième copie *trans* du gène.

Nous avons également comparé le degré de partage de la deuxième copie du gène *PABPN1* (*trans*) dans 16 de nos familles canadiennes-françaises comportant au moins deux cas sévères (Tableau IV). Si la deuxième copie du gène *PABPN1* influençait effectivement la sévérité, on s'attendrait à un partage du deuxième allèle chez tous les patients sévères apparentés (100 %). Or, seulement 66 % des patients sévères apparentés sont concordants pour la copie en *trans* de *PABPN1*. Similairement, on s'attendrait à ce qu'il n'y ait aucun partage de la deuxième copie de *PABPN1* chez des patients sévères et classiques apparentés (0 %). Néanmoins, 52 % des patients sévères et classiques apparentés partagent la même deuxième copie de *PABPN1*. L'étude d'un plus grand nombre de familles canadiennes-françaises confirme les résultats présentés à la figure 16, c'est-à-dire que la deuxième copie du gène *PABPN1* en *trans* n'influence pas la sévérité dans notre cohorte canadienne-française.

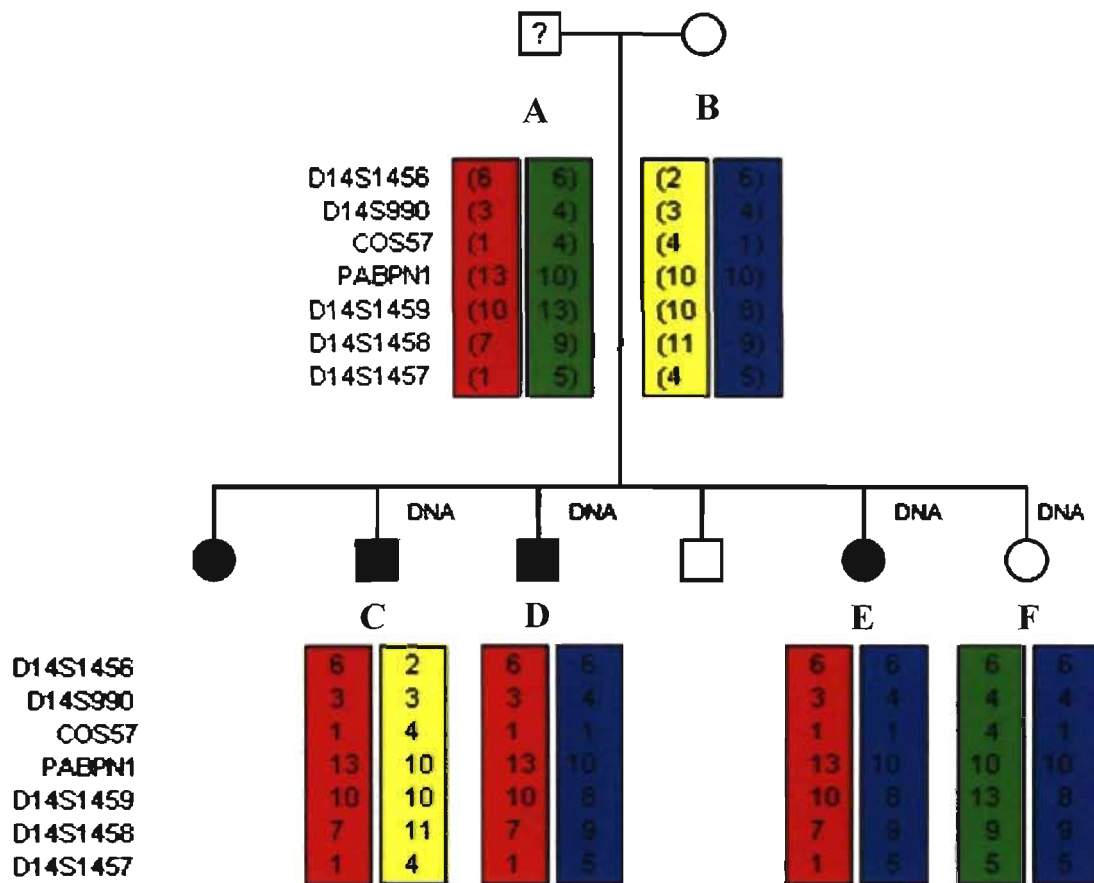


FIGURE 16: Haplotypage d'une famille canadienne-française avec l'expansion $(GCN)_{13}$ afin d'analyser si le deuxième allèle influence la sévérité. Les patients c) et d) sont sévères, tandis que le patient e) est classique. L'individu f) n'est pas atteint de la DMOP. Les haplotypes des individus a) et b) ont été inférés grâce aux patients c) à f). L'haplotypage démontre que le deuxième allèle hérité n'influence pas la sévérité de la DMOP.

Tableau IV. Degré de partage du deuxième allèle de PABPN1 entre patients apparentés sévères-sévères (vert) et entre patients apparentés sévères-classiques (rouge) chez 16 familles canadiennes-françaises.

Nombre de famille avec 2 cas sévères ou plus	16
Nombre d'individus sévères apparentés	31
Pourcentage de sévères apparentés qui sont concordant pour la copie en <i>trans</i> de PABPN1	66 %
Nombre de cas sévères et classiques apparentés	54
Pourcentage de concordance entre les patients sévères et classiques apparentés pour la copie en <i>trans</i> de PABPN1	52 %

2.7.8 Détermination du mode de transmission de la DMOP sévère

Étant donné que la deuxième copie du gène *PABPN1* n'influence pas la sévérité, il s'avère intéressant de déterminer si la sévérité a une composante génétique. Notre objectif est alors de déterminer si la sévérité suit un mode de transmission mendélien. Afin de compléter cet objectif, nous avons analysé les pedigrees de 23 familles canadiennes-françaises (figure 17).

Lorsqu'on divise le nombre de patients sévères par le nombre de patients avec la DMOP (sévere + classique) pour chaque famille, on obtient le pourcentage de patients sévères (tableau V). Si ce pourcentage est aux environs de 50 %, on peut déduire que la transmission est dominante. En effet, les résultats obtenus montrent un pourcentage moyen de patients sévères à 52 %. Ces résultats suggèrent que la sévérité dans notre cohorte suit probablement un mode de transmission dominant.

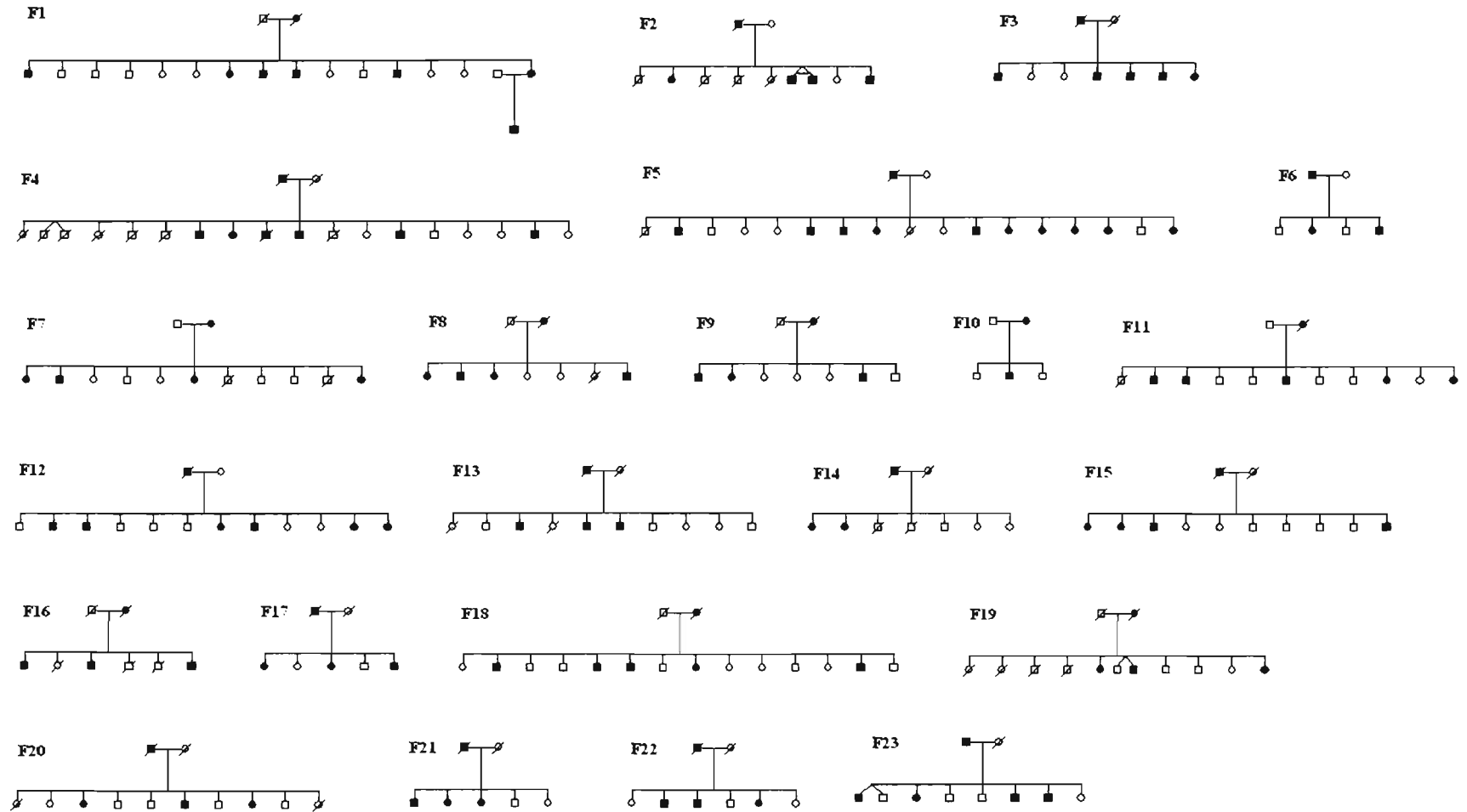


FIGURE 17: Pedigrees de 23 familles canadiennes-françaises atteint de la DMOP sévère avec l'expansion (GCN)₁₃. Légende : mâle (□), femelle (○), patients sévères (■), patients classiques (●), individus non-atteint (□), individu avec phénotype inconnu (?).

Tableau V. Nombre de patients sévères et classiques apparentés chez 23 familles canadiennes-françaises avec l'expansion (GCN)₁₃. La division du nombre de patients sévères par le nombre de patients atteint de la DMOP pour chaque famille donne une indication du mode de transmission. La moyenne du nombre de patients sévères sur le nombre de patients atteints de la DMOP est de 52 %.

Famille	# DMOP sévère	# DMOP classique	Sévère/DMOP	%
1	6	0	1,00	100,0
2	3	1	0,75	75,0
3	4	1	0,80	80,0
4	3	3	0,50	50,0
5	3	7	0,30	30,0
6	1	1	0,50	50,0
7	2	2	0,50	50,0
8	3	1	0,75	75,0
9	1	2	0,33	33,3
10	1	0	1,00	100,0
11	1	4	0,20	20,0
12	2	4	0,33	33,3
13	1	3	0,25	25,0
14	1	1	0,50	50,0
15	2	2	0,50	50,0
16	1	2	0,33	33,3
17	1	2	0,33	33,3
18	2	3	0,40	40,0
19	1	2	0,33	33,3
20	1	2	0,33	33,3
21	2	1	0,67	66,7
22	2	1	0,67	66,7
23	3	1	0,75	75,0
moyenne est de 52 %				

2.7.9 Analyse de liaison du chromosome 14

Une étude sur la sévérité de la maladie d'Huntington, a démontré qu'il y a un locus modulateur de la sévérité qui se trouve sur le même chromosome que le gène codant pour la protéine responsable de la maladie (la protéine huntingtin) (Li *et al.* 2003). Plus récemment, cette équipe a trouvé des mutations dans la région promotrice du gène *huntingtin* chez les patients atteints d'une forme sévère (Warby *et al.* 2006; données non-publiées). Malgré que les résultats de la section 2.7.7 démontrent que la deuxième copie du gène *PABPN1* n'influence pas la sévérité, il pourrait toujours y avoir une mutation dans un site de régulation de l'expression du gène *PABPN1* sur le chromosome 14. C'est la raison pour laquelle nous avons fait une étude de liaison du chromosome 14.

L'analyse de liaison génétique examine la ségrégation d'une région chromosomique avec une maladie. Elle consiste à mettre en évidence la co-ségrégation d'un marqueur polymorphique avec le locus de la maladie dans les familles. Plus un marqueur est proche du gène impliqué dans la pathologie, plus la probabilité de les séparer lors des étapes de réplication de l'ADN sera faible et celle de les hériter ensemble, élevée. Les méthodes statistiques utilisées pour réaliser cette analyse peuvent être paramétriques, si on connaît le mode d'hérédité de la maladie étudiée (autosomique dominant pour la sévérité, voir section 2.7.8), ou non-paramétriques.

La méthode paramétrique nécessite d'établir un modèle génétique de la maladie. Il faut ainsi déterminer le mode de transmission de la maladie. Cette méthode repose sur le calcul du LOD score. Un LOD score supérieur à 3 permet de conclure à l'existence d'une liaison significative (avec un risque de 1 pour 1000 que ce résultat soit dû au hasard). Des valeurs de LOD score inférieures à -2 indiquent l'absence de liaison. Entre -2 et 3, le résultat est non significatif, tout dépendant de la puissance de chaque famille.

Pour cette étude, l'analyse de liaison paramétrique a été effectuée avec les haplotypes du chromosome 14 chez 10 familles canadiennes-françaises. Les résultats rapportés proviennent de l'analyse multipoint du chromosome 14 avec le programme GENEHUNTER. Le LOD score cumulatif pour le chromosome 14 est de 6,7 ($p=0001$, figure 18). Ainsi, il semble y avoir un modulateur génétique de la sévérité sur le chromosome 14.

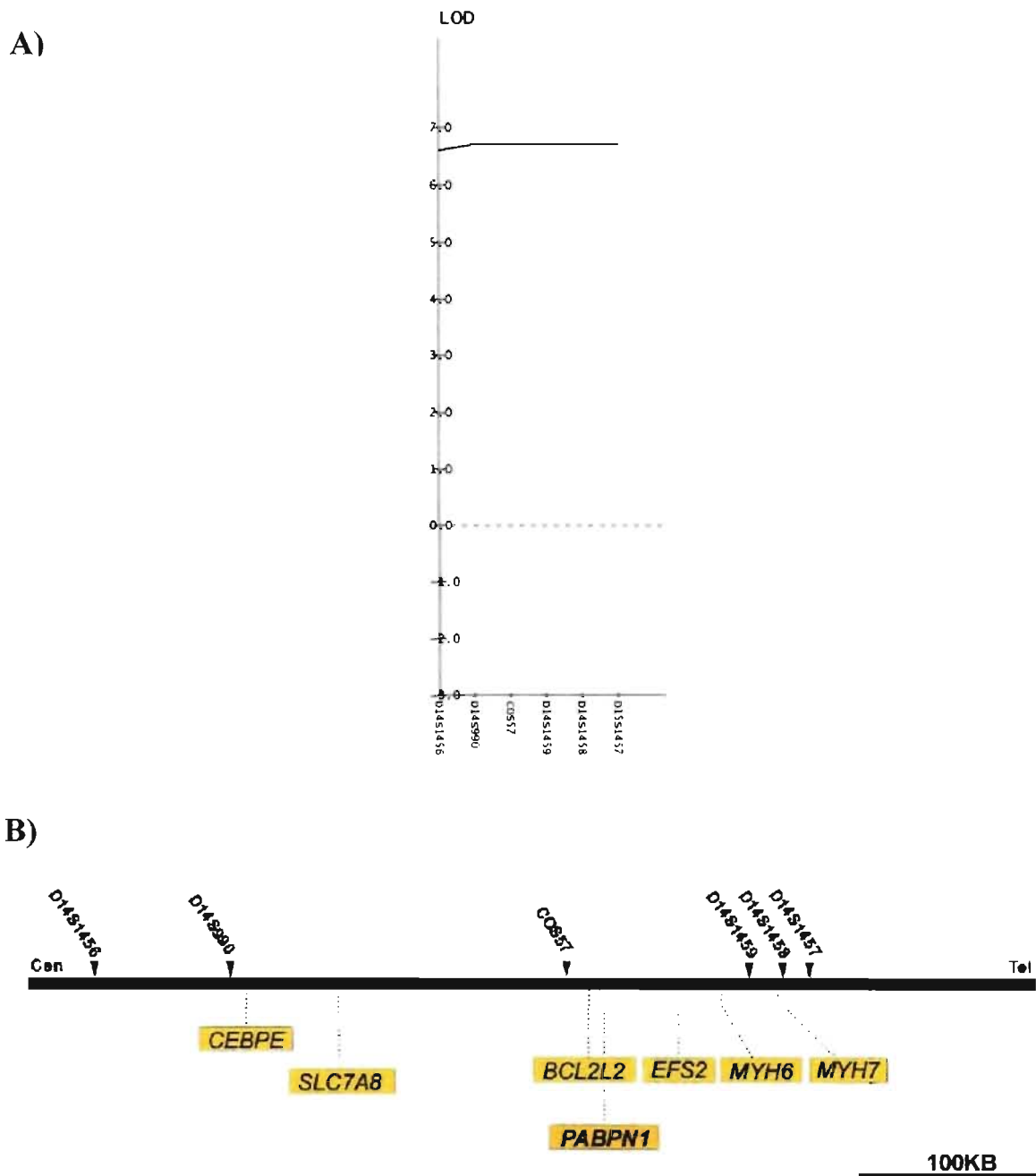


FIGURE 18: Carte physique du locus de la DMOP et analyse de liaison paramétrique multipoint du chromosome 14 chez neuf familles canadiennes-françaises. A) Le LOD score pour le chromosome 14 est de 6,7 ($p=0001$, figure 18). Il semble donc y avoir un modulateur génétique de la sévérité sur le chromosome 14. Six marqueurs polymorphiques de type STS flanquant le gène *PABPN1* ont été utilisés pour l'analyse. Le mode de transmission de la sévérité est dominant. B) Carte physique du locus de la DMOP sur le chromosome 14q11.1 La position des marqueurs microsatellites les plus près du gène *PABPN1* sont indiqués par une pointe de flèche. Les gènes identifiés dans cette région sont encadrés et nommés selon leur abréviation dans UCSC.

Afin de déterminer si la sévérité pourrait être dû à d'autres loci ou à l'environnement, nous avons effectué une analyse de liaison non-paramétrique à partir du chromosome 14. Dans la méthode non-paramétrique, le logiciel Genehunter accepte qu'un individu porteur de l'allèle pour la sévérité ne soit pas sévère et vice-versa car d'autres facteurs peuvent influencer le phénotype. Cette méthode repose sur le calcul du LOD score non paramétrique (NPL). Avec un NPL de 4,5, un modulateur génétique, ailleurs dans le génome et/ou l'effet de l'environnement est significatif. Le NPL cumulatif pour le chromosome 14 est de 4,5 ($p=0001$). Puisque le LOD score total est plus élevé que le NPL cumulatif (6,5 vs 4,5) il est probable qu'il y ait un modulateur génétique de la sévérité sur le chromosome 14. Cependant, puisque la valeur NPL est significative (4,5), il y a fort probablement d'autres facteurs ailleurs que sur le chromosome 14 (autant génétiques qu'environnemental).

3. Chapitre 3

Le rôle des protéines à domaine polyalanine dans la DMOP

3.1 Oligomères de polyalanine

3.1.1 Propriétés des oligomères de polyalanine

3.1.1.1 Tendance à l'agrégation

Traditionnellement, l'alanine était considérée comme un résidu formant préférentiellement des hélices α (Chou & Fasman, 1978; Marqusee *et al.* 1989; Chakrabarty *et al.* 1994). Toutefois, plusieurs travaux récents montrent que les séquences de polyalanine peuvent former des feuillets β (Blondelle *et al.* 1997, Forood *et al.* 1995, Scheuermann *et al.* 2003; Shinchuk *et al.* 2005). En effet, il a été démontré, par l'intermédiaire de diffraction de rayon X, que des oligomères d'alanines contenant plus de 8 alanines consécutives forment des feuillets β stables (Blondelle *et al.* 1997). Ces feuillets β s'empilent pour former des macromolécules de fibrilles. Ainsi, les peptides homopolymériques d'alanine ont une tendance à l'agrégation. Les auteurs de cet article ont également démontré que l'agrégation dépend de la longueur de la polyalanine (Blondelle *et al.* 1997). En effet, des oligomères de 7 alanines ne forment pas de fibrille, ils adoptent plutôt une conformation en hélice α . La tendance à l'agrégation a été corroborée par une deuxième étude qui a démontré que les oligomères avec plus de 8 alanines de suite forment des fibrilles spontanément (Shinchuk *et al.* 2005).

3.1.1.2 Résistance à la dégradation et à la dénaturation

Forood et collaborateurs ont démontré que des feuillets β stables résistants à la dégradation enzymatique (protéinase K) et à la dénaturation chimique (urée) étaient formés par des concentrations suffisantes de peptide polyalanines (Forood *et al.* 1995). De plus les feuillets β sont également résistants à la température et au pH (Shinchuk *et al.* 2005).

3.1.2 Propriétés des oligomères de polyalanine *in vitro*

La transfection de séquences polyalanines couplées à la EGFP (Rankin *et al.* 2000) ou à de la YFP (Oma *et al.* 2004) entraîne la formation d'inclusions dans le cytoplasme des cellules. Toutefois, l'addition d'un NLS permet l'accumulation de ces inclusions dans le noyau de la cellule (Bao *et al.* 2002). La formation d'inclusions intra-cytoplasmiques ou intranucléaires obtenue dans ces expériences semble être associée à l'apoptose (Rankin *et al.* 2000; Bao *et al.* 2002; Ravikumar *et al.* 2002). La surexpression de chaperonnes tend à réduire la mort cellulaire et la formation d'agrégats occasionnés par l'agrégation de peptides homopolymériques d'alanine (Rankin *et al.* 2000; Bao *et al.* 2002; Ravikumar *et al.* 2002).

3.2 PABPN1 et l'agrégation

3.2.1 L'agrégation dans les modèles cellulaires de la DMOP

D'après des études récentes effectuées *in vitro*, il apparaît que seul le domaine C-Terminal de PABPN1, qui contient le domaine de liaison à l'ARN, est nécessaire à l'agrégation non-spécifique de la protéine (Fan *et al.* 2001; Kuhn *et al.* 2003; Scheuermann *et al.* 2003). En effet, même la transfection de la forme sauvage de PABPN1 entraîne la formation d'inclusions intranucléaires dans des modèles cellulaires (Bao *et al.* 2002; Tavanez *et al.* 2005; Corbeil-Girard *et al.* 2005; Wang *et al.* 2006). Toutefois, l'expression de la forme mutée de PABPN1 (expansion du domaine polyalanine) est associée à une plus grande prédisposition à la formation d'agrégats (Shanmugam *et al.* 2000; Fan *et al.* 2001; Bao *et al.* 2002; Abu-Baker *et al.* 2003; Fan *et al.* 2003; Bao *et al.* 2004; Tavanez *et al.* 2005; Wang *et al.* 2006). Ces observations ont aussi été confirmées dans les différents modèles animaux de la maladie (Davies *et al.* 2005; Uyama *et al.* 2005; Chartier *et al.* 2006). Certains modèles cellulaires démontrent également une association entre la formation d'inclusions et la mort cellulaire (Fan *et al.* 2001; Bao *et al.* 2002; Abu-Baker *et al.* 2003; Bao *et al.* 2004).

Les inclusions formées par la surexpression de PABPN1 possèdent de nombreuses caractéristiques des IIN de la pathologie: présence de chaperonnes, des

composants du système ubiquitine-protéasome, d'ARN et des co-facteurs de transcriptions (HNRPA1, SFRS3, CUGBP1).

3.2.2 L'agrégation dans les modèles transgéniques de la DMOP

Il existe trois souris transgéniques exprimant la protéine PABPN1 mutée (Dion *et al.* 2005; Davies *et al.* 2005; Uyama *et al.* 2005). La surexpression de PABPN1 mutée (13 alanines) sous le contrôle d'un promoteur CAG (Chicken Beta Actin promoter with CMV enhancer) entraîne la formation d'agrégat dans les noyaux des cellules musculaires (Uyama *et al.* 2005). Le phénotype des souris ainsi produit démontre des atteintes au niveau des muscles oculaires et pharyngées (Uyama *et al.* 2005). Chez le modèle transgénique de Dion *et al.* (2005), il y a une surexpression de PABPN1 mutée (17 alanines) sous le contrôle de son propre promoteur (Dion *et al.* 2005). Toutefois, plutôt que d'avoir une myopathie, les souris ont une atteinte neuronale (Dion *et al.* 2005). D'ailleurs ces souris ont uniquement des inclusions au niveau de leurs neurones périphériques. Finalement, le modèle transgénique de Davies et collaborateurs démontre une atteinte musculaire progressive avec formation d'agrégats dans les noyaux des myocytes (Davies *et al.* 2005). Dans ce modèle, il y a une surexpression de PABPN1 mutée (17 ala) sous le contrôle d'un promoteur fort HSA (Human Skeltal Actin). Dans les trois modèles transgéniques, une souris contrôle a été créée afin d'observer l'effet de PABPN1 normale (10 alanines) sur l'agrégation et le phénotype des souris. Les souris contrôles présentaient un phénotype normal : cependant, les auteurs ont remarqué également la présence d'inclusions, mais dans des proportions largement moins importantes que chez les souris exprimant la forme mutée. Ces expériences démontrent la capacité d'agrégation de PABPN1 dans des organismes vivants et ce, même dans sa forme sauvage. De plus, ces études confirment qu'une expression élevée de la protéine semble nécessaire pour obtenir un phénotype.

3.2.3 Essai thérapeutique : l'anti-agrégation

De nombreuses études ont montrées un lien entre l'agrégation de PABPN1 et la toxicité cellulaire. La diminution de l'agrégation de PABPN1 mutée entraîne une

diminution de la mort cellulaire dans les modèles cellulaires et transgéniques de la DMOP. De plus, certains auteurs ont noté l'effet protecteur de la surexpression de chaperonnes (Bao *et al.* 2002; Abu-Baker *et al.* 2003; Wang *et al.* 2005) ou d'anticorps intracellulaires chez les modèles cellulaires de la DMOP (Verheesen *et al.* 2006). L'anticorps cible le domaine coil-coiled de la protéine, qui est supposé jouer un rôle dans l'oligomérisation de PABPN1. De plus, des traitements à la doxycycline ou la tréhalose, toutes deux connues pour inhiber l'agrégation, ont également un effet protecteur chez les modèles cellulaires (Bao *et al.* 2004) et transgéniques (Davies *et al.* 2005; Davies *et al.* 2006).

3.3 Gain de fonction et mécanismes pathophysiologiques de la DMOP

Malgré les différents modèles cellulaires et transgéniques, les mécanismes amenant à la pathologie sont encore mal connus. Dans un premier temps, il semble que l'expansion du domaine polyalanine provoque un effet gain-de-fonction au niveau de la protéine PABPN1. En effet, il est peu probable que la DMOP résulte d'une perte de fonction car il a été démontré que la taille des queues poly(A) des ARNm des patients atteints de la DMOP est normale (Calado *et al.* 2000b). De plus, étant donné l'importance de la polyadénylation dans le processus de transcription, l'existence de patients homozygotes serait très peu probable si ce processus était mis en cause (Blumen *et al.* 1999).

3.4 Autres protéines avec des domaines polyalanines

3.4.1 Fonction de la polyalanine dans le contexte protéique

Une étude récente a montré l'existence de plus de 400 protéines dans le protéome humain contenant au moins un domaine polyalanine de 5 alanines (Lavoie *et al.* 2003). Cette étude a également démontrée qu'il y a une forte proportion de facteurs de transcription parmi ces protéines (Lavoie *et al.* 2003). Ceci suggère donc que le domaine polyalanine aurait un rôle dans la régulation de la transcription (Lavoie *et al.* 2003).

Toutefois, le rôle exact du domaine polyalanine n'est toujours pas connu. Plusieurs auteurs ont suggéré que le domaine polyalanine, au moins dans le cas de

PABPN1, pouvait jouer un rôle dans les interactions protéines-protéines (Brais 2003; Kuhn *et al.* 2003; Scheuermann *et al.* 2003), tandis que d'autres ont suggéré que les domaines polyalanines pouvaient jouer un rôle dans le transport de la protéine ou de sa localisation (Albrecht *et al.* 2005).

3.4.2 Maladies causées par une expansion du domaine polyalanine

Outre la DMOP, huit maladies résultant d'une expansion ou d'une duplication/contraction de triplet (GCN)_n codant pour de la polyalanine dans des gènes différents ont été décrites à ce jour : *HOXD13* pour la sympolydactylie de type 5 (SPD) (Muragaki *et al.* 1996), *RUNX2* pour la dysplasie cleidocraniale (CCD) (Mundlos *et al.* 1997), *ZIC2* pour l'holoprocéphalie de type 5 (HPE5) (Brown *et al.* 1998; Brown *et al.* 2001), *HOXA13* pour le *hand foot genital syndrome* (HFGS) (Goodman *et al.* 2000), *FOXL2* pour le Blepharophimosis/ptosis/epicanthus-invertus de type II (BPESI) (Crisponi *et al.* 2001), *PHOX2B* pour le *congenital central hypovenilation syndrome* (CCHS) (Amiel *et al.* 2003; Sasaki *et al.* 2003), *ARX* pour le *cryptogenic west syndrome* et *X-linked mental retardation* (Bienvenu *et al.* 2002; Kato *et al.* 2003), et *SOX3* pour le *X-linked mental retardation with growth hormone deficiency* (Laumonnier *et al.* 2002). Tous ces gènes, sauf *PABPN1*, codent pour des facteurs de transcription. La plupart de ces gènes entraînent des maladies qui se présentent très tôt au cours du développement alors que la DMOP est une maladie tardive qui se révèle à l'âge adulte (Brown & Brown, 2004). Alors que les autres maladies associées à des expansions de domaine polyalanine, sont causées par des mutations dans des gènes ayant des profils d'expression restreints dans le temps et l'espace, *PABPN1* est exprimé dans toutes les cellules, tout au long de la vie.

3.4.2.1 L'agrégation dans les maladies à polyalanine

PABPN1 n'est pas la seule protéine à former des inclusions. En effet, des études récentes ont démontré que la surexpression et l'expansion du domaine polyalanine des protéines *ARX*, *FOXL2*, *HOXA13*, *HOXD13*, *RUNX2*, et *SOX3* entraîne l'agrégation de

celles-ci (Albretch *et al.* 2004, Caburet *et al.* 2004; Nasrallah *et al.* 2004; Albretch *et al.* 2005). Les protéines FOXL2, HOXA13, HOXD13, RUNX2, et SOX3 forment des agrégats au niveau du cytoplasme (Albretch *et al.* 2004, Caburet *et al.* 2004; Albretch *et al.* 2005), tandis que ARX forme des inclusions au niveau du noyau (Nasrallah *et al.* 2004).

3.5 Objectifs

Malgré les avancées dans l'étude de la DMOP, la relation entre la formation d'inclusion et la pathologie, ainsi que les mécanismes pathologiques de la DMOP restent des sujets peu élaborés. Un mécanisme possible est que PABPN1, par sa capacité à s'agréger, entraîne avec elle des protéines avec des domaines polyalanines. Ceci viendrait donc perturber le fonctionnement de la cellule, car la majorité des gènes comportant des domaines polyalanines sont des facteurs de transcription.

Il y a de fortes raisons de croire que l'élongation du domaine polyalanine de PABPN1 entraîne la séquestration d'autres protéines avec une séquence polyalanine dans les inclusions. Premièrement, les peptides homopolymériques d'alanine ont une tendance à l'agrégation. Deuxièmement, l'expansion du domaine polyalanine de PABPN1 augmente l'agrégation de celle-ci. Ainsi, les expériences présentées dans la section suivante ont pour but d'établir si d'autres protéines avec des domaines polyalanines ont tendance à co-agréger avec PABPN1.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons sélectionné trois protéines non-pathologiques avec un domaine polyalanine comportant 10 alanines ou plus : ID4, BHLHB3, et TBX2 (figure 19). Les protéines BHLHB3 et TBX2 ont été sélectionnées à partir d'une banque de gènes humains codant pour des protéines polyalanines (Lavoie *et al.* 2003), tandis que la protéine ID4 a été sélectionnée suite à l'étude d'expression effectuée au laboratoire. Le gène codant pour ID4 se trouvait surexprimé dans les cellules infectées avec la forme mutée de PABPN1 comparativement aux cellules contrôles (Corbeil-Girard *et al.* 2005). Toutes ces protéines sont des facteurs de transcription.

La protéine BHLHB3 est une protéine ubiquitaire qui est également exprimé dans les muscles squelettiques (Azmi *et al.* 2003). Celle-ci peut interagir avec MyoD et les protéines E. Cette protéine, par son interaction avec MyoD et les protéines E, est un répresseur de la transcription des gènes contenant une boîte E (Azmi *et al.* 2004).

La protéine ID4 contient un domaine de dimérisation BHLH. Toutefois, puisque cette protéine ne contient pas la région basique, elle ne peut pas lier l'ADN. ID4 est surtout exprimée dans les reins, mais elle est également exprimée dans les muscles squelettiques. Cette protéine, par l'hétérodimérisation avec MyoD, empêche la liaison de MyoD à l'ADN. Il y a ainsi une inhibition la transcription de la créatine kinase (Paglucia *et al.* 1995).

La protéine TBX2 est surtout exprimée dans les reins, le poumon et le placenta. Cependant, elle est exprimée à de moindres quantités dans les muscles squelettiques. TBX2 inhibe la transcription de la protéine p16^{INK4a} qui joue un rôle dans le contrôle du cycle cellulaire (Jacobs *et al.* 2000). TBX2 joue également un rôle dans la différenciation du myocarde (Habets *et al.* 2002).

A) Protéine PABPN1



B) Protéines sélectionnées

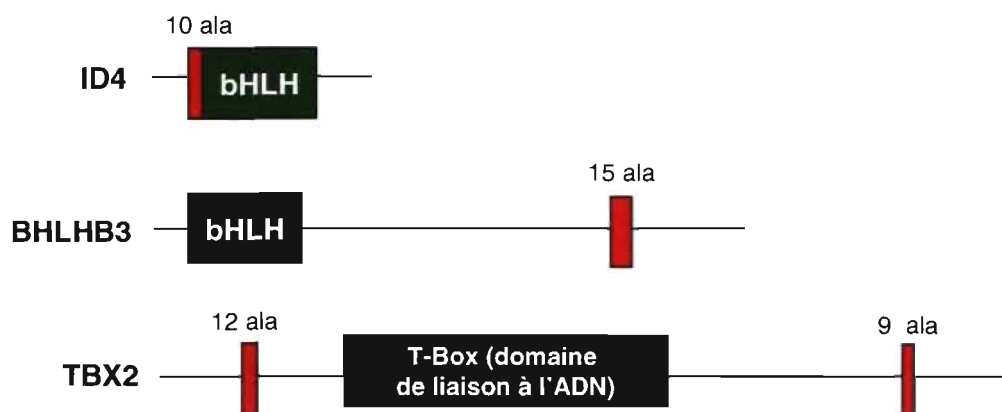


FIGURE 19 : Représentation schématique des protéines sélectionnées. A) La protéine PABPN1, B) les protéines sélectionnées pour l'étude comportant un domaine polyalanine. En rouge sont représentés les domaines alanines, leur taille étant indiquée au-dessus. En vert, sont représentés les domaines principaux de chaque protéine.

3.6 Matériels & Méthodes

3.6.1 Explication de la méthode de Clonage Gateway®

Le clonage a été effectué par la méthode Gateway ® d'Invitrogen (Figure 20). Celle-ci consiste en deux étapes de recombinaison.

3.6.1.1 Première étape de recombinaison : réaction BP

Le cDNA d'intérêt, flanqué par des séquences AttB ajouté par une réaction de PCR, est introduit dans un vecteur pDONR221 (comportant les séquences attP) grâce à une recombinaison médiée par la BP clonase (figure 20A). Ceci donne lieu à un vecteur d'entrée (pDONR221-cDNA) ainsi qu'un sous-produit. Le vecteur pDONR221 possède un gène de résistance à la kanamycine (figure 21).

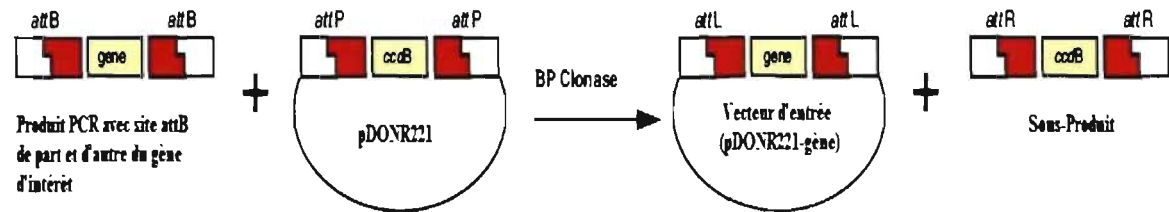
Suite à la recombinaison, le gène *ccdB*, initialement dans le vecteur pDONR221, se retrouve dans le sous-produit. La protéine codée par ce gène est toxique aux bactéries DH5 α . Ainsi, suite à la transformation de bactéries DH5 α par un aliquot de la réaction BP (contenant le vecteur d'entrée et le sous-produit), seulement les bactéries ayant incorporées le vecteur d'entrée pourront survivre (pDONR221-cDNA).

3.6.1.2 Deuxième étape de recombinaison : réaction LR

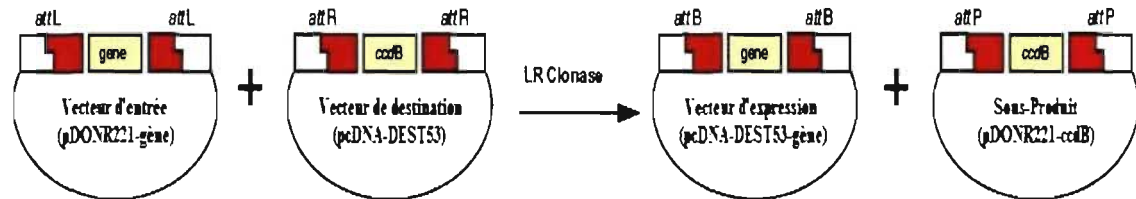
La réaction LR entre le vecteur d'entrée (comportant les séquences attL) et le vecteur de destination (comportant les séquences attR) est effectuée grâce à la LR clonase (figure 20B). Cette recombinaison donne lieu à un vecteur d'expression et un sous-produit. Comme mentionné ci-haut, le gène *ccdB*, initialement dans le vecteur de destination, se retrouve dans le sous-produit.

Le vecteur de destination pour ces expériences est le pcDNA-DEST53. Celui-ci contient le gène GFP en N-terminal. L'un des avantages de la méthode de clonage Gateway® est qu'un gène d'intérêt peut être incorporé dans plusieurs différents vecteurs d'expression tout en conservant le cadre de lecture (figure 20C).

A) Recombinaison BP



B) Recombinaison LR



C)

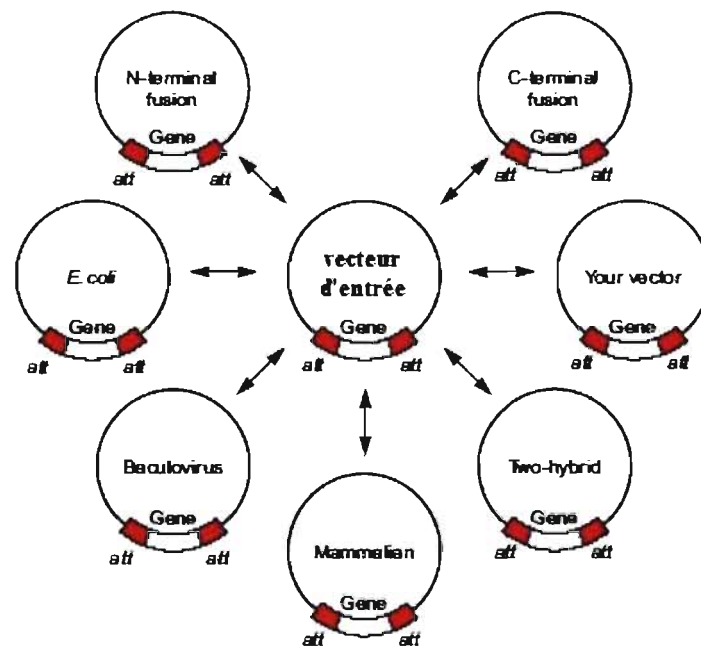


FIGURE 20 : Méthode de clonage Gateway®. A) La réaction BP entre le gène d'intérêt, (flanqué par des séquences AttB) et le vecteur pDONR221 (comportant les séquences attP) est effectuée grâce à la BP clonase. Ceci donne lieu à un vecteur d'entrée (pDONR221-cDNA) ainsi qu'un sous-produit. B) La réaction LR entre le vecteur d'entrée (comportant les séquences attL) et le vecteur de destination (comportant les séquences attR) est effectuée grâce à la LR clonase. Cette recombinaison donne lieu à un vecteur d'expression et un sous-produit (figure adaptée du manuel d'invitrogen, 2004). C) La méthode de clonage Gateway® permet d'introduire un gène d'intérêt dans différents types de vecteurs d'expression sans avoir recours à des digestions enzymatiques.

3.6.2 Clonage

3.6.2.1 Acquisition des cDNA

Les cDNA de ID-4 (Image 4552357), BHLHB3 (Image 4650325), et TBX2 (Image 6339405) ont été acquis chez Invitrogen. Tous les cDNA se retrouvaient à l'intérieur du plasmide pOTB7 (Figure 21).

3.6.2.2 Transformations

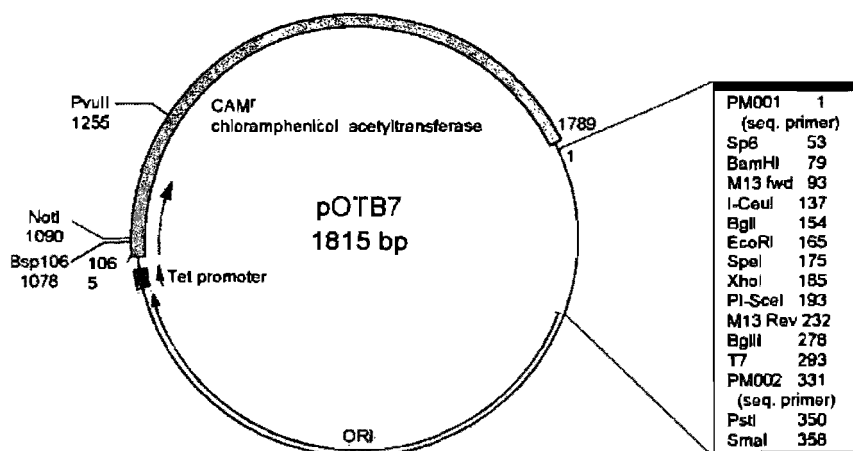
La transformation des cDNA-pOTB7 a été réalisée avec un milieu LB (pour 500 mL : 5 g de caséine peptone, 5 g de NaCl, 2.5 g d'extraits de levure, pH 7.5) et des géloses LB-Agar (7.5 g d'Agar dans 500 mL de LB) contenant 50 µg/mL de chloramphenicol (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario). Cinquante µL de bactéries compétentes DH5α (Invitrogen), gardées à -80°C et décongelées sur glace, ont été utilisées pour la transformation par choc thermique (Sambrook *et al.* 1989).

3.6.2.3 Extractions de l'ADN plasmidique

Les extractions d'ADN plasmidique, à partir des bactéries DH5α, ont été effectuées par la méthode de la lyse alcaline (Sambrooke *et al.* 1989). L'ADN a ensuite été précipité avec de l'éthanol 95 % et de l'acétate de sodium 3M pH 5.2.

3.6.2.4 Digestions

Afin de sortir les cDNA du plasmide pOTB7, une digestion a été effectuée avec les enzymes de restrictions *EcoRI* et *XhoI* (New England Biolab, MA). Toutes les digestions se faisaient avec 3U d'enzyme/µg d'ADN à 37°C pendant 16 heures. Les enzymes étaient ensuite inactivées pour 20 minutes à 65°C.



```

      BamHI
      |
ACTCGAAGGATCCACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTGGTAAACGACG
      |                                     M13 for
      |                                     |
AGTGCTTCCTAGGTGTCAAACATGTTTTTTCGTCCGAACATTTTGCCTGC
      |
      | I-CeuI
      |
GCCAGTAACTATAACGGTCCTAAGGTAGCGAGGCTGGGTGGCGAATTCC
      |                                     BglI
      |                                     |
CGGTCAATTGATATTGCCAGGATCCATCGCTCCGGACCCACCGCTTAAG
      |                                     SpeI
      |                                     |
CTTACTAGTTTCCCTCGAGGCATCTATGTCCGGTCCGGAGAAAGAGGTAA
      |                                     XhoI
      |                                     |
GAATGATCAAAGGGAGCTCCGTAGATACAGCCCACGCCTCTTCTCCATT
      |
      | SpeI
      |
TGAAATGGCACATGGTCATAGCTGTTTCTGACCCAGCTTCTTGTACAA
      |                                     BglI
      |                                     |
ACTTTACCGTGTACCAGTATCGACAAAGGACTGGGTCCGAAAGAACATGTT
      |                                     M13
      |                                     Reverse
      |
AGTGGTAGATCTGC
      |
TCACCATCTAGACG
  
```

FIGURE 21 : Sites de restrictions et caractéristiques du vecteur pOTB7. Le vecteur contient des sites de restrictions XhoI et EcoRI au niveau du site de multiclonaage. De plus, le vecteur contient un gène de résistance au chloramphénicol (adapté de NCBI).

3.6.2.5 Purifications des cDNA

La migration des produits de la digestion *EcoRI/XhoI* s'est faite sur un gel d'agarose 1.5 % avec du tampon TAE 1X (pour 1 L : 4.84 g de tris base, 1.142 mL d'acide acétique, 2 mL d'EDTA 0.5M, pH 8.0) à un voltage de 100 V. Suite à l'extraction des cDNA sur gel d'agarose, une purification a été effectuée grâce à la trousse Quiagen (Quiagen).

3.6.2.6 PCR pour ajouter les sites de recombinaison attB

La méthode de clonage Gateway® permet d'introduire un gène d'intérêt dans différents types de vecteurs d'expression sans avoir recours à des digestions enzymatiques (figure 20C). Toutefois, pour ce faire, le gène d'intérêt doit avoir les sites de recombinaison attB. Il faut donc ajouter ces sites au gène d'intérêt par PCR, à moins que celui-ci provienne d'un vecteur contenant déjà des sites attB. Plutôt qu'amplifier directement à partir du plasmide, nous avons isolé nos cDNA par digestion car il est plus facile de faire un PCR à partir d'un cDNA linéaire de petite taille.

Afin d'effectuer la recombinaison BP avec le système Gateway, les cDNA doivent avoir un site de recombinaison attB. Celui-ci a été ajouté à chaque cDNA purifié par une réaction de PCR. Les PCR ont été effectués dans un volume final de 50 µL. La composition de cette solution, pour chaque cDNA à amplifier, était de 10 ng d'ADN plasmidique, 10 µL de chacune des amorces (tableau VI), 1.23 mM de dNTP (Gibco BRL), 50 mM MgSO₄, 1X tampon Pfx 10X (Invitrogen), 2X tampon *enhancer* PCR_x (Invitrogen), et 2.5 U/µL de la polymérase Pfx (Invitrogen). Les réactions PCR ont été faites avec l'appareil GeneAmp PCR System 9700 d'AB. La première étape du protocole d'amplification par PCR correspond à une dénaturation initiale à 92°C pendant 5 minutes. Ceci fut suivi de 30 cycles sous les conditions suivantes : 15 secondes à 94°C pour la dénaturation et 25 à 100 secondes (selon le cDNA, voir tableau VI) à 68° pour l'hybridation des amorces ainsi que l'élongation. Le PCR se terminait par une élongation supplémentaire de 3 à 8 minutes selon les cDNA (voir tableau VII).

Tableau VI : Amorces conçues pour l'ajout de la séquence attB1 et attB2 au cDNA d'intérêt.

cDNA	Séquence des amorces attB1 (5') et attB2 (3')	
BHLHB3	5'	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTGAACATGGACGAAGGAATTCCTCA
	3'	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTCAGGGAGCTTCCTTTCCTGGCTG
ID4	5'	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGCGCGATGAAGGCGGTGAGCCCGGT
	3'	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCAGCGGCACAGAATGCGTCGCC
TBX2	5'	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGCGCCATGGCTTACCACCCGTTCCA
	3'	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCACTTGGGCGACTCCCGGCCTGG

Tableau VII : Temps d'hybridation et d'élongation des PCR pour l'addition du site de recombinaison attB au cDNA d'intérêt. Les temps dépendent de la taille du produit PCR.

cDNA	Temps d'hybridation et d'élongation (sec)	Temps d'élongation final (min)	Tailles du produit PCR (bp)
BHLHB3	100	7	1507
ID4	25	3	544
TBX2	90	8	2167

3.6.2.7 Réaction BP

La réaction BP, pour chacun des cDNA, a été effectuée selon le protocole Gateway d'Invitrogen avec le vecteur pDONR221 (figure 22) (Gateway® Technology, 2003). Le vecteur d'entrée ainsi produit (pDONR221-cDNA) a été transformé dans des bactéries DH5 α selon le protocole déjà décrit (section 3.6.2.2). L'antibiotique utilisé pour sélectionner les colonies de bactéries ayant incorporé le vecteur d'entrée était de la kanamycine (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario). Ainsi, les bactéries n'ayant pas incorporé un vecteur ont été éliminées. Les vecteurs d'entrée ont été extraits des bactéries DH5 α et purifiés selon les protocoles mentionnés ci-haut (section 3.6.2.3).

3.6.2.8 Séquençage des cDNA

Avant de procéder à la deuxième recombinaison (réaction LR), nous voulions nous assurer qu'il n'y avait pas de mutation introduite dans les cDNA suite au PCR. Ainsi, l'authenticité de chaque cDNA a été confirmée par séquençage automatique (Service de Séquençage du CHUM, Montréal). Le séquençage a été effectué avec les amorces M13 sens (GTAAACGACGGCCAG) et anti-sens (CAGGAAACAGCTATGAC) ainsi que des amorces spécifiques à chaque cDNA (tableau VIII).

3.6.2.9 Réaction LR

La réaction LR a été effectuée entre chaque vecteur d'entrée (pDONR221-BHLHB3, pDONR221-ID4, pDONR221-TBX2) et le vecteur pcDNA-DEST53 (Invitrogen, figure 23) selon le protocole Gateway d'Invitrogen (Gateway® Technology, 2003). Les vecteurs d'expression ainsi produits (pcDNA-DEST53-cDNA) ont été incorporés dans des bactéries DH5 α par choc thermique (section 3.6.2.2). L'ampicilline a été utilisée pour sélectionner les bactéries ayant incorporé les vecteurs d'expression (pcDNA-DEST53-BHLHB3, pcDNA-DEST53-ID4, pcDNA-DEST53-TBX2). Les vecteurs d'expression ont été extraits des bactéries DH5 α et purifiés grâce à un kit midiprep de Quiagen (Mississauga, Ontario). La taille des constructions Gateway a été vérifiée sur gel d'agarose avant de procéder à la transfection des cellules HeLa.

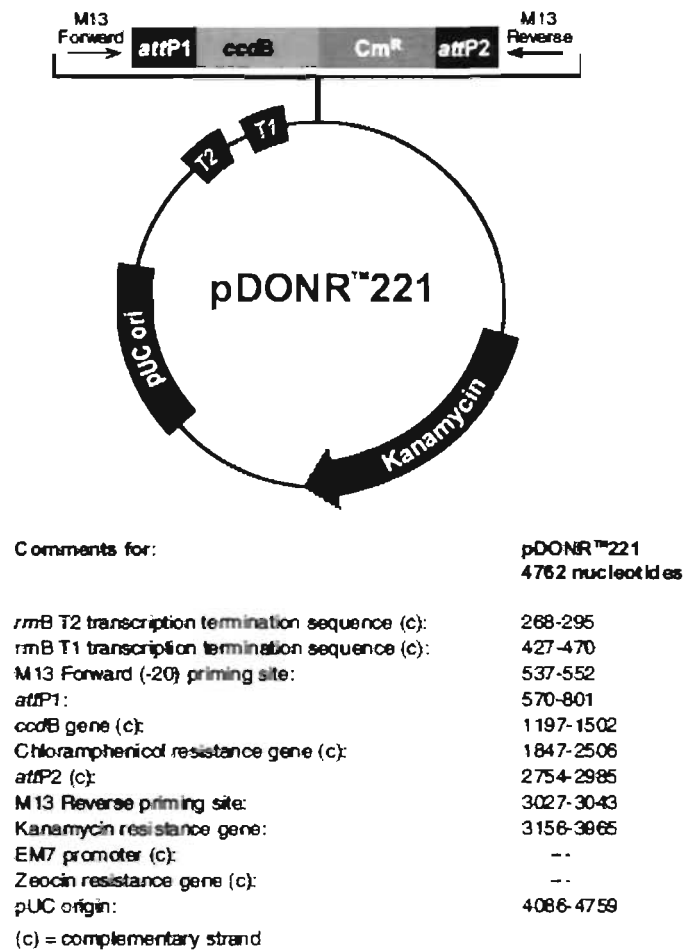
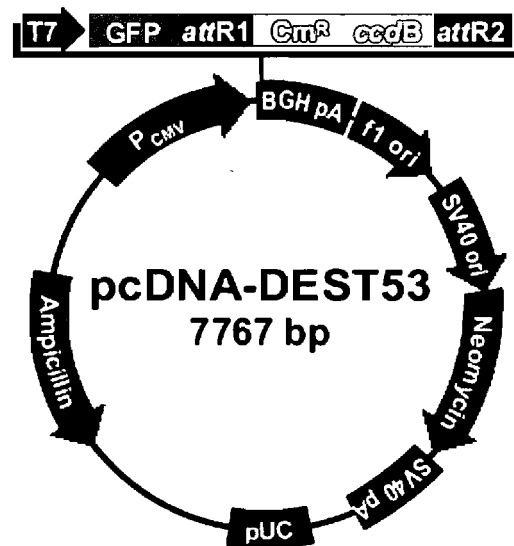


FIGURE 22 : Vecteur pDONR221. Le vecteur contient des sites de recombinaison attP1 et attP2. De plus, celui-ci contient un gène de résistance à la kanamycine (Gateway® Technology, 2003).

Tableau VIII : Amorces utilisées pour le séquençage automatique des cDNA.

cDNA	Nom des amorces	Séquence des amorces
BHLHB3	BHLHB3-R1 BHLHB3-F2 BHLHB3-R2 BHLHB3-F3 BHLHB3-R3 BHLHB3-F1200 BHLHB3-F1new1-F BHLHB3-F1new1-R BHLHB3-F1new2	GCGGGGTGGGCAAGAAC TCAAACATGCGCCAAAGAAGTC GCCTCCGCCGAACGCCACCAG TCGCCGGCGCCCAAGAGGATG GGGGGCGACAACACCGAGGACAGG TGGACAAGAGCGGCCTGGAGAAGT CGCCGCCGAGAACGACA CCGGCGAAGGGCAGGTG TGCGTGCCCGTCATCCAG
ID4	ID4-Fmil ID4-Rmil	TGCCTGCAGTGCATATGAACGAC GACTTTCTTGTTGGGCGGGATGGT
TBX2	TBX2-F1 TBX2-R1 TBX2-F2 TBX2-R2 TBX2-F3 TBX2-R3 TBX2-F4 TBX2-R4 TBX2-F5 TBX2-R5	GCGCAGCCCTCCTTCTTCC GCCTTGCCCGCCACCAT ACAAGCTAGGCACGGAGATGGTCA CAGGATGTCGTTGGCTCGCACTAT ATAGTGCAGCCAACGACATCCTG CCCCCGCACGCTCCTCGCTCAACC GCACCGGGCCCGAGCTGAGGAGAA AGGGCCCATGGTGAAGTGTG GCACGGGCAGCAGTTCITTTG GGCTAGGCTCCCGGCTGTTTC



Comments for pcDNA-DEST47
7780 nucleotides

CMV promoter: bases 232-819

T7 promoter: bases 863-882

attR1 recombination site: bases 914-1038

Chloramphenicol resistance gene: bases 1147-1827

ccdB gene: bases 2147-2452

attR2 recombination site: bases 2493-2617

Cycle 3 GFP (C-terminal): bases 2628-3347

BGH polyadenylation region: bases 3372-3599

f1 origin: bases 3645-4073

SV40 early promoter and origin: bases 4100-4408

Neomycin resistance ORF: bases 4483-5277

SV40 early polyadenylation region: bases 5453-5583

pUC origin: bases 5966-6639

Ampicillin resistance ORF (*bla*): bases 6784-7644 (c)

bla promoter: bases 7645-7743 (c)

(c) = complementary strand

FIGURE 23 : Vecteur pcDNA-DEST53. Le vecteur contient des sites de recombinaison *attR1* et *attR2*. De plus, celui-ci contient un gène de résistance à l'ampicilline (Gateway® Technology, 2003).

3.6.3 Lignées et cultures cellulaires

Les cellules HeLa ont été maintenues dans le milieu DMEM (Wisent, St-Bruno, Qc). Le milieu a été enrichi avec 10 % de sérum de bœuf fœtal (SBF). Les cellules ont été incubées à 37 dans 5% de CO₂, jusqu'à confluence dans des pétris de 150 mm. Vingt-quatre heures avant les transfections, les cellules ont été changées dans des pétris de 100 mm: les cellules ont été trypsinisées dans une solution contenant 1mM EDTA/0.25 % trypsine (w/v) et incubées à 37°C dans 5% CO₂ pendant 5 min afin de provoquer leur détachement de la paroi. Elles ont alors été réparties dans des pétris de 100 mm. Chaque pétri de 100 mm contenait 800 000 cellules et 3 lamelles pour l'immunofluorescence.

Les cellules HeLa, facile d'accès, ont été choisies. Les cellules HeLa ont l'avantage d'être des cellules humaines. Malheureusement, il n'existe pas de lignées musculaires humaines. Le fait que la plupart des modèles cellulaires de la DMOP ne soient pas dans des lignées musculaires, et que la formation d'agrégats et de toxicité soit observée, il apparaît donc que les cellules n'ont pas besoin d'être identiques aux tissus touchés pour récréer les inclusions observées dans la maladie.

3.6.4 Transfections

Les cellules HeLa ont été transfectées avec 4 µg d'ADN en utilisant la lipofectamineTM 2000 (Invitrogen). Les co-transfections ont été effectuées avec PABPN1 (pcDNA-V5-DEST-PABPN1-17ala) et les constructions de la section 3.6.2.9 (pcDNA-DEST53-BHLHB3, pcDNA-DEST53-ID4, pcDNA-DEST53-TBX2). Les cellules ont été maintenues en culture 48 heures post-transfection. Nous avons choisi PABPN1-17ala plutôt que PABPN1-10ala car celui-ci contient une élongation du domaine polyalanine.

3.6.5 Western blot

L'immunobavardage de type western a été utilisé afin de déterminer si les constructions Gateway expriment bel et bien les protéines de fusion d'intérêt (GFP-ID4, GFP-BHLHB3, GFP-TBX2). Ainsi, les cellules HeLa transfectées avec les divers plasmides ont été lysées dans du tampon Laemli(1X)-urée(6M). Les protéines ont été quantifiées avec le Bio-Rad DC protein assay (Hercules, Ca). Dix µg de protéines de

chaque échantillon ont migrés dans un gel de polyacrylamide à 9% (GFP-TBX2 et GFP-BHLHB3) ou 15% (GFP-ID4). Les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose à 100V pendant 2 heures. Pour l'immunodétection, les anticorps primaires anti-ID4-rabbit (1/500) (Santa Cruz Biotechnology, Ca), anti-BHLHB3-rabbit (1/500) (Sigma), anti-TBX2-rabbit (1/2000) (Upstate Lake Placide), et anti-GFP-rabbit (1/500) (gracieusement offert par Bernard Massie) ont été utilisés. L'anticorps secondaire (anti-rabbit) couplé à la peroxydase de *horseradish* (1/5000) a été employé et visualisé par chemiluminescence (ECL).

3.6.6 Immunofluorescence

Les cellules transfectées sur les lamelles ont été lavées dans du PBS 1X (pour 2L : 16,24 g de NaCl, 0,4 g de KCl 2,28 g de Na₂HPO₄ et 0,4 g de KH₂PO₄) et ensuite incubées à température ambiante pendant 10 min dans une solution à 4% de paraformaldéhyde. Les cellules fixées ont été lavées de nouveau, puis perméabilisées avec du méthanol froid (100 %) pendant 10 min à température pièce. Les cellules ont ensuite été rincées 3 X 5 min avec du PBS. Pour le blocage, les cellules ont subi une incubation de 30 min à température pièce avec du PBS-BSA 3%. Suite à 3 lavages au PBS-Tween 0.5%, les cellules ont subi une incubation d'une heure dans une solution de l'anticorps primaire anti-PABPN1-Rabbit (1/200) (gracieusement offert par E. Wahle) pendant 45 minutes à 37°C. Puisque les protéines d'intérêt sont fusionnées à la GFP en N-terminal, les anticorps anti-ID4, anti-BHLHB3, et anti-TBX2 n'ont pas été utilisés pour l'immunofluorescence. Les cellules ont ensuite été lavées 3 x 5 min avec du PBS-Tween 0.5% et incubées 30 minutes avec l'anticorps secondaire anti-rabbit Cy3 (Jackson immunoresearch) (1/500). L'ADN a ensuite été marqué par 5µg/ml de Hoechst 33342 (Molecular Probes, Eugene, OR) dans du PBS-Tween.

Le côté de la lamelle avec les cellules était déposé sur une goutte de VectaShield sur une lame (agent protecteur de la fluorescence; Vector Laboratories, Burlington, Ontario). Les cellules ainsi préparées ont été observées grâce à un microscope à fluorescence Leica utilisant un filtre détectant le Cy3. Ceci est un filtre révélant la GFP ($\lambda_{exc} = 460$ nm, $\lambda_{émi} = 510$ nm) et détectant le fluorochrome Hoechst 33342 ($\lambda_{exc} = 360$ nm, $\lambda_{émi} = 450-460$ nm). Les images ont été prises avec une caméra

digitale Leica et ensuite traitées par le programme Adobe Photoshop (Adobe system Inc. San José, Ca).

3.7 Résultats

3.7.1 Les constructions expriment les protéines de fusion dans le bon cadre de lecture

Notre objectif primaire était d'établir si d'autres protéines avec des domaines polyalanines avaient tendance à co-agréger avec PABPN1. Pour ce faire, nous avons donc créé des constructions pour les trois protéines sélectionnées (ID4, BHLHB3, TBX2) grâce à la méthode de clonage Gateway. Les constructions ainsi produites (pcDNA-DEST53-BHLHB3, pcDNA-DEST53-ID4, pcDNA-DEST53-TBX2) expriment des protéines de fusion avec de la GFP en N-terminal (GFP-BHLHB3, GFP-ID4, GFP-TBX2).

Afin de vérifier que chacune des constructions exprime la protéine de fusion dans le bon cadre de lecture, un western blot a été effectué. Ainsi, suite à la transfection des cellules HeLa avec chacune des constructions, un western blot a été effectué sur les protéines récoltées 48 heures post-transfection. La détection des protéines de fusion a été médiée par des anticorps spécifiques dirigés contre celles-ci (anti-BHLHB3, anti-ID4, anti-TBX2). De plus, puisque les protéines d'intérêt contiennent de la GFP en N-terminal, un western blot avec l'anticorps anti-GFP a également été effectué.

À la figure 24A, on observe que la protéine de fusion GFP-ID4 est reconnue par les anticorps anti-ID4 et anti-GFP à son poids moléculaire de 43 kDa. De plus, à la figure 24B, on observe que la protéine de fusion GFP-TBX2 (101 KDa) est reconnue par les anticorps anti-TBX2 et anti-GFP dans les cellules transfectées par le plasmide pcDNA-DEST53-TBX2. Ceci fut également observé pour la protéine de fusion GFP-BHLHB3 (77 kDa, données non présentées car mauvaise numérisation du gel).

La détection des protéines d'intérêt (BHLHB3, ID4, TBX2) par l'anticorps anti-GFP et les anticorps spécifiques dirigés contre celles-ci (anti-BHLHB3, anti-ID4, anti-TBX2) nous a permis de conclure que les constructions expriment les protéines dans le bon cadre de lecture. Ainsi, ces résultats démontrent l'exactitude des constructions.

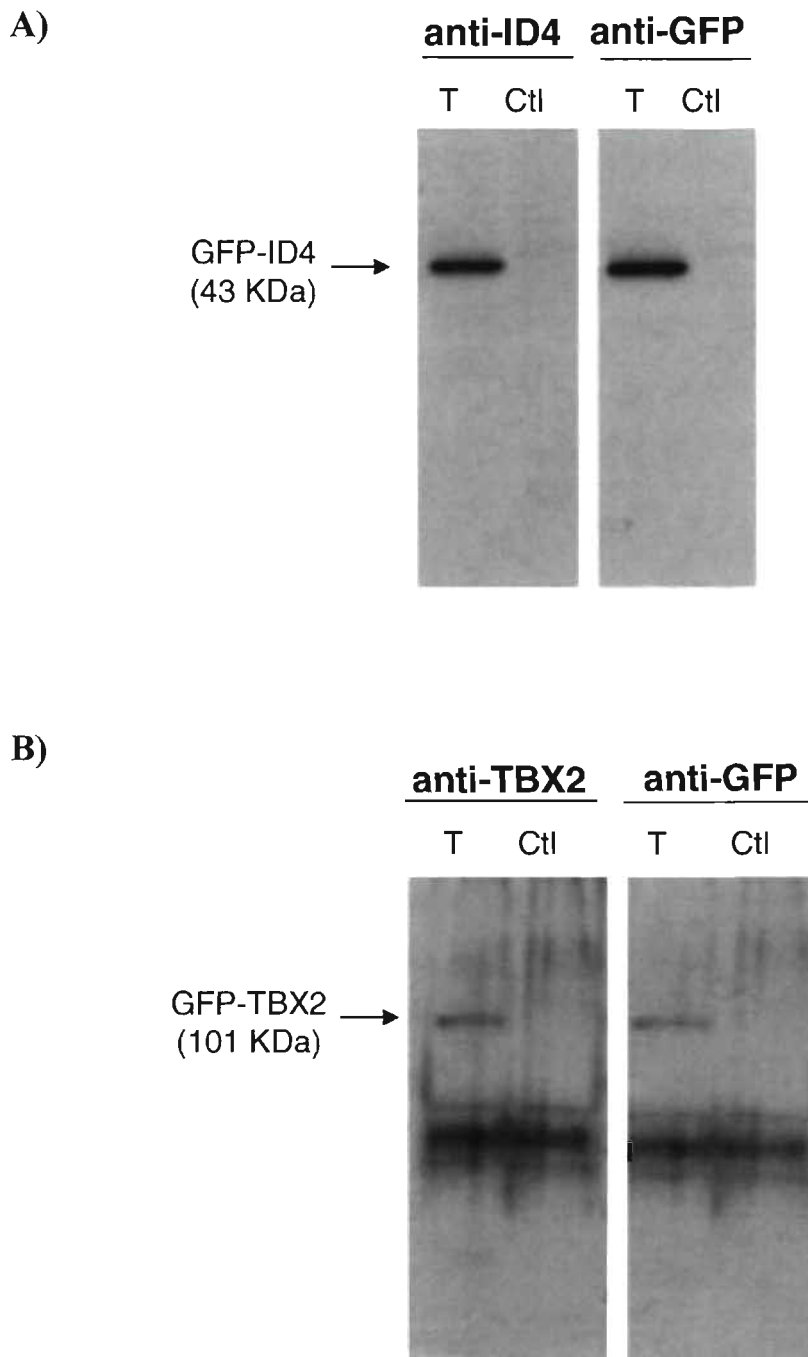


FIGURE 24 : Western blot démontrant que les constructions Gateway expriment les protéines de fusion dans le bon cadre de lecture. A) La protéine de fusion GFP-ID4 est reconnue par les anticorps anti-ID4 et anti-GFP dans les cellules transfectées par le plasmide pcDNA-DEST53-ID4. Le poids moléculaire de cette protéine de fusion est de 43 kDa. B) La protéine de fusion GFP-TBX2 est reconnue par les anticorps anti-TBX2 et anti-GFP dans les cellules transfectées par le plasmide pcDNA-DEST53-TBX2. T= cellules transfectées, Ctl= cellules non-transfectées (contrôle). Les protéines des cellules transfectées ont été récoltées 48h post-transfection.

3.7.2 Les protéines avec des domaines polyalanines ont une tendance à l'agrégation

Les peptides homopolymériques d'alanines ont une tendance à l'agrégation (Blondelle *et al.* 1997, Schinchuk *et al.* 2005). Ceci nous a donc mené à émettre l'hypothèse que les protéines avec des domaines polyalanines ont une tendance à l'agrégation. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons donc surexprimé des protéines contenant des domaines polyalanines (BHLHB3, ID4, et TBX2) pour observer la formation d'inclusions.

Les cellules HeLa ont été transfectées avec les constructions pcDNA-DEST53-BHLHB3, pcDNA-DEST53-ID4 et pcDNA-DEST53-TBX2 afin d'exprimer les protéines de fusion GFP-BHLHB3, GFP-ID4, et GFP-TBX2. Quarante-huit heures post-transfections, les cellules ont été fixées et étudiées en immunofluorescence pour déterminer la localisation des protéines de fusion. À la figure 25, on observe que la surexpression des protéines de fusion GFP-BHLHB3 et GFP-TBX2 mène à la formation d'inclusions intra-nucléaires (figure 25A et C), tandis que la surexpression de la protéine de fusion GFP-ID4 mène à la formation d'inclusions cytoplasmiques (figure 25B). Ainsi, il y a formation d'inclusions lorsqu'il y a surexpression de protéines avec un domaine polyalanine. Nos résultats suggèrent que l'expression de protéines possédant au moins un domaine polyalanine induit la formation d'inclusions.

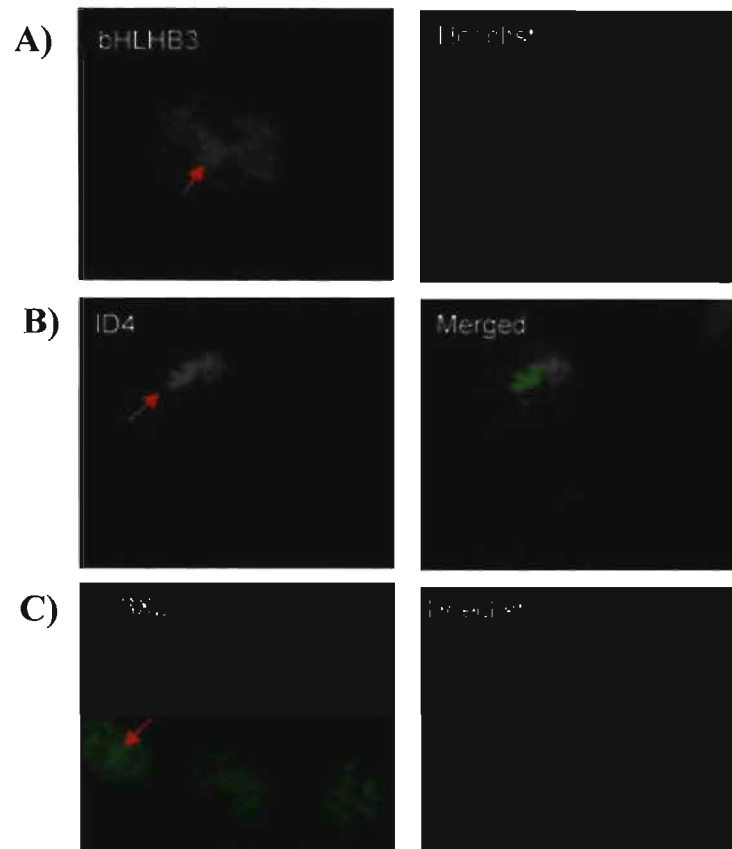


FIGURE 25 : Formation d'inclusions par surexpression de protéines avec un domaine polyalanine. Des cellules HeLa ont été transfectées pour exprimer les gènes codant pour A) GFP-ID4, B) GFP-ID4, et C) GFP-TBX2. Les cellules ont été fixées 48 heures post-transfection et observées à l'aide d'un microscope à fluorescence Leica.

3.7.3 Il n'y a pas de co-agrégation entre PABPN1 et les protéines avec des domaines polyalanines sélectionnées

Il y a des fortes raisons de croire que l'élongation du domaine polyalanine de PABPN1 entraîne la séquestration d'autres protéines avec une séquence polyalanine dans les inclusions. En premier lieu, les peptides homopolymériques d'alanine ont une tendance à l'agrégation. De plus, l'expansion du domaine polyalanine de PABPN1 augmente l'agrégation de celle-ci. Ainsi, un mécanisme possible de la pathophysiologie de la DMOP serait que PABPN1, par sa capacité à s'agréger, entraîne avec elle d'autres protéines avec des domaines polyalanines. Les expériences présentées dans cette section ont pour but d'établir si d'autres protéines avec des domaines polyalanines ont tendance à co-agréger avec PABPN1.

Des cellules HeLa ont été co-transfectées avec PABPN1 17 alanines et les constructions exprimant les protéines de fusion GFP-BHLHB3, GFP-ID4, et GFP-TBX2. Quarante-huit heures post-transfection, les cellules ont été fixées et étudiées en immunofluorescence pour déterminer s'il y avait une co-localisation entre PABPN1 et les protéines d'intérêt.

L'étude d'immunofluorescence, à la figure 26, démontre que les IINs induites par PABPN1 ne recrutent pas d'autres protéines polyalanines. En effet, les protéines polyalanines ID4, BHLHB3 et TBX2 ne sont pas co-localisées avec PABPN1 (figure 25). Celles-ci forment plutôt des inclusions indépendantes. Ainsi, PABPN1 ne recrute pas d'autres protéines polyalanines pour former les IINs.

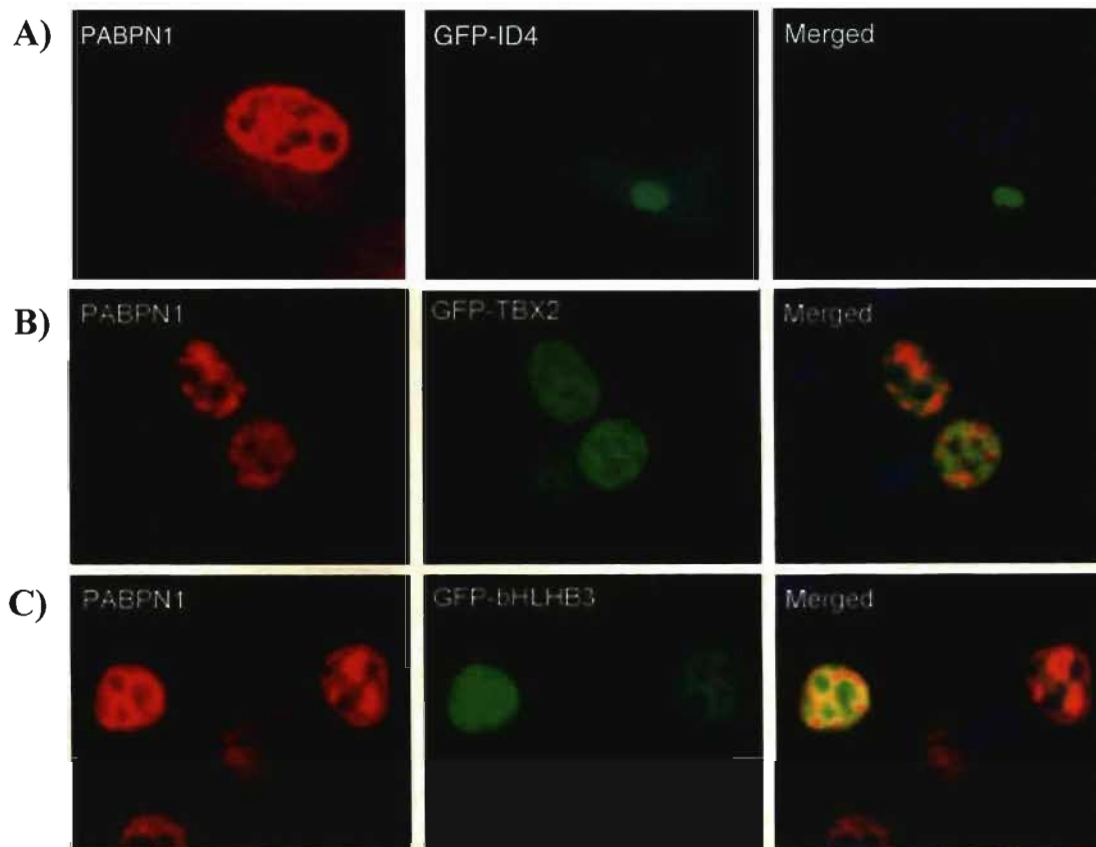


FIGURE 26 : PABPN1 ne recrute pas d'autres protéines polyalanines pour former les INIs. Des cellules HeLa ont été co-transfectées avec PABPN1 (pEBG-PABPN1-17ala) et les constructions Gateway : A) pcDNA-DEST53-ID4, B) pcDNA-DEST53-BHLHB3 et C) pcDNA-DEST53-TBX2. Les cellules ont ensuite été fixées 48 heures post-transfection et observées à l'aide d'un microscope à fluorescence Leica. Les protéines polyalanines A) ID4, B) BHLHB3 et C) TBX2 ne sont pas co-localisées avec PABPN1.

4. Chapitre 4

Discussion des résultats et conclusions

4.1 Résumé des résultats et conclusion générales

Les projets présentés dans ce mémoire avaient pour but d'étudier les mécanismes pathophysiologiques de la DMOP du point de vue génétique (chapitre 2) et moléculaire (chapitre 3).

4.1.1 Résumé du chapitre 2

Les résultats présentés au chapitre 2 démontrent qu'il y a des patients canadiens-français atteints d'une forme plus sévère de la DMOP. En effet, comparativement aux patients classiques, les patients sévères ont un risque plus élevé d'aréflexie, de limitation des mouvements oculaire, de faiblesse distale et de faiblesse proximale des membres inférieurs (MI) et supérieurs (MS). De plus, les patients sévères ont un taux de CK plasmatique plus élevé que les patients classiques. Malgré le fait que la deuxième copie du gène *PABPN1* n'influence pas la sévérité dans notre cohorte, il semble tout de même y avoir un mode de transmission dominant. Le fait qu'il y ait une composante génétique à la sévérité dans notre cohorte est encourageant. Ces résultats ouvrent des possibilités d'études génétiques plus approfondies afin de découvrir les modulateurs génétiques de la sévérité.

4.1.2 Résumé du chapitre 3

Au chapitre 3, des co-transfections pour exprimer des protéines contenant des domaines polyalanines avec PABPN1 mutée ont été effectuées afin de déterminer si PABPN1 entraînait la séquestration d'autres protéines avec une séquence polyalanine dans les inclusions. En effet, notre hypothèse de départ était que PABPN1, par sa capacité à s'agrèger, entraîne avec elle des protéines avec des domaines polyalanines. Les résultats présentés au chapitre 3 démontrent que les protéines avec des domaines polyalanines ont une tendance à l'agrégation. Cependant, il n'y a pas de co-agrégation entre PABPN1 et les protéines avec des domaines polyalanines sélectionnées.

4.2 Phénotype de la sévérité chez nos patients canadiens-français

Nos patients sévères, tout comme les patients décrits dans la littérature, ont une faiblesse proximale importante des MI et une ophtalmoparésie (Blumen *et al.* 1999; Mirabella *et al.* 2000; Pou Serradell *et al.* 2004). Cependant, nos patients ont également des signes qui n'ont à ce jour jamais été répertoriés : une faiblesse proximale des MS, une faiblesse distale et une aréflexie. L'aréflexie est l'un des signes d'une neuropathie motrice du SNP. Dans la littérature, la neuropathie, observée chez certains rares cas de DMOP, est considérée comme étant un phénotype sévère. Toutefois, nous ne pouvons pas conclure que nos patients sévères ont une neuropathie juste par le fait qu'ils ont une aréflexie. En effet, une atteinte musculaire sévère peut créer une aréflexie. Ainsi, des études plus poussées, telles que l'électromyographie ou une biopsie, seront nécessaires afin de déterminer si nos patients sévères ont véritablement une atteinte du SNP.

4.3 Génétique de la sévérité chez nos patients canadiens-français

4.3.1 Analyse de la deuxième copie du gène *PABPN1*

Nous avons jusqu'à présent la plus grande cohorte de patients sévères. Cependant, contrairement aux cas décrits dans la littérature, nos patients canadiens-français ne sont ni homozygotes pour l'expansion (GCN)₁₃, ni hétérozygotes composés (Blumen *et al.* 1999; Brais *et al.* 1998, Mirabella *et al.* 2000, Hill *et al.* 2001). Le fait que nos patients soient tous hétérozygotes pour l'expansion (GCN)₁₃ n'excluait pas la possibilité qu'une deuxième mutation pouvait se retrouver ailleurs dans la deuxième copie du gène *PABPN1*. Nous avons donc utilisé l'haplotypage pour déterminer si l'autre copie du gène *PABPN1* était responsable de la sévérité.

Dans cette étude, l'hypothèse de départ était que la sévérité était monogénique puisque les patients provenaient d'une population relativement homogène. S'il y avait une ségrégation entre le gène *trans* et la sévérité, nous aurions poursuivi au séquençage du gène *PABPN1*. Toutefois, puisqu'il n'y avait pas de ségrégation, nous n'avons aucune raison à croire que l'allèle en *trans* influençait la sévérité, du moins de façon monogénétique. Cependant, il est vrai qu'il pourrait y avoir plus qu'une mutation qui causerait la sévérité. En effet, les études de liaison non paramétrique démontrent qu'il y a

d'autres facteurs influençant la sévérité. Ainsi, le meilleur moyen pour s'assurer qu'il n'y a pas de mutation dans le gène en *trans*, chez certain patient, serait de séquencer le gène PABPN1.

Contrairement au séquençage, l'haplotypage permet d'étudier les sites de régulations de l'expression de *PABPN1* même si celles-ci ne sont pas connues. Ainsi, nous avons analysé, de façon indirecte, les sites de régulations du gène *PABPN1* couvert par les marqueurs choisis (voir figure 18). Les marqueurs utilisés dans cette analyse étaient approximativement 200 kb en amont et 100 kb en aval du gène *PABPN1*. Toutefois, il pourrait y avoir des régions régulatrices ailleurs que dans cette région de 300 kb. C'est la raison pour laquelle nous avons fait une étude de liaison du chromosome 14. En effet, selon l'analyse de liaison, il semblerait y avoir un modulateur génétique de la sévérité sur le chromosome 14. Alors, une étude à envisager serait d'étudier à nouveau le chromosome 14 par haplotypage avec une multitude de marqueurs. Ainsi, des haplotypes autres que ceux identifiés par les marqueurs puissent exister et co-ségréguer avec le phénotype de la sévérité.

Dans cette analyse par haplotypage, nous avons pris pour acquis que la pénétrance était de 100 %. Nous avons assumé ceci car, dans la littérature, tous les individus avec une mutation en *trans* ont un phénotype sévère. Avec une pénétrance à 100 %, si la deuxième copie du gène *PABPN1* influençait effectivement la sévérité, on s'attendrait à ce qu'il n'y ait aucun partage de la deuxième copie de *PABPN1* chez des patients sévères et classiques apparentés (0 %). Néanmoins, 52 % des patients sévères et classiques apparentés partagent la même deuxième copie de *PABPN1*. Une pénétrance incomplète pourrait expliquer la raison pour laquelle 52 % des patients classiques partagent la même deuxième copie du gène en *trans* que les sévères. C'est-à-dire, que certain patient classique pourrait avoir le gène mais ne pas exprimer le phénotype de sévérité. Toutefois, la pénétrance incomplète ne peut pas expliquer le degré de partage de 66 % entre patients sévères apparentés. C'est-à-dire, même avec une pénétrance incomplète, on s'attendrait à un partage du deuxième allèle chez tous les patients sévères apparentés (100 %). Ainsi, la pénétrance incomplète ne semble pas être un facteur dans la sévérité pour la deuxième copie du gène PABPN1. Cependant, comme nous l'avons décrit, il semblerait y avoir d'autres modulateurs génétiques de la sévérité. Il serait donc intéressant de voir s'il y a

une composante de pénétrance incomplète pour ceux-ci. Pour éliminer la possibilité d'une pénétrance incomplète à la sévérité il faut recruter des familles avec plusieurs générations de patients sévères et d'analyser l'arbre génétique. L'absence du phénotype sévère chez un patient atteint de la DMOP avec un parent et un enfant sévère démontrait que la pénétrance est incomplète.

En conclusion, les résultats de la section 2.7.7 démontrent que la deuxième copie du gène *PABPN1* ne semble pas influencer la sévérité. Cependant, on ne peut pas exclure la possibilité de la présence de mutation dans le gène en *trans* chez certain patient car la sévérité pourrait être une maladie multigénique.

4.3.2 Mode de transmission et analyse de liaison du chr. 14

Malgré que la deuxième copie du gène *PABPN1* en *trans* ne semble pas influencer la sévérité dans notre cohorte canadienne-française, il semble tout de même y avoir un mode de transmission dominant à la sévérité. D'après notre étude, il semble y avoir un modulateur génétique de la sévérité sur le chromosome où se retrouve le gène *PABPN1*, le chromosome 14. Similairement, une étude sur la sévérité de la maladie d'Huntington, a démontré qu'il y a un locus modulateur de la sévérité qui se trouve également sur le même chromosome que le gène codant pour la protéine responsable de la maladie d'Huntington (la protéine huntingtin) (Li *et al.* 2003). Plus récemment, cette équipe a trouvé des mutations dans la région promotrice du gène *huntingtin* chez les patients atteints d'une forme sévère (Warby *et al.* 2006; données non-publiées). Puisqu'il semble y avoir un modulateur génétique sur le chromosome 14 chez nos patients sévères une étude à envisager serait d'étudier à nouveau le chromosome 14 par haplotypage avec une multitude de marqueurs. Toutefois, les résultats de la section 2.7.9 démontrent qu'il y a d'autres modulateurs génétiques de la sévérité ailleurs que dans le chromosome 14. Ainsi, il serait donc pertinent de faire un criblage entier du génome pour les patients sévères et classiques afin d'identifier des loci de sévérité, pour éventuellement trouver les gènes modulateurs.

La maladie d'Huntington est causée par une répétition de triplets CAG au niveau du gène *huntingtin*. Cette maladie cause un endommagement des neurones striaires. Une

étude récente a identifié des gènes modulateurs de la sévérité de la maladie d'Huntington. En effet, il s'agit de gènes codant pour des protéines de l'apoptose ou des protéines interagissant avec la protéine huntingtin (Chattopadhyay *et al.* 2005). Il serait donc intéressant de vérifier les partenaires protéiques de PABPN1 car celle-ci interagit avec plusieurs protéines, notamment les protéines SKIP, CPSF-30, HNRPA1 PAP, HSP40, BRG1 CBP80, CBP20, EIF4G, UPF2 et UPF3 (Kim *et al.* 2001; Fan *et al.* 2001; Fan *et al.* 2003; Ishigaki *et al.* 2001 Chen *et al.* 1999; Kerwitz *et al.* 2003). Une protéine particulièrement intéressante est la protéine SKIP. PABPN1 et SKIP agissent ensemble pour contrôler l'expression de certains gènes spécifiques du muscle (Kim *et al.* 2001).

La chaperonne HSP40 est également une protéine intéressante. Une des premières manières avec laquelle la cellule peut gérer la toxicité des protéines comportant des malformations suivant l'expansion de leur domaine polyalanine ou polyglutamine est de les replier par le biais des chaperonnes. En effet, les chaperonnes HSP40 et HSP70 peuvent inhiber l'assemblage en fibrilles des protéines comportant des domaines polyglutamines expansés (Muchowski *et al.* 2000) et sont aussi efficaces dans les modèles cellulaires de la DMOP (Bao *et al.* 2002; Bao *et al.* 2004). Ainsi, un polymorphisme dans le gène codant pour la chaperonne HSP40 pourrait diminuer l'efficacité de celle-ci et donc causer un phénotype sévère.

Quoi qu'il en soit, il semble y avoir une composante génétique à la sévérité dans notre cohorte. L'identification de modulateurs génétiques de la sévérité est importante car ceci nous mènera à une meilleure compréhension de la pathophysiologie de la DMOP. De plus, l'identification de modulateurs génétiques pourrait nous mener à d'autres cibles thérapeutiques.

4.4 L'agrégation des protéines avec des domaines polyalanines

L'expansion du domaine polyalanine des protéines pathologiques HOXA13, HOXD13, RUNX2, SOX3, FOXL2 et PHOX2B provoque la formation d'agrégats cytoplasmiques (Albretch *et al.* 2004, Caburet *et al.* 2004; Nasrallah *et al.* 2004; Albretch *et al.* 2005). L'agrégation de ces protéines dans le cytoplasme empêcherait donc leur retour dans le noyau pour y assurer leurs fonctions (Albretch *et al.* 2005). Il y a donc une

perte de fonction puisque ces protéines sont toutes des facteurs de transcription avec une expression limitée dans l'espace et le temps. Ceci a pour effet de causer des maladies congénitales : le *Hand-Foot-Genital-Syndrome* (HOXA13), la sympolydactilie (HOXD13), la dysplasie cléidocraniale (RUNX2), le syndrome blepharophimosis/ptosis/epicanthus inversus de type II (FOXL2), et le syndrome d'hypoventilation alvéolaire centrale congénitale (PHOX2B).

Les résultats présentés au chapitre 3 démontrent que les protéines avec des domaines polyalanine (BHLHB3, ID4 et TBX2) ont une tendance à l'agrégation. En effet, la protéine ID-4 forme des inclusions cytoplasmiques lorsque surexprimée dans les cellules HeLa. ID4 est un régulateur négatif des protéines BHLH (facteur de transcription). Cette protéine, par son hétérodimérisation avec MyoD, empêche la liaison de MyoD à l'ADN. L'un des gènes régulés par MyoD est la créatine kinase. Il a été démontré que ID4, via son interaction avec MyoD, diminue la transcription de la créatine kinase (Paglucia *et al.* 1995). Ainsi, la séquestration d'ID4 dans le cytoplasme pourrait causer une diminution de la transcription des gènes avec une boîte E, incluant la créatine kinase. Toutefois, à ce jour, il n'y a pas de maladie associée à la protéine ID4.

Nous avons également démontré que les protéines BHLHB3 et TBX2 forment toutes les deux des inclusions nucléaires lorsque surexprimées dans les cellules HeLa. Ceci est similaire à la protéine pathologique ARX causant le syndrome de spasmes infantiles et retard mental. Ce facteur de transcription, lorsque surexprimé, se retrouve dans des inclusions intranucléaires (Nasrallah *et al.* 2004). Ceci pourrait empêcher la régulation de la transcription par ARX. De même, l'agrégation de BHLHB3 et TBX2, tous deux des facteurs de transcription, pourrait perturber la régulation de l'expression. Normalement, BHLHB3, par son interaction avec MyoD et les protéines E, est un répresseur de la transcription des gènes contenant une boîte E (Azmi *et al.* 2004). La séquestration de BHLHB3 dans des inclusions intranucléaires pourrait causer une diminution de la transcription des gènes avec une boîte E. Cependant, tout comme ID4, il n'y a pas de maladie associée aux protéines BHLHB3 et TBX2.

Finalement, les résultats du chapitre 3 ont été obtenus par la surexpression des protéines BHLHB3, ID4 et TBX2. Ceux-ci démontrent que les protéines avec des domaines polyalanine (BHLHB3, ID4 et TBX2) ont une tendance à l'agrégation. Il n'y a

pas d'évidence jusqu'à présent que ces protéines puissent faire des agrégats dans des conditions physiologiques. Ainsi, il reste toujours possible que les agrégats observés soient un artéfact de la surexpression.

4.5 PABPN1 ne recrute pas d'autres protéines polyalanine pour former les IINs

Nous avons démontré que les protéines avec un domaine polyalanine ID4, BHLHB3 et TBX2 ne sont pas co-localisées avec PABPN1. Ces protéines forment plutôt des inclusions indépendantes. Ainsi, il n'y a pas de co-agrégation entre PABPN1 et les protéines avec des domaines polyalanines. Toutefois, puisque ces résultats ont été obtenus avec des cellules HeLa, nous ne pouvons pas exclure la possibilité qu'il y ait agrégation de ces protéines avec PABPN1 dans des cellules myoblastiques. En effet, de telles cellules pourraient exprimer des co-facteurs nécessaires pour l'interaction de PABPN1 avec des protéines avec un domaine polyalanine.

Toutefois, la plupart des protéines polyalanines mutées ont acquis une tendance à l'agrégation (HOXA13, HOXD13, RUNX2, SOX3, FOXL2, PHOX2B et ARX). Ceci pourrait être central dans les pathologies. La description de la formation d'agrégats par les protéines qui possèdent un domaine polyA ouvre une nouvelle fenêtre d'études. La question demeure de savoir quel est le rôle des agrégats dans la pathophysiologie.

4.6 Rôles possibles des inclusions intranucléaires dans la DMOP

La description de la formation d'agrégats par huit des neuf protéines impliquées dans des maladies à expansion de domaines polyalanines suggère un mécanisme commun dans les pathologies impliquant les facteurs de transcription (HOXA13, HOXD13, RUNX2, SOX3, FOXL2, PHOX2B et ARX). Pour ces facteurs de transcription, l'expansion du domaine polyalanine provoquerait une séquestration de la protéine mutée lui empêchant d'effectuer sa fonction et la destinant à la dégradation par le protéasome. Mais la question demeure à savoir s'il y a un mécanisme commun à toutes les maladies polyalanines, incluant la DMOP.

Un mécanisme possible pour la DMOP serait que PABPN1 entraîne avec elle, par l'intermédiaire d'un lien direct avec des protéines, des complexes impliqués dans la régulation de l'expression génétique, incluant des facteurs de transcription. En effet, il a été démontré que PABPN1 interagit avec SKIP, un co-facteur de la transcription (Kim *et al.* 2001). Plus particulièrement, SKIP et PABPN1 agissent ensemble pour activer la transcription de gènes possédant une boîte E (CANNTG) liée par MyoD. Le facteur de transcription MyoD est un bHLH myogénique qui active la transcription de gènes structuraux du muscle (Carlson, 2004). Il serait donc intéressant de voir si les inclusions séquestrent la protéine SKIP, lui empêchant de jouer son rôle comme co-facteur de transcription. Ceci pourrait donc interférer avec l'expression des gènes spécifiques aux muscles. La séquestration de facteurs de transcription spécifiques aux muscles pourrait expliquer la sélectivité pour des muscles squelettiques striés dans la DMOP, bien que PABPN1 soit une protéine ubiquitaire.

Il serait donc intéressant de connaître si SKIP est inclus dans les inclusions des patients atteints de la DMOP. Si c'est le cas, il serait pertinent de faire un essai *in vivo* tri-hybride pour déterminer si la séquestration de SKIP dans les inclusions diminue l'expression de gènes avec des boîtes E. Autrement dit, il y a transfection de PABPN1 muté, de SKIP et d'un gène rapporteur avec un promoteur contenant la boîte E (CANNTG) afin de voir s'il y a une différence du niveau d'expression.

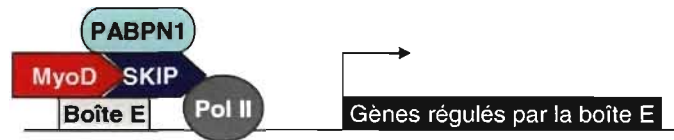
PABPN1 étant possiblement recrutée très tôt de par son association avec l'ARN polymérase II au site de transcription (Bear *et al.* 2003), il est possible que lors de son agrégation, elle entraîne avec elle d'autres facteurs de transcription dans les IINs. Ceci viendrait perturber le fonctionnement des cellules qui sont atteints par la DMOP. Il serait donc pertinent de faire un *GST pull-down* (GST-PABPN1) avec un extrait de protéines obtenues des biopsies musculaires de patients atteints de la DMOP afin de connaître si d'autres facteurs de transcription interagissent avec PABPN1.

Dans le cadre de la maladie d'Huntington, une maladie à expansion polyglutamine, il y a séquestration de CBP (CREB Binding Protein) et de TAF_{II}130 dans les inclusions intranucléaires. Normalement, CBP et TAF_{II}130 vont activer la transcription des gènes avec le promoteur CRE (cAMP Response Element). La séquestration de ces protéines dans les IINs provoque une diminution de la transcription

des gènes avec CRE (Shimohata *et al.* 2000). Un mécanisme similaire peut être en cause dans la DMOP.

Enfin, deux équipes ont démontré qu'il y avait un âge de manifestation précoce chez les patients atteints de la maladie d'Huntington chez qui on avait découvert un polymorphisme au niveau des codons (Gln-Ala)₃₈ dans le gène CA150 codant pour un coactivateur de la transcription (Chattopadhyay *et al.* 2003). Ainsi, l'identification de facteurs de transcriptions séquestrés dans les inclusions pourrait aider à l'étude de la sévérité. En effet, il pourrait y avoir des polymorphismes dans ces gènes qui pourraient justifier la sévérité chez certains de nos patients.

A) Activation de la transcription



B) Séquestration de SKIP dans les IINs

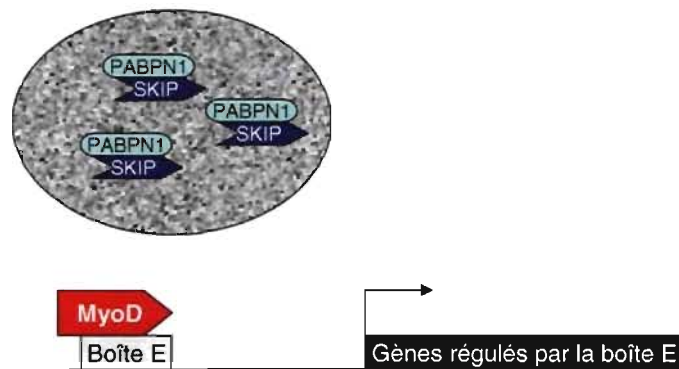


FIGURE 27 : Mécanisme pathophysiologique possible de la DMOP impliquant des facteurs de transcription. A) Les facteurs et co-facteurs de transcription vont recruter l'ARN polymérase II (Pol II) au niveau de l'ADN pour activer la transcription de gènes. B) Puisque SKIP est séquestré dans les inclusions par l'intermédiaire de son interaction avec PABPN1, il n'y a pas de recrutement de la polymérase II. Ainsi, il n'y a pas de transcription des gènes régulés par la boîte E.

4.7 L'atteinte sélective de certains tissus dans la DMOP

La surexpression de PABPN1 dans des cellules myoblastiques influence l'expression de facteurs MyoD dépendants (Kim *et al.* 2001). Jusqu'à présent, il n'y a pas d'évidences suggérant que l'expression de ces mêmes facteurs est altérée dans les muscles affectés de patients atteints de la DMOP ou dans des souris transgéniques surexprimant PABPN1. Toutefois, l'étude de Kim et collaborateurs ouvre de nouvelles portes quant à la spécificité de la pathologie pour le muscle dans la DMOP. En effet, l'élongation du domaine polyalanine de la protéine PABPN1 pourrait modifier son interaction avec des corégulateurs de la transcription et ainsi altérer l'expression de certains gènes. En effet, il a été suggéré que le domaine polyalanine aurait un rôle dans la régulation de la transcription (Lavoie *et al.* 2003). Toutefois, le rôle exact du domaine polyalanine n'est toujours pas connu. Il reste à déterminer si ce phénomène est pertinent dans le cadre de la DMOP.

L'implication sélective des EOMs demeure une question difficile à résoudre. L'équipe de Porter et collaborateurs a démontré que les muscles extraoculaires possédaient un profil d'expression des gènes différent des autres types musculaires (Porter *et al.*, 2001). Classiquement, les muscles squelettiques sont subdivisés en trois groupes: les muscles squelettiques des membres d'origine somitique, les muscles squelettiques masticatoires et finalement, les EOMs. La comparaison de ces trois types de muscles chez la souris a permis d'observer des différences significatives des niveaux d'expression de 287 gènes entre les EOMs et les autres types à l'aide de biopuces d'ADN (Porter *et al.*, 2001). En effet, puisque les EOMs sont sélectivement affectés, du moins, le sont de manière plus précoce que les autres muscles, peut-être est-ce dû à des différences biochimiques fondamentales de ce type musculaire? En particulier, ce groupe semble indiquer que certaines protéines contenant un domaine polyalanine sont exprimées à de hauts niveaux dans les cellules musculaires des EOMs (Porter *et al.*, 2001).

L'étude de Sasseville et collaborateurs démontre que des cellules en division étaient moins sensibles à la surexpression de PABPN1 que des cellules en arrêt de cycle cellulaire (Sasseville *et al.* 2006). Le muscle squelettique est un tissu qui n'effectue aucune mitose. En effet, si le noyau de la cellule ne se divise pas, il ne peut se débarrasser, ou diviser en deux sa charge d'INIs. Ceci permettrait d'expliquer, en partie,

pourquoi les INIs ne sont observées que dans le muscle strié squelettique bien que PABPN1 soit une protéine ubiquitaire. Ce qui est clair c'est que la prédilection de certains tissus dans la DMOP sont donc plus complexes que l'on pourrait croire au préalable.

4.8 Conclusion générale

Les résultats obtenus dans le cadre de ce mémoire auront permis de mieux comprendre le phénotype et la génétique des patients atteints d'une forme sévère de la DMOP. Le fait qu'il y ait une composante génétique à la sévérité dans notre cohorte est encourageant. Ceci va donc nous permettre de faire un criblage du génome pour les patients DMOP sévères afin de déterminer les modulateurs génétiques de la sévérité et de mieux comprendre la pathophysiologie de la DMOP. De plus, l'identification de modulateurs génétiques pourrait nous mener à d'autres cibles thérapeutiques.

Les résultats obtenus ont également permis de démontrer la tendance à l'agrégation des protéines polyalanines. Toutefois, PABPN1 ne co-agrège pas avec les protéines polyalanines. Il serait intéressant de déterminer si certains des facteurs de transcription exprimés dans les tissus atteints de la DMOP se retrouvent séquestrés dans les IINs.

Finalement, la DMOP est une maladie fascinante dont il reste plusieurs questions sans réponse. L'une des questions les plus intrigantes est la suivante : Comment une expansion de triplets codant pour la polyalanine dans une protéine d'expression ubiquitaire comme PABPN1 peut-elle entraîner un phénotype limité aux muscles, et plus particulièrement à certains muscles plutôt qu'à d'autres (muscles extraoculaires). Une autre question importante est le rôle des inclusions dans la pathophysiologie de la DMOP. Des études par de nouveaux étudiants vont peut-être un jour mener à des réponses pour que les patients puissent un jour bénéficier des progrès de la recherche.

Bibliographie

- Abu-Baker, A., S. Laganier, et al. (2005). "Cytoplasmic targeting of mutant poly(A)-binding protein nuclear 1 suppresses protein aggregation and toxicity in oculopharyngeal muscular dystrophy." *Traffic* **6**(9): 766-79.
- Abu-Baker, A., C. Messaed, et al. (2003). "Involvement of the ubiquitin-proteasome pathway and molecular chaperones in oculopharyngeal muscular dystrophy." *Hum Mol Genet* **12**(20): 2609-23.
- Albrecht, A. and S. Mundlos (2005). "The other trinucleotide repeat: polyalanine expansion disorders." *Curr Opin Genet Dev* **15**(3): 285-93.
- Albrecht, A. N., U. Kornak, et al. (2004). "A molecular pathogenesis for transcription factor associated poly-alanine tract expansions." *Hum Mol Genet* **13**(20): 2351-9.
- Amiel, J., B. Laudier, et al. (2003). "Polyalanine expansion and frameshift mutations of the paired-like homeobox gene PHOX2B in congenital central hypoventilation syndrome." *Nat Genet* **33**(4): 459-61.
- Azmi, S., A. Ozog, et al. (2004). "Sharp-1/DEC2 inhibits skeletal muscle differentiation through repression of myogenic transcription factors." *J Biol Chem* **279**(50): 52643-52.
- Azmi, S., H. Sun, et al. (2003). "mSharp-1/DEC2, a basic helix-loop-helix protein functions as a transcriptional repressor of E box activity and Stra13 expression." *J Biol Chem* **278**(22): 20098-109.
- Bao, Y. P., L. J. Cook, et al. (2002). "Mammalian, yeast, bacterial, and chemical chaperones reduce aggregate formation and death in a cell model of oculopharyngeal muscular dystrophy." *J Biol Chem* **277**(14): 12263-9.
- Bao, Y. P., S. Sarkar, et al. (2004). "Congo red, doxycycline, and HSP70 overexpression reduce aggregate formation and cell death in cell models of oculopharyngeal muscular dystrophy." *J Med Genet* **41**(1): 47-51.
- Bear, D. G., N. Fomproix, et al. (2003). "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* **286**(2): 332-44.
- Becher, M. W., L. Morrison, et al. (2001). "Oculopharyngeal muscular dystrophy in Hispanic New Mexicans." *Jama* **286**(19): 2437-40.
- Beelman, C. A. and R. Parker (1995). "Degradation of mRNA in eukaryotes." *Cell* **81**(2): 179-83.
- Benoit, B., A. Nemeth, et al. (1999). "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* **27**(19): 3771-8.
- Bienvenu, T., K. Poirier, et al. (2002). "ARX, a novel Prd-class-homeobox gene highly expressed in the telencephalon, is mutated in X-linked mental retardation." *Hum Mol Genet* **11**(8): 981-91.
- Blondelle, S. E., B. Forood, et al. (1997). "Polyalanine-based peptides as models for self-associated beta-pleated-sheet complexes." *Biochemistry* **36**(27): 8393-400.
- Blumen, S. C., B. Brais, et al. (1999). "Homozygotes for oculopharyngeal muscular dystrophy have a severe form of the disease." *Ann Neurol* **46**(1): 115-8.
- Blumen, S. C., P. Nisipeanu, et al. (1997). "Epidemiology and inheritance of oculopharyngeal muscular dystrophy in Israel." *Neuromuscul Disord* **7** Suppl 1: S38-40.
- Blumen, S. C., M. Sadeh, et al. (1996). "Intranuclear inclusions in oculopharyngeal muscular dystrophy among Bukhara Jews." *Neurology* **46**(5): 1324-8.
- Barbeau, A. (1966). The syndrome of hereditary late onset ptosis and dysphagia in French Canada. Symposium uber progressive Muskeldysrophi. E. Kuhn. Berlin, Springer-Verlag: 12-109.

- Bouchard, J. P., B. Brais, et al. (1997). "Recent studies on oculopharyngeal muscular dystrophy in Quebec." *Neuromuscul Disord* **7** Suppl 1: S22-9.
- Bouchard, J. P., F. Gagne, et al. (1989). "Nuclear inclusions in oculopharyngeal muscular dystrophy in Quebec." *Can J Neurol Sci* **16**(4): 446-50.
- Boukriche, Y., T. Maisonobe, et al. (2002). "Neurogenic involvement in a case of oculopharyngeal muscular dystrophy." *Muscle Nerve* **25**(1): 98-101.
- Brais B., Tomé FM (2004). Oculopharyngeal muscular dystrophie. *Myologie*. A. G. F.-A. Engel, C. New York, McGraw-Hill. **1**:1147-1162
- Brais, B. (2003). "Oculopharyngeal muscular dystrophy: a late-onset polyalanine disease." *Cytogenet Genome Res* **100**(1-4): 252-60.
- Brais, B., J. P. Bouchard, et al. (1997). "Using the full power of linkage analysis in 11 French Canadian families to fine map the oculopharyngeal muscular dystrophy gene." *Neuromuscul Disord* **7** Suppl 1: S70-4.
- Brais, B., J. P. Bouchard, et al. (1998). "Short GCG expansions in the PABP2 gene cause oculopharyngeal muscular dystrophy." *Nat Genet* **18**(2): 164-7.
- Brais, B., YG Xie, M. Sanson, K. Morgan, J. Weissenbach, A.D. Korczyn, S.C. Blumen, M. Fardeau, F.M.S. Tomé, JP Bouchard and GA Rouleau (1995). "The Oculopharyngeal muscular dystrophy locus maps to the region of the cardiac α and β myosin heavy chain genes on chromosome 14q11.2-q13." *Human Molecular genetics* **4**(3):429-434.
- Brown, L. Y. and S. A. Brown (2004). "Alanine tracts: the expanding story of human illness and trinucleotide repeats." *Trends Genet* **20**(1): 51-8.
- Brunet, G., F. M. Tome, et al. (1997). "Genealogical study of oculopharyngeal muscular dystrophy in France." *Neuromuscul Disord* **7** Suppl 1: S34-7.
- Caburet, S., A. Demarez, et al. (2004). "A recurrent polyalanine expansion in the transcription factor FOXL2 induces extensive nuclear and cytoplasmic protein aggregation." *J Med Genet* **41**(12): 932-6.
- Calado, A. and M. Carmo-Fonseca (2000). "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* **113** (Pt 12): 2309-18.
- Calado, A., F. M. Tome, et al. (2000). "Nuclear inclusions in oculopharyngeal muscular dystrophy consist of poly(A) binding protein 2 aggregates which sequester poly(A) RNA." *Hum Mol Genet* **9**(15): 2321-8.
- Carlson B. (2004) Human Embryology and Developmental Biology, 3rd edition.
- Chakrabarty, A., T. Kortemme, et al. (1994). "Helix propensities of the amino acids measured in alanine-based peptides without helix-stabilizing side-chain interactions." *Protein Sci* **3**(5): 843-52.
- Chartier, A., B. Benoit, et al. (2006). "A Drosophila model of oculopharyngeal muscular dystrophy reveals intrinsic toxicity of PABPN1." *Embo J* **25**(10): 2253-62.
- Chattopadhyay, B., K. Baksi, et al. (2005). "Modulation of age at onset of Huntington disease patients by variations in TP53 and human caspase activated DNase (hCAD) genes." *Neurosci Lett* **374**(2): 81-6.
- Chattopadhyay, B., S. Ghosh, et al. (2003). "Modulation of age at onset in Huntington's disease and spinocerebellar ataxia type 2 patients originated from eastern India." *Neurosci Lett* **345**(2): 93-6.
- Chen, Z., Y. Li, et al. (1999). "Influenza A virus NS1 protein targets poly(A)-binding protein II of the cellular 3'-end processing machinery." *Embo J* **18**(8): 2273-83.
- Chou, P. Y. and G. D. Fasman (1978). "Empirical predictions of protein conformation." *Annu Rev Biochem* **47**: 251-76.
- Colgan, D. F. and J. L. Manley (1997). "Mechanism and regulation of mRNA polyadenylation." *Genes Dev* **11**(21): 2755-66.
- Corbeil-Girard, L. P., A. F. Klein, et al. (2005). "PABPN1 overexpression leads to upregulation

- of genes encoding nuclear proteins that are sequestered in oculopharyngeal muscular dystrophy nuclear inclusions." *Neurobiol Dis* **18**(3): 551-67.
- Creel, G. B., M. J. Giuliani, et al. (1998). "Oculopharyngeal muscular dystrophy: non-French-Canadian pedigrees." *Muscle Nerve* **21**(6): 816-8.
- Davies, J. E., Z. Berger, et al. (2006). "Oculopharyngeal muscular dystrophy: potential therapies for an aggregate-associated disorder." *Int J Biochem Cell Biol* **38**(9): 1457-62.
- Davies, J. E., S. Sarkar, et al. (2006). "Trehalose reduces aggregate formation and delays pathology in a transgenic mouse model of oculopharyngeal muscular dystrophy." *Hum Mol Genet* **15**(1): 23-31.
- Davies, J. E., L. Wang, et al. (2005). "Doxycycline attenuates and delays toxicity of the oculopharyngeal muscular dystrophy mutation in transgenic mice." *Nat Med* **11**(6): 672-7.
- Dion, P., V. Shanmugam, et al. (2005). "Transgenic expression of an expanded (GCG)₁₃ repeat PABPN1 leads to weakness and coordination defects in mice." *Neurobiol Dis* **18**(3): 528-36.
- Dubowitz, V. and M.H. Brooke (1973). Muscle Biopsy. A modern approach. Philadelphia, Saunders.
- Duranceau, A. (1997). "Cricopharyngeal myotomy in the management of neurogenic and muscular dysphagia." *Neuromuscul Disord* **7** Suppl 1: S85-9.
- Eckner, R., W. Ellmeier, et al. (1991). "Mature mRNA 3' end formation stimulates RNA export from the nucleus." *Embo J* **10**(11): 3513-22.
- Fan, X., P. Dion, et al. (2001). "Oligomerization of polyalanine expanded PABPN1 facilitates nuclear protein aggregation that is associated with cell death." *Hum Mol Genet* **10**(21): 2341-51.
- Fan, X., C. Messaed, et al. (2003). "HnRNP A1 and A/B interaction with PABPN1 in oculopharyngeal muscular dystrophy." *Can J Neurol Sci* **30**(3): 244-51.
- Forood, B., E. Perez-Paya, et al. (1995). "Formation of an extremely stable polyalanine beta-sheet macromolecule." *Biochem Biophys Res Commun* **211**(1): 7-13.
- Fukuhara, N., T. Kumamoto, et al. (1982). "Oculopharyngeal muscular dystrophy and distal myopathy. Intrafamilial difference in the onset and distribution of muscular involvement." *Acta Neurol Scand* **65**(5): 458-67.
- Goodman, F. R., C. Bacchelli, et al. (2000). "Novel HOXA13 mutations and the phenotypic spectrum of hand-foot-genital syndrome." *Am J Hum Genet* **67**(1): 197-202.
- Goodman, F. R., S. Mundlos, et al. (1997). "Synpolydactyly phenotypes correlate with size of expansions in HOXD13 polyalanine tract." *Proc Natl Acad Sci US A* **94**(14): 7458-63.
- Habets, P. E., A. F. Moorman, et al. (2002). "Cooperative action of Tbx2 and Nkx2.5 inhibits ANF expression in the atrioventricular canal: implications for cardiac chamber formation." *Genes Dev* **16**(10): 1234-46.
- Hill, M. E., G. A. Creed, et al. (2001). "Oculopharyngeal muscular dystrophy: phenotypic and genotypic studies in a UK population." *Brain* **124**(Pt 3): 522-6.
- Ishigaki, Y., X. Li, et al. (2001). "Evidence for a pioneer round of mRNA translation: mRNAs subject to nonsense-mediated decay in mammalian cells are bound by CBP80 and CBP20." *Cell* **106**(5): 607-17.
- Jacobs, J. J., P. Keblusek, et al. (2000). "Senescence bypass screen identifies TBX2, which represses Cdkn2a (p19(ARF)) and is amplified in a subset of human breast cancers." *Nat Genet* **26**(3): 291-9.
- Kamath, R. S. and J. Ahringer (2003). "Genome-wide RNAi screening in *Caenorhabditis elegans*." *Methods* **30**(4): 313-21.
- Kasper D., Braunwald E., Fauci F., Hauser H., Longo D., Jameson L., (2005). Approach to the patient with muscle disease. Harrison's principles of internal medicine. New York, McGraw-Hill. 1:2524-2527

- Kato, M., S. Das, et al. (2003). "Polyalanine expansion of ARX associated with cryptogenic West syndrome." *Neurology* 61(2): 267-76.
- Kerwitz, Y., U. Kuhn, et al. (2003). "Stimulation of poly(A) polymerase through a direct interaction with the nuclear poly(A) binding protein allosterically regulated by RNA." *Embo J* 22(14): 3705-14.
- Kessler, M. M., M. F. Henry, et al. (1997). "Hrp1, a sequence-specific RNA-binding protein that shuttles between the nucleus and the cytoplasm, is required for mRNA 3'-end formation in yeast." *Genes Dev* 11(19): 2545-56.
- Kim, Y. J., S. Noguchi, et al. (2001). "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* 10(11): 1129-39.
- Krause, S., S. Fakan, et al. (1994). "Immunodetection of poly(A) binding protein II in the cell nucleus." *Exp Cell Res* 214(1): 75-82.
- Kuhn, U., A. Nemeth, et al. (2003). "The RNA binding domains of the nuclear poly(A)-binding protein." *J Biol Chem* 278(19): 16916-25.
- Kumamoto, T., T. Ito, et al. (2000). "Increased lysosome-related proteins in the skeletal muscles of distal myopathy with rimmed vacuoles." *Muscle Nerve* 23(11): 1686-93.
- Lamond, A. I. and W. C. Earnshaw (1998). "Structure and function in the nucleus." *Science* 280(5363): 547-53.
- Laumonier, F., N. Ronce, et al. (2002). "Transcription factor SOX3 is involved in X-linked mental retardation with growth hormone deficiency." *Am J Hum Genet* 71(6): 1450-5.
- Lavoie, H., F. Debeane, et al. (2003). "Polymorphism, shared functions and convergent evolution of genes with sequences coding for polyaniline domains." *Hum Mol Genet* 12(22): 2967-79.
- Lee, Y. J., J. Lee, et al. (1998). "Genomic structure and expression of murine poly(A) binding protein II gene." *Biochim Biophys Acta* 1395(1): 40-6.
- Li, J. L., M. R. Hayden, et al. (2003). "A genome scan for modifiers of age at onset in Huntington disease: The HD MAPS study." *Am J Hum Genet* 73(3): 682-7.
- Lisbin, M. J., M. Gordon, et al. (2000). "Function of RRM domains of Drosophila melanogaster ELAV: Rnp1 mutations and rrm domain replacements with ELAV family proteins and SXL." *Genetics* 155(4): 1789-98.
- Little, B. W. and D. P. Perl (1982). "Oculopharyngeal muscular dystrophy. An autopsied case from the French-Canadian kindred." *J Neurol Sci* 53(2): 145-58.
- Marqusee, S., V. H. Robbins, et al. (1989). "Unusually stable helix formation in short alanine-based peptides." *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(14): 5286-90.
- McCracken, S., N. Fong, et al. (1997). "5'-Capping enzymes are targeted to pre-mRNA by binding to the phosphorylated carboxy-terminal domain of RNA polymerase II." *Genes Dev* 11(24): 3306-18.
- Medici, M., C. Pizzarossa, et al. (1997). "Oculopharyngeal muscular dystrophy in Uruguay." *Neuromuscul Disord* 7 Suppl 1: S50-2.
- Meola, G., V. Sansone, et al. (1997). "Oculopharyngeal muscular dystrophy in Italy." *Neuromuscul Disord* 7 Suppl 1: S53-6.
- Mirabella, M., G. Silvestri, et al. (2000). "GCG genetic expansions in Italian patients with oculopharyngeal muscular dystrophy." *Neurology* 54(3): 608-14.
- Muchowski, P. J., G. Schaffar, et al. (2000). "Hsp70 and hsp40 chaperones can inhibit self-assembly of polyglutamine proteins into amyloid-like fibrils." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(14): 7841-6.
- Muller, T., M. Deschauer, et al. (2006). "Genetic heterogeneity in 30 German patients with oculopharyngeal muscular dystrophy." *J Neurol* 253(7): 892-5.
- Muller, T., R. Schroder, et al. (2001). "GCG repeats and phenotype in oculopharyngeal muscular

- dystrophy." *Muscle Nerve* **24**(1): 120-2.
- Mundlos, S., F. Otto, et al. (1997). "Mutations involving the transcription factor CBFA1 cause cleidocranial dysplasia." *Cell* **89**(5): 773-9.
- Muragaki, Y., S. Mundlos, et al. (1996). "Altered growth and branching patterns in synpolydactyly caused by mutations in HOXD13." *Science* **272**(5261): 548-51.
- Nagashima, T., H. Kato, et al. (2000). "Oculopharyngeal muscular dystrophy in a Japanese family with a short GCG expansion (GCG)(11) in PABP2 gene." *Neuromuscul Disord* **10**(3): 173-7.
- Nakamoto, M., S. Nakano, et al. (2002). "Unequal crossing-over in unique PABP2 mutations in Japanese patients: a possible cause of oculopharyngeal muscular dystrophy." *Arch Neurol* **59**(3): 474-7.
- Nakashima, D., H. Nakajima, et al. (2003). "[Preferential distal muscle involvement in case of oculopharyngeal muscular dystrophy with (GCG) 13 expansion]." *Rinsho Shinkeigaku* **43**(9): 560-3.
- Nasrallah, I. M., J. C. Minarcik, et al. (2004). "A polyalanine tract expansion in Arx forms intranuclear inclusions and results in increased cell death." *J Cell Biol* **167**(3): 411-6.
- Nemeth, A., S. Krause, et al. (1995). "Isolation of genomic and cDNA clones encoding bovine poly(A) binding protein II." *Nucleic Acids Res* **23**(20): 4034-41.
- Oma, Y. and S. Ishiura (2004). "[Cytotoxic effects of homopolyamino acids]." *Tanpakushitsu Kakusan Koso* **49**(7 Suppl): 1129-30.
- Pagliuca, A., P. C. Bartoli, et al. (1995). "Molecular cloning of ID4, a novel dominant negative helix-loop-helix human gene on chromosome 6p21.3-p22." *Genomics* **27**(1): 200-3.
- Perie, S., B. Eymard, et al. (1997). "Dysphagia in oculopharyngeal muscular dystrophy: a series of 22 French cases." *Neuromuscul Disord* **7** Suppl 1: S96-9.
- Porschke, H., W. Kress, et al. (1997). "Oculopharyngeal muscular dystrophy in a northern German family linked to chromosome 14q, and presenting carnitine deficiency." *Neuromuscul Disord* **7** Suppl 1: S57-62.
- Porter, J.D., Khanna, S., Kaminski, H.J., Rao, J.S., Merriam A.P., Richmonds, C.R., Leahy, P., Li, J., and Andrade, F.H. (2001) Extraocular muscle is defined by a fundamentally distinct gene expression profile, *Proc Natl Acad Sci USA*, **98**, 12062-7.
- Pou Serradell, A., J. Lloreta Trull, et al. (2004). "[Oculopharyngeal muscular dystrophy: study of patients from seven Spanish families with different GCG expansions in PABP2 gene]." *Neurologia* **19**(5): 239-47.
- Preiss, T. and M. W. Hentze (1998). "Dual function of the messenger RNA cap structure in poly(A)-tail-promoted translation in yeast." *Nature* **392**(6675): 516-20.
- Probst, A., W. Tackmann, et al. (1982). "Evidence for a chronic axonal atrophy in oculopharyngeal "muscular dystrophy"." *Acta Neuropathol (Berl)* **57**(2-3): 209-16.
- Proudfoot, N. and J. O'Sullivan (2002). "Polyadenylation: a tail of two complexes." *Curr Biol* **12**(24): R855-7.
- Rankin, J., A. Wyttenbach, et al. (2000). "Intracellular green fluorescent protein-polyalanine aggregates are associated with cell death." *Biochem J* **348** Pt 1: 15-9.
- Ravikumar, B., R. Duden, et al. (2002). "Aggregate-prone proteins with polyglutamine and polyalanine expansions are degraded by autophagy." *Hum Mol Genet* **11**(9): 1107-17.
- Robinson, D. O., S. R. Hammans, et al. (2005). "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* **116**(4): 267-71.
- Robinson, D. O., A. J. Wills, et al. (2006). "Oculopharyngeal muscular dystrophy: a point mutation which mimics the effect of the PABPN1 gene triplet repeat expansion mutation." *J Med Genet* **43**(5): e23.
- Rodriguez, M., C. Camejo, et al. (2005). "(GCG)11 founder mutation in the PABPN1 gene of

- OPMD Uruguayan families." *Neuromuscul Disord* **15**(2): 185-90.
- Sachs, A. B., P. Sarnow, et al. (1997). "Starting at the beginning, middle, and end: translation initiation in eukaryotes." *Cell* **89**(6): 831-8.
- Sambrook, J., Fritsch, EF & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Sasaki, A., M. Kanai, et al. (2003). "Molecular analysis of congenital central hypoventilation syndrome." *Hum Genet* **114**(1): 22-6.
- Sasseville M.-J., Caron AW, Bourget L, Klein AF, Dicaire MJ, Rouleau GA, Massie B, Langelier Y, Brais B. (2006) The dynamism of PABPN1 nuclear inclusions during the cell cycle. *Neurobiol Dis. Sep*; **23**(3):621-9.
- Scacheri, P. C., C. Garcia, et al. (1999). "Unique PABP2 mutations in "Cajuns" suggest multiple founders of oculopharyngeal muscular dystrophy in populations with French ancestry." *Am J Med Genet* **86**(5): 477-81.
- Scheuermann, T., B. Schulz, et al. (2003). "Trinucleotide expansions leading to an extended poly-L-alanine segment in the poly (A) binding protein PABPN1 cause fibril formation." *Protein Sci* **12**(12): 2685-92.
- Schmitt, H. P. and K. H. Krause (1981). "An autopsy study of a familial oculopharyngeal muscular dystrophy (OPMD) with distal spread and neurogenic involvement." *Muscle Nerve* **4**(4): 296-305.
- Schober, R., W. Kress, et al. (2001). "Unusual triplet expansion associated with neurogenic changes in a family with oculopharyngeal muscular dystrophy." *Neuropathology* **21**(1): 45-52.
- Schul, W., R. van Driel, et al. (1998). "A subset of poly(A) polymerase is concentrated at sites of RNA synthesis and is associated with domains enriched in splicing factors and poly(A) RNA." *Exp Cell Res* **238**(1): 1-12.
- Shanmugam, V., P. Dion, et al. (2000). "PABP2 polyalanine tract expansion causes intranuclear inclusions in oculopharyngeal muscular dystrophy." *Ann Neurol* **48**(5): 798-802.
- Shimohata, T., T. Nakajima, et al. (2000). "Expanded polyglutamine stretches interact with TAFII130, interfering with CREB-dependent transcription." *Nat Genet* **26**(1): 29-36.
- Shinchuk, L. M., D. Sharma, et al. (2005). "Poly-(L-alanine) expansions form core beta-sheets that nucleate amyloid assembly." *Proteins* **61**(3): 579-89.
- Smith, J. J., K. P. Rucknagel, et al. (1999). "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* **274**(19): 13229-34.
- Suzuki, T., M. Nakagawa, et al. (2002). "The first molecular evidence that autophagy relates rimmed vacuole formation in chloroquine myopathy." *J Biochem (Tokyo)* **131**(5): 647-51.
- Tavanez, J. P., P. Calado, et al. (2005). "In vivo aggregation properties of the nuclear poly(A)-binding protein PABPN1." *Rna* **11**(5): 752-62.
- Tome, F. M., D. Chateau, et al. (1997). "Morphological changes in muscle fibers in oculopharyngeal muscular dystrophy." *Neuromuscul Disord* **7** Suppl 1: S63-9.
- Tome, F. M. and M. Fardeau (1980). "Nuclear inclusions in oculopharyngeal dystrophy." *Acta Neuropathol (Berl)* **49**(1): 85-7.
- Uyama, E., H. Hino, et al. (2005). "Animal model of oculopharyngeal muscular dystrophy." *Acta Myol* **24**(2): 84-8.
- Uyama, E., O. Nohira, et al. (1996). "Oculopharyngeal muscular dystrophy in two unrelated Japanese families." *Neurology* **46**(3): 773-8.
- Uyama, E., O. Nohira, et al. (1997). "Oculopharyngeal muscular dystrophy in Japan." *Neuromuscul Disord* **7** Suppl 1: S41-9.
- Uyama, E., T. Tsukahara, et al. (2000). "Nuclear accumulation of expanded PABP2 gene product in oculopharyngeal muscular dystrophy." *Muscle Nerve* **23**(10): 1549-54.

- Verheesen, P., A. de Kluijver, et al. (2006). "Prevention of oculopharyngeal muscular dystrophy-associated aggregation of nuclear polyA-binding protein with a single-domain intracellular antibody." *Hum Mol Genet* **15**(1): 105-11.
- Wahle, E. (1991). "A novel poly(A)-binding protein acts as a specificity factor in the second phase of messenger RNA polyadenylation." *Cell* **66**(4): 759-68.
- Wahle, E. (1995). "Poly(A) tail length control is caused by termination of processive synthesis." *J Biol Chem* **270**(6): 2800-8.
- Wahle, E. and W. Keller (1996). "The biochemistry of polyadenylation." *Trends Biochem Sci* **21**(7): 247-50.
- Wahle, E. and U. Rügsegger (1999). "3'-End processing of pre-mRNA in eukaryotes." *FEMS Microbiol Rev* **23**(3): 277-95.
- Wang, Q. and J. Bag (2006). "Ectopic expression of a polyalanine expansion mutant of poly(A)-binding protein N1 in muscle cells in culture inhibits myogenesis." *Biochem Biophys Res Commun* **340**(3): 815-22.
- Wang, Q., D. D. Mosser, et al. (2005). "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* **14**(23): 3673-84.