

THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Etude de la localisation subcellulaire de la Senataxine et de la Maspardine, deux protéines impliquées dans des pathologies neurodégénératives

CARUSO, Marino

Award date:
2016

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



UNIVERSITE DE NAMUR
Faculté des Sciences

**Etude de la localisation subcellulaire de la Senataxine et de la Maspardine,
deux protéines impliquées dans des pathologies neurodégénératives**

**Mémoire présenté pour l'obtention
du grade académique de master 120 en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire**

Marino Caruso

Janvier 2016

Université de Namur
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20
E-mail: joelle.jonet@unamur.be - <http://www.unamur.be>

Etude de la localisation subcellulaire de la Senataxine et de la Maspardine, deux protéines impliquées dans des pathologies neurodégénératives

CARUSO Marino

Résumé

Notre laboratoire, en collaboration avec l'équipe du Dr Lobel, a récemment réalisé une analyse de la localisation subcellulaire du protéome de foie de rat en combinant des méthodes de fractionnement subcellulaire et des analyses par spectrométrie de masse quantitative. Ce faisant, certaines protéines se sont vues assigner une localisation différente de celle décrite dans la littérature et/ou dans les bases de données. Parmi ces dernières, deux protéines ont retenu notre attention: la Senataxine, et la Maspardine. Des mutations dans le gène qui encode la Senataxine causent la sclérose amyotrophique latérale 4 et l'ataxie avec apraxie oculomotrice. Le rôle de la protéine SETX n'est néanmoins pas encore bien compris. Sa présence a été documentée dans le noyau et dans le cytoplasme. Cependant plusieurs indices (dont les résultats obtenus par notre laboratoire) suggèrent que SETX pourrait aussi être localisée au niveau de la mitochondrie. Dans la première partie de ce travail, nous avons testé cette hypothèse en combinant des méthodes de fractionnement subcellulaire et la détection de SETX par western blotting. Bien que nos résultats n'excluent pas la possibilité que SETX soit partiellement localisée dans la mitochondrie dans le cerveau de souris, nos données suggèrent que cet organe n'est pas le site de localisation principal de SETX dans cet organe. Dans la deuxième partie de ce mémoire, nous nous sommes intéressés à la Maspardine (SPG21), une protéine dont la fonction exacte n'est pas encore connue. Il a été rapporté que deux mutations (A108P et Ins601A) dans le gène *SPG21* causent le syndrome de Mast et que cette protéine se localise au niveau du cytosol et des endosomes. Dans le cadre de l'analyse de la localisation du protéome de foie de rat, une double localisation cytosolique et lysosomale a été assignée à SPG21. Couplées à la présence dans SPG21 d'un motif FWLM ressemblant aux motifs de liaison au complexe du rétromère (qui recycle des cargos entre les endosomes et le *trans*-Golgi), ces données suggèrent que SPG21 pourrait être recrutée sur les lysosomes, en plus des endosomes, et participer à des mécanismes de transport vésiculaire à partir de/vers ces compartiments. Pour tester ces hypothèses, nous avons analysé la localisation subcellulaire de SPG21 (sauvage ou mutée au niveau du motif FWLM) dans des cellules HeLa transfectées par des méthodes de fractionnement subcellulaire et d'immunofluorescence. Ceci a permis de confirmer la présence de SPG21 dans le cytosol et les endosomes, de rassembler des éléments qui supportent sa présence dans les lysosomes et d'observer que le motif FWLM joue un rôle dans sa localisation au niveau des endolysosomes. De plus, nous avons déterminé que l'insertion de la mutation A108P dans la protéine entraîne une dégradation massive de SPG21 par le protéasome. Grâce à ces expériences, nous avons amélioré la connaissance de la localisation de SPG21 et, en identifiant un défaut de stabilité de la protéine mutée « A108P », fait un premier pas vers la compréhension de la pathogenèse du syndrome de Mast.

Mémoire de master 120 en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire
Janvier 2016

Promoteur: Michel jadot

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier Michel Jadot, mon promoteur, ainsi que tous les membres du laboratoire de chimie physiologique pour m'avoir accueilli dans leur laboratoire durant ce mémoire.

La réalisation d'un mémoire constitue un apprentissage de grande envergure à l'échelle de la formation universitaire. Dès lors, je souhaite tout particulièrement remercier Marielle Boonen pour le rôle prépondérant qu'elle a joué dans ce processus d'apprentissage en encadrant mon travail.

Merci aussi à Florentine Gilis pour le nombre inestimable de réponses qu'elle a apporté à mes « petites questions », même si celles-ci étaient parfois (très) répétitives.

Merci également à Thierry Arnould, Charles Nicaise, Evelyne Devuyt, et Sophie Dogné, les membres de mon jury, d'avoir accepté de lire ce mémoire.

Passer de nombreuses poses midi (ponctuées par des débats philosophiques, des partages d'expériences insolites et des blagues déplacées) en compagnie des membres des laboratoires de Génétique et de biologie moléculaire du cancer fut un réel plaisir. Je leur adresse, dès lors, des remerciements chaleureux.

Finalement, je remercie aussi ma famille et mes amis pour le soutien et les conseils qu'ils m'ont apporté durant l'ensemble de mes études.

Table des matières

Introduction	
1. Contexte du travail de mémoire.....	1
2. Senataxine (SETX).....	2
2.1. Caractéristiques et fonctions de SETX.....	2
2.2. Des mutations dans le gène codant pour SETX causent deux maladies neurodégénératives.....	4
2.3. Localisation intracellulaire de SETX.....	5
2.4. SETX pourrait-elle être partiellement localisée dans la mitochondrie ?.....	5
3. Maspardine (SPG21).....	7
3.1. Caractéristiques et fonctions de SPG21.....	7
3.2. Deux mutations dans le gène codant pour SPG21 causent une paraplégie spastique héréditaire (HSP).....	8
3.3. Localisation intracellulaire de SPG21.....	10
3.4. SPG21, un acteur possible du trafic vésiculaire intracellulaire.....	10
Matériel et méthodes	
1. Matériel.....	13
2. Méthodes.....	13
2.1. Constructions génétiques.....	13

2.2. Culture cellulaire et transfections.....	15
2.3. Western blotting.....	15
2.4. Fractionnement subcellulaire par centrifugation différentielle.....	16
2.5. Fractionnement subcellulaire par centrifugation dans des gradients de densité.....	16
2.6. Dosages enzymatiques.....	17
2.7. Immunofluorescence.....	18
2.8. Co-immunoprécipitation.....	19

Résultats

1. Etude de la localisation subcellulaire de la protéine Senataxine (SETX).....	20
1.1. Distribution tissulaire de SETX.....	20
1.2. Localisation subcellulaire de SETX dans le cerveau de souris.....	21
1.2.1. Fractionnement subcellulaire du cerveau de souris par centrifugation différentielle.....	21
1.2.2. Fractionnement subcellulaire du cerveau de souris par centrifugation isopycnique.....	22
1.3. Localisation subcellulaire de SETX dans les cellules N1E-115.....	24
1.4. Surexpression de SETX dans des cellules HeLa.....	25
2. Etude de la localisation subcellulaire de la protéine Maspardine (SPG21).....	26

2.1. Analyse de la localisation de SPG21 par immunofluorescence et fractionnement subcellulaire dans des cellules HeLa transfectées.....	26
2.1.1. Construction d'un vecteur d'expression de SPG21.....	26
2.1.2. SPG21 colocalise partiellement avec LAMP-1 (un marqueur de la membrane des endosomes tardifs et lysosomes) et VPS26 (un marqueur du complexe rétromère).....	27
2.1.3. Effet de la mutation FWLM/AAAA sur la localisation subcellulaire de SPG21.....	28
2.1.4. Analyse de la localisation de SPG21 par fractionnement subcellulaire.....	28
2.2. Test d'interaction de SPG21 avec VPS26 et LAMP-1.....	31
2.3. Effet de la mutation A108P sur l'abondance protéique de SPG21.....	31

Discussion et perspectives

1. Senataxine (SETX).....	33
2. Maspardine (SPG21).....	36
2.1. Localisation intracellulaire de la protéine SPG21 WT.....	36
2.2. Rôle du motif FWLM dans la localisation intracellulaire de SPG21.....	38
2.3. Effet de la mutation A108P sur la stabilité de la protéine SPG21.....	40

Références

Liste des abréviations

ADN	acide désoxyribonucléique
ALS4	sclérose amyotrophique latérale 4
AOA2	ataxie avec apraxie oculomotrice
AP	adaptator protein complex
ARNm	acide ribonucléique messenger
ARNt	acide ribonucléique de transfert
BSA	bovine serum albumin
CD4	cluster of differentiation 4
CI-MPR	récepteur au mannose-6-phosphate cation indépendant
CPEO	ophtalmoplégie externe progressive
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	diméthylsulfoxyde
DNTP	désoxyribonucléotide
EDTA	Éthylène Diamine Tétra-Acétique
F	Phénylalanine
GAPDH	glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
HRP	horse radish peroxidase
HSP	paraplégie spastique héréditaire
IP	immunoprécipitation
IRM	imagerie par résonance magnétique
kDa	kiloDalton
L	Leucine
LAMP-1	lysosomal membrane associated protein 1
LAMP-2	lysosomal membrane associated protein 2
M	méthionine
PBS	phosphate buffer saline
PER	complexe period
Pol II	ARN polymérase II
PVDF	polyfluorure de vinylidène
rpm	révolution par minute
SDS	sodium dodécyl sulfate
SETX	Senataxine
snoRNA	small nucleolar RNA
snRNA	small nuclear RNA
SNX	Sortin Nexin
SPG	spastic paraplegia gene
SPG	Spactic paraplegia
SPG21	Maspardine
VPS	vacuolar protein sorting
W	Tryptophane

Introduction

	membrane plasmique	Noyau	Mitochondrie	Lysosome	Peroxisome	Cytosol	Réticulum endoplasmique	Appareil de Golgi	« Shift » après traitement au triton WR-1339
β -galactosidase	0	0	0	1	0	0	0	0	oui
α -glucosidase	0	0	0	0,079	0,006	0,013	0,896	0,006	non
Glutamate déshydrogénase	0	0	0,918	0	0	0	0,082	0	non

Table 1 : Probabilité de localisation d'enzymes marqueurs dans une population d'organites subcellulaires (Jadot et Lobel, données non publiées)

Les probabilités de localisation dans chacun des compartiments subcellulaires varient de 0 à 1. La dernière colonne indique si la protéine a « shifté » dans la fraction supérieure avec les lysosomes allégés (après traitement au triton WR-1339 lors d'une centrifugation des lysosomes dans un gradient de densité au sucrose).

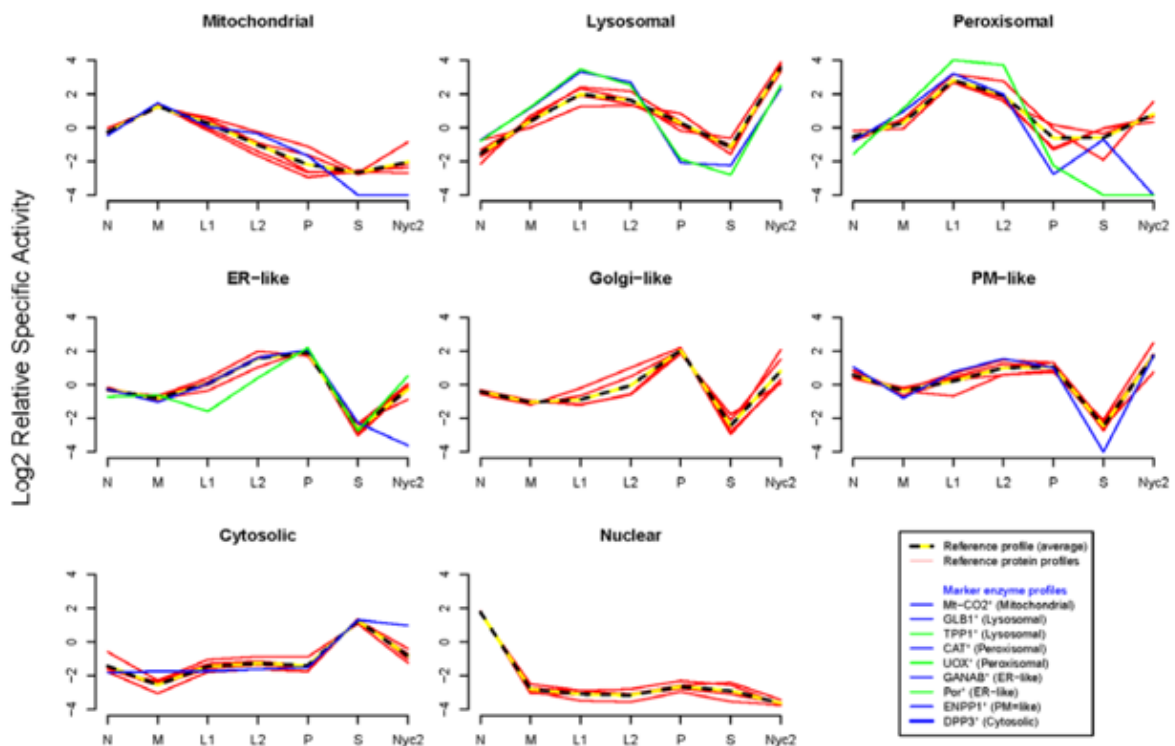


Figure 1 : Distribution de plusieurs enzymes marqueurs de différents organites (Jadot et Lobel, données non publiées)

Les distributions des enzymes marqueurs de plusieurs organites obtenues par spectrométrie de masse (traits pleins) sont comparées aux distributions d'enzymes marqueurs de ces mêmes organites obtenus par la méthode traditionnelle de dosage enzymatique (traits discontinus).

1. Contexte du travail de mémoire

Ce mémoire s'appuie sur des résultats obtenus durant un travail réalisé par notre équipe, en collaboration avec le laboratoire de spectrométrie de masse du docteur Peter Lobel, ayant pour objet l'étude de la localisation subcellulaire du protéome de foie de rat. Ce travail, dont les résultats ne sont pas encore publiés, a combiné des méthodes de fractionnement subcellulaire du foie de rat par centrifugation (en appliquant les principes analytiques décrits par de Duve et son équipe (de Duve et al. 1955; Beaufay et al. 1964)) et des analyses par spectrométrie de masse quantitative. La combinaison de plusieurs approches indépendantes de centrifugation a permis l'établissement de profils de distribution de plus de 10 000 protéines du foie de rat. La comparaison de ceux-ci avec les profils de distribution de protéines marqueurs de différents organites (tels que les mitochondries, les lysosomes, les peroxysomes, le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi, la membrane plasmique, le cytosol et le noyau) a permis de calculer des probabilités de localisation de chaque protéine dans ces divers compartiments subcellulaires. La table 1 reprend quelques exemples de probabilités (réparties selon une échelle allant de 0 à 1) assignées à des protéines résidentes des lysosomes (β -galactosidase), du réticulum endoplasmique (α -glucosidase alcaline) et des mitochondries (glutamate déshydrogénase) (table 1). Pour confirmer la fiabilité de cette méthode, les profils de distribution obtenus en spectrométrie de masse pour les enzymes marqueurs sélectionnées ont été validés par comparaison avec les profils de distribution obtenus par dosage de leur activité. Ceci a permis de mettre en évidence une forte corrélation entre les profils obtenus par les deux méthodes (figure 1). De plus, la distinction des protéines lysosomales, par rapport à des protéines localisées dans des compartiments dont les profils de distribution se chevauchent partiellement avec celui des lysosomes (dont les peroxysomes et les mitochondries), a été renforcée par l'utilisation d'une puissante méthode. En effet, lorsque des rats reçoivent une injection de triton WR-1339 (un détergent non-ionique), la densité des lysosomes de leur foie diminue fortement, tandis que les densités moyennes des mitochondries et des peroxysomes ne sont que peu, ou pas affectées. Cette modification spécifique de la densité lysosomale (ou « shift de densité») peut être observée lorsque les fractions enrichies en lysosomes (L) des animaux traités et non traités sont centrifugées dans un gradient de densité de saccharose. En pratique, les lysosomes « allégés » s'équilibrent à une densité d'environ 1,12g/ml, alors que les lysosomes normaux présentent une densité d'équilibration d'environ 1,20g/ml. Ainsi, après traitement, l'observation d'une modification similaire dans le profil de distribution d'une protéine marqueur du lysosome et d'une protéine de localisation inconnue constitue un argument fort en faveur de sa présence dans le lysosome (Tableau 1 et figure 2).

L'ensemble des données collectées grâce à ces diverses manipulations a permis l'établissement de listes de protéines caractérisées par une probabilité élevée de localisation dans tel ou tel organite. La comparaison de ces listes avec les données de la littérature et avec diverses bases de données disponibles a permis de confirmer la localisation de protéines déjà connues, a révélé la localisation de protéines qui n'avaient encore jamais été caractérisées et a également permis de mettre en évidence des erreurs dans les localisations renseignées (ou prédites) pour certaines protéines. De nouvelles informations, relatives à la localisation des protéines Senataxine (SETX) et Maspardine (SPG21), ont particulièrement attisé la curiosité de notre équipe, ce qui a initié ce projet de mémoire.

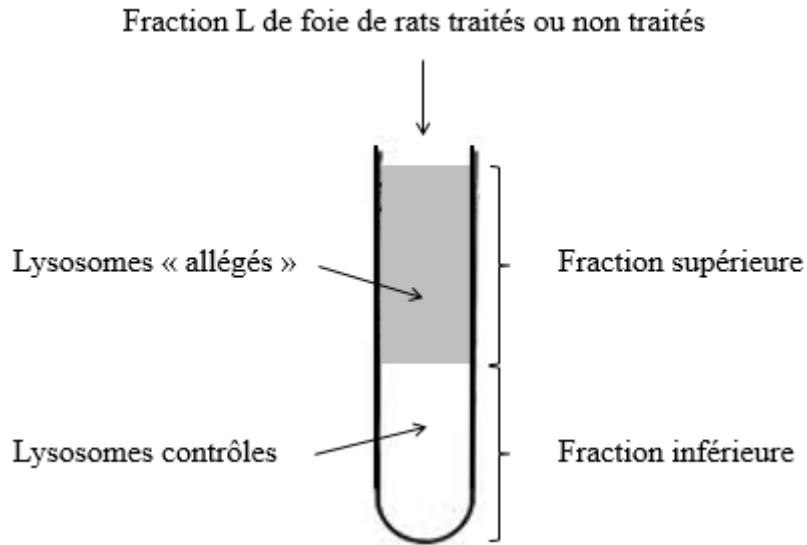


Figure 2 : Distribution des lysosomes contrôles et « allégés » au sein d'un gradient de densité linéaire de sucrose

Une fraction L préparée lors d'un fractionnement subcellulaire complet par centrifugation différentielle de foie de rat traités au triton WR-1339 est chargée sur le haut d'un gradient linéaire de sucrose. Après centrifugation, les lysosomes « allégés » du foie de rat traité s'équilibrent dans la fraction supérieure, alors que les lysosomes du foie de rat non traité s'équilibrent dans la fraction inférieure.

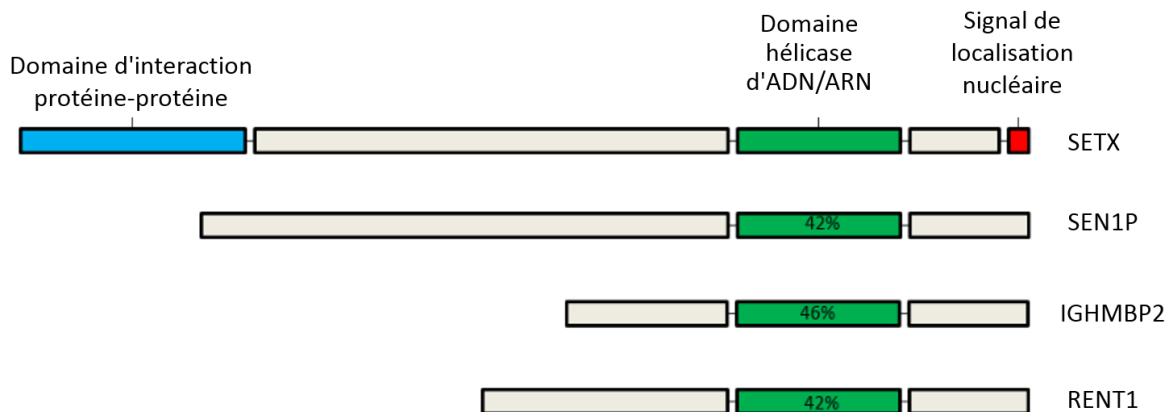


Figure 3 : Schémas représentant les protéines SETX, Sen1P, IGHMBP2 et RENT1

SETX contient un domaine amino-terminal d'interaction protéine-protéine (bleu), un domaine hélicase d'ADN/ARN (vert) et un signal de localisation nucléaire potentiel (rouge). Le domaine hélicase d'ADN/ARN de SETX présente des homologies de séquences de 42%, 46% et 42% avec Sen1p, IGHMBP2 et RENT1, respectivement.

2. *Senataxine (SETX)*

2.1. *Caractéristiques et fonctions de SETX*

SETX est une protéine composée de 2677 acides aminés qui contient, du côté C-terminal, un domaine hélicase d'ADN/ARN typiquement retrouvé dans la superfamille 1 des hélicases, ainsi qu'un signal potentiel de localisation nucléaire carboxy-terminal (figure 3). Du côté N-terminal, la protéine contient un domaine d'interaction protéine-protéine hypothétique (Moreira et al. 2004). Le domaine hélicase de SETX présente une homologie de séquence de 42% avec un domaine similaire chez la protéine de levure Sen1p (splicing endonuclease 1) ; c'est pourquoi les deux protéines sont considérées comme orthologues. Aussi, des homologies de séquence sont observées entre SETX et la protéine RENT1 (regulator of nonsense transcripts-1, également dénommée UPF1) et IGHMBP2 (immunoglobulin μ -binding protein 2) (respectivement avec 46% et 42% d'homologie de séquence) (Chen et al. 2004) (figure 3). Ces trois protéines sont impliquées dans le métabolisme des ARNs. En effet, RENT1 joue un rôle essentiel dans le mécanisme de dégradation des ARN messagers (ARNm) non-sens (nonsense-mediated mRNA decay) (Medghalchi et al. 2001), un processus dont l'objectif est de dégrader les ARNm contenant des codons « stop » prématurés (Chang et al. 2007). Il est également impliqué dans la dégradation des ARNm codant pour les histones lors de la fin de la phase S ou lors de l'inhibition de la synthèse d'ADN (Kaygun & Marzluff 2005; Choe et al. 2014). Les fonctions de la protéine IGHMBP2 sont vraisemblablement liées à la transcription : en effet, la protéine est capable de s'associer aux monosomes (soit un complexe constitué d'un ARNm et d'un ribosome) pour, éventuellement, jouer un rôle dans l'initiation de la transcription des ARNm (Guenther et al. 2009) et elle est également capable de s'associer avec les ARNt (de Planell-Saguer et al. 2009). Sen1p quant à elle, est impliquée dans le métabolisme de plusieurs types d'ARN (Ursic et al. 1997). En effet, Sen1p est capable de se lier à divers snoRNA (small nucleolar RNA) et des mutations dans la protéine causent des modifications de l'abondance de certains snoRNA. Aussi, Sen1p est impliquée dans la maturation des snRNA (small nuclear RNA). Sen1p joue également un rôle dans la terminaison de la transcription par l'ARN polymérase II (Steinmetz et al. 2006).

Grâce à plusieurs études, dont la plupart se sont basées sur les connaissances à propos de son orthologue Sen1p, plusieurs fonctions ont été attribuées à SETX (Bennett & La Spada 2015).

Il a été montré que SETX pouvait être impliquée dans l'élimination de R-loops nucléaires : des structures constituées de brins d'ADN et ARN hybridés ensemble (Skourti-Stathaki et al. 2011; Skourti-Stathaki & Proudfoot 2014; Gan et al. 2011). Sur base des divers rôles joués par ces structures, plusieurs hypothèses peuvent être formulées sur l'importance que pourrait revêtir leur régulation par SETX.

Premièrement, selon le « modèle torpédo » de la terminaison de la transcription, la synthèse d'ARN par l'ARN polymérase II (pol II) se prolonge en aval du site de polyadénylation, et un clivage réalisé par une endonucléase permet à l'ARN néosynthétisé d'être libéré, alors que pol II continue la synthèse d'ARN. Dans ce modèle, le mécanisme permettant de libérer Pol II, et ainsi de terminer la transcription, se déroule grâce au recrutement

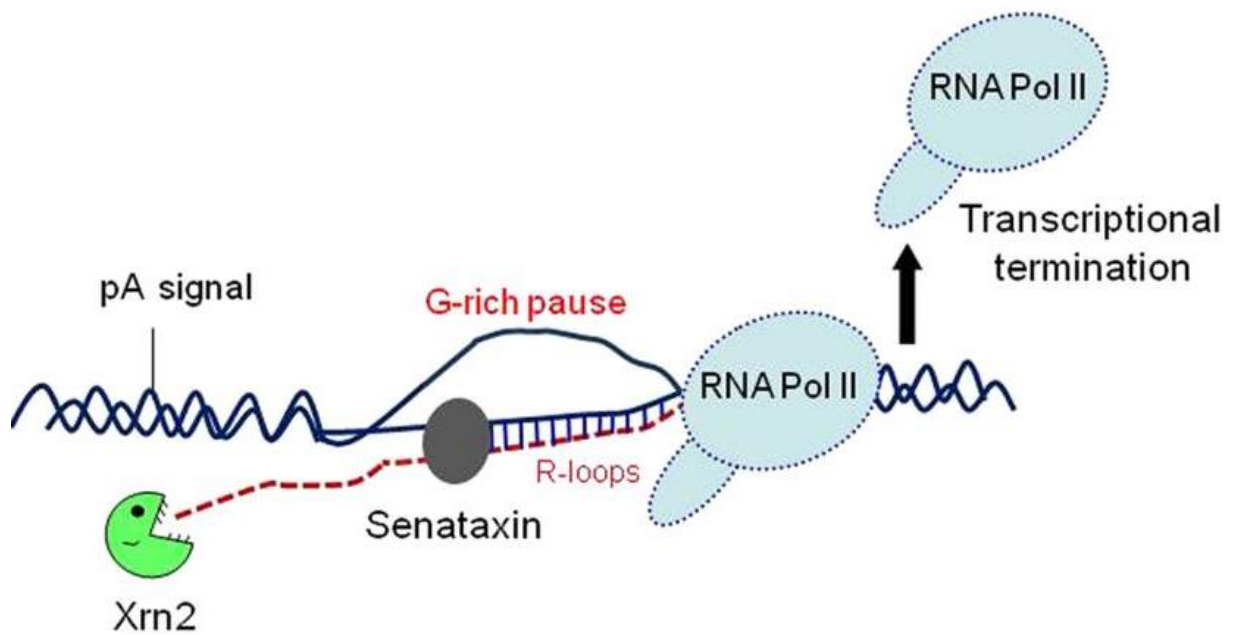


Figure 4 : Rôle de SETX dans la terminaison de la transcription selon le modèle « torpedo » (K. Skourti-Stathaki, 2011)

SETX est capable d'éliminer le R-loop formé entre le brin d'ARN synthétisé par Pol II (après que l'ARNm ait été libéré par clivage). Ce faisant, elle permet à Xrn2 de « grignoter » ce brin d'ARN et de rejoindre Pol II pour permettre son relargage et ainsi entraîner la terminaison de la transcription.

d'une 5'-3' exoribonucléase (Xrn2). Celle-ci va « grignoter » le brin d'ARN que Pol II continue de synthétiser après la libération de l'ARNm jusqu'à atteindre Pol II et permettre sa libération (Luo & Bentley 2004). Étant donné que ce mécanisme de digestion pourrait être inhibé par la formation d'un R-loops entre cet ARN restant et le brin d'ADN « template », il a été proposé que SETX puisse éliminer ce R-loop et ainsi permettre la terminaison de la transcription (Skourti-Stathaki et al. 2011)(figure 4). Par ailleurs, en perturbant la fonction de terminaison de la transcription de SETX, le complexe protéique « PER » (pour period) (qui est impliqué dans le contrôle du rythme circadien) peut inhiber la transcription de gènes codant pour des protéines qui le composent (comme *Per1* et *Cry2*). Ce mécanisme constitue une boucle de rétroaction négative qui permet de réguler le rythme circadien (Padmanabhan et al. 2012). Cependant, il a aussi été rapporté qu'en condition d'infection virale, SETX pouvait induire une terminaison précoce de la transcription par la Pol II de gènes responsables de la réponse antivirale (Miller et al. 2015). En effet, une réponse antivirale plus puissante a été observée dans des cellules déplétées en SETX. Le mécanisme à la base de cette régulation de la transcription par SETX n'est pas encore connu, il est donc difficile de lier la fonction d'élimination des R-loops de la protéine avec ce processus. Ainsi SETX pourrait à la fois permettre la transcription de certains gènes (en étant indispensable à la terminaison de la transcription) et pourrait aussi participer à l'inhibition de la transcription d'autres gènes (en participant à la terminaison précoce de la transcription).

La capacité de SETX à éliminer les R-loops pourrait également jouer un rôle important durant les collisions entre la fourche de réplication et la machinerie de transcription. En effet, lors de la réplication de l'ADN, la fourche de réplication peut être bloquée par des R-loops induits par la transcription des gènes (et plus particulièrement les longs gènes dont la transcription prend plus de temps) avec pour conséquence des dommages à l'ADN et une instabilité génomique (Gan et al. 2011). Ainsi, en supprimant ces entraves à la réplication, SETX pourrait contribuer à la maintenance du génome (Yüce & West 2013).

De plus, il a été montré que SETX interagit avec l'exosome, un complexe protéique nucléaire capable de dégrader les ARN nucléaires dans le cadre de plusieurs mécanismes de régulation, de contrôle de la qualité, ou de turnover de différents types d'ARNs. Cette interaction est rendue possible grâce à des sumoylations de SETX. Une colocalisation de SETX et des exosomes est notamment observée dans des cellules subissant des traitements qui promeuvent la formation de R-loops (tel qu'un traitement à l'aphidicoline) par les machineries de transcription et réplication (Richard et al. 2013).

En outre, certaines mutations dans le gène codant pour SETX ont été liées à une augmentation de la sensibilité des cellules aux agents qui endommagent l'ADN tels que l' H_2O_2 , la camptothecin (qui lie de manière covalente la topoisomérase I à l'ADN, ce qui induit des dommages à l'ADN (Redinbo 1998)), et la mitomycin C (une antibiotique capable d'inhiber la réplication par la formation de liens entre les brins complémentaires d'ADN).

Ensemble, ces observations suggèrent que SETX est une protéine impliquée dans divers mécanismes tels que l'élimination des R-loops, la régulation de différents types d'ARN nucléaires ou encore la réponse aux dommages à l'ADN.

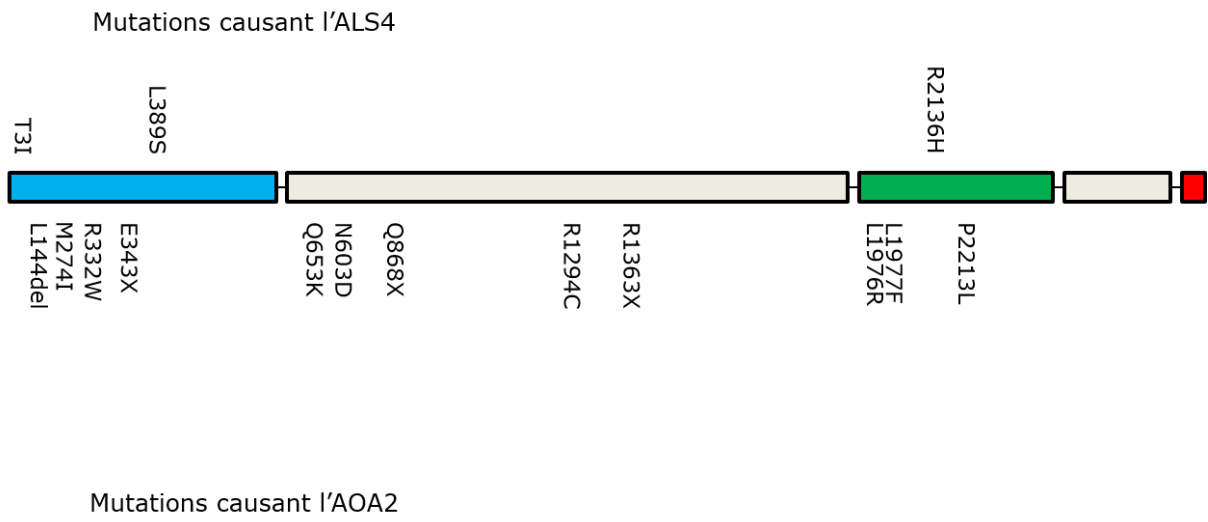


Figure 5 : Schéma des différentes mutations dans la protéine SETX causant l'ALS4 et l'AOA2

2.2. Des mutations dans le gène codant pour SETX causent deux maladies neurodégénératives

Des mutations dans *SETX*, sont responsables de la sclérose amyotrophique latérale 4 (ALS4) (OMIM 602433) et de l'ataxie avec apraxie oculomotrice 2 (AOA2) (OMIM 606002) (Moreira et al. 2004; Chen et al. 2004), deux pathologies neurodégénératives. Trois mutations différentes ont été décrites comme causant l'ALS4, alors que 11 mutations différentes sont retrouvées chez les patients souffrant d'AOA2 (figure 5).

L'ALS4 est une forme de sclérose amyotrophique rare à transmission autosomique dominante caractérisée par un début précoce, une progression lente et s'accompagnant d'un dysfonctionnement des neurones moteurs supérieurs et inférieurs (Rabin et al. 1999; Chance et al. 1998). Plus précisément, les symptômes qui se déclarent en premier sont des troubles de la marche, une faiblesse et une atrophie des muscles distaux des membres supérieurs et inférieurs. Surviennent ensuite des faiblesses des muscles proximaux. Finalement, dans les stades plus avancés de la maladie, les patients peuvent perdre l'usage des mains, et peuvent être contraint de rester en chaise roulante (Chance et al. 1998). De façon générale, les patients présentent souvent des hyperréflexies pathologiques (c'est à dire une hypersensibilité au test de réflexe tendineux), mais aucun symptôme au niveau des neurones sensoriels ni aucune atrophie des muscles bulbaires (innervés par les nerfs provenant du tronc cérébral) et respiratoires ne sont observés. Ceci différencie l'ALS4 des autres formes sporadiques et familiales d'ALS. Ces symptômes particuliers s'expliquent par le fait que les patients présentent des dénervations et ré-innervations partielles chroniques (plus souvent au niveau des nerfs distaux que proximaux), ainsi que des dégénérescences de neurones moteurs supérieurs (motoneurones faisant partie du faisceau corticospinal) et inférieurs (motoneurones issus de la corne antérieure de la moelle épinière). Des gonflements des axones sont également observés (Rabin et al. 1999).

L'AOA2, quant à elle, est une maladie à transmission autosomique récessive qui se déclare à l'adolescence par une ataxie cérébelleuse progressive caractérisée par une déficience de la coordination fine des mouvements (ayant par exemple pour conséquence l'apparition de troubles de la marche). Certains symptômes additionnels sont fréquemment décrits chez les patients atteints, tels qu'une augmentation du taux d' α -fetoprotéine sérique, une neuropathie des nerfs sensoriels périphériques, un nystagmus (mouvements involontaires et saccadés des yeux) ou une dysarthrie (trouble d'articulation de la parole). D'autres symptômes sont retrouvés à une fréquence moins élevée, comme des tremblements de la tête, des signes pyramidaux (c'est-à-dire l'ensemble des symptômes causés par une atteinte des faisceaux pyramidaux, qui sont impliqués dans le contrôle des mouvements volontaires) ou une chorée (apparition de mouvements involontaires). Enfin, chez approximativement la moitié des patients atteints, une apraxie oculomotrice (troubles des mouvements oculaires latéraux) est également rapportées (Moreira et al. 2004; Németh et al. 2000; Bomont et al. 2000; Duquette et al. 2005; Hammer et al. 2012).

Malgré les différentes informations qui ont été découvertes à propos des fonctions de *SETX*, le mécanisme à la base de la pathogenèse de ces deux pathologies reste méconnu à ce jour.

	membrane plasmique	Noyau	Mitochondrie	Lysosome	Peroxisome	Cytosol	Réticulum endoplasmique	Appareil de Golgi	« Shift » après traitement au triton WR-1339
β -galactosidase	0	0	0	1	0	0	0	0	oui
α -glucosidase	0	0	0	0,079	0,006	0,013	0,896	0,006	non
Glutamate déshydrogénase	0	0	0,918	0	0	0	0,082	0	non
SETX	0	0	0,754	0	0	0,139	0	0,107	non

Table 2 : Probabilité de localisation de SETX et d'enzymes marqueurs dans une population d'organites subcellulaires (Jadot et Lobel, Données non publiées)

Les probabilités de localisation dans chacun des compartiments subcellulaires varient de 0 à 1. La dernière colonne indique si la protéine a « shifté » dans la fraction supérieure avec les lysosomes allégés (après traitement au triton WR-1339 lors d'une centrifugation des lysosomes dans un gradient de densité au sucrose).

2.3. Localisation intracellulaire de SETX

SETX a été détectée par immunofluorescence dans le cytoplasme et dans les noyaux de différents types cellulaires en culture tels que les Cos7, les HeLa, ou des fibroblastes (Chen et al. 2006). Cette localisation partiellement nucléaire est en accord avec, d'une part la présence d'un signal potentiel de localisation nucléaire dans la séquence de la protéine et, d'autre part, avec les fonctions nucléaires de la protéine décrites ci-dessus. Plus précisément, SETX forme des foci nucléaires (c'est-à-dire des agrégats) dans des cellules humaines en phase G1 et S/G2 (Yüce & West 2013). Curieusement, le nombre de foci de SETX détectés dans les noyaux de cellules en phase S/G2 est augmenté après des traitements qui ont pour conséquence de promouvoir la formation de R-loops, tel que le traitement à la diospyrin D (un inhibiteur de la topoisomérase I) (Yüce & West 2013). A l'opposé, l'inhibition par la caféine de la protéine « ataxia telangiectasia mutated (ATM) protein » (une protéine qui fait partie du procédé de réponse aux dommages à l'ADN) réduit le nombre de foci de SETX détectés dans les noyaux de ces cellules (Yüce & West 2013). Ainsi, la présence de SETX dans le noyau des cellules et ses possibles fonctions à cet endroit font l'objet de plusieurs publications, mais très peu d'informations sont disponibles concernant la fraction de la population détectée qui est localisée dans le cytoplasme.

2.4. SETX pourrait-elle être partiellement localisée dans la mitochondrie ?

Lors de l'étude de la localisation subcellulaire des protéines du foie de rat, réalisée par notre équipe et décrite ci-dessus, une observation intéressante a été révélée. Les résultats des calculs de probabilités de localisation de SETX indiquent que cette protéine pourrait être localisée au niveau de la mitochondrie (table 2). Le nombre très limité de spectres et de peptides détectés dans l'étude était toutefois inférieur au seuil fixés (minimum 2 peptides et 3 spectres) pour considérer les résultats de distribution intracellulaire comme étant fiables. Cependant, plusieurs autres observations argumentent en faveur de l'hypothèse selon laquelle SETX pourrait, en partie, se localiser au niveau mitochondrial.

D'abord, il a été décrit qu'un patient avec une mutation au niveau du site d'épissage de SETX présentait des symptômes fréquemment retrouvés chez des patients souffrant d'un désordre mitochondrial : par exemple une cataracte congénitale, une ophtalmoplégie externe progressive (CPEO) (c'est-à-dire une incapacité progressive de bouger les yeux et les sourcils) et une ataxie et une faiblesse musculaire (Craig et al. 2013).

Ensuite, plusieurs changements dans les niveaux d'expression de l'ARNm encodant SETX ont été détectés en réponse à des modifications du métabolisme mitochondrial, selon la base de données GEO profile (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/profile/>). Par exemple, l'expression de SETX est augmentée après extinction de l'expression de PRC (le PGC1-related coactivator, une protéine qui agit en tant que coactivateur lors de l'activation de la transcription de gènes impliqués dans la biogenèse des mitochondries). L'absence de ce facteur est responsable de l'apparition de mitochondries anormales (caractérisées par une désorganisation des crêtes mitochondriales) et une diminution de l'expression des gènes encodant les protéines

de la chaîne respiratoire (Vercauteren et al. 2009). Aussi, l'expression de *SETX* est diminuée dans des cellules traitées au pyruvate de sodium alors que ce dernier a pour conséquence d'augmenter la biogenèse des mitochondries (Wilson et al. 2007). Finalement, une diminution de l'expression de *SETX* est observée chez des souris dont les foies sont déficients en *Pdss2* (decaprenyl-diphosphate synthase subunit 2, une protéine impliquée dans le métabolisme du coenzyme Q). Ces souris présentent une déficience primaire en coenzyme Q, et donc, une fonction mitochondriale altérée (Peng et al. 2008).

En outre, il n'est pas rare que plusieurs hélicases nucléaires soient recrutées dans la mitochondrie pour y jouer différents rôles tels que la réparation et la réplication de l'ADN mitochondrial (ADNmt) (Ding & Liu 2015). Citons notamment RECQ4 (RecQ-like helicase 4), PIF1 (petite integration frequency 1), DNA2 (DNA replication helicase/nuclease 2), SUV3 (suppressor of var1 3-like protein 1) et FEN1 (Flap endonuclease 1) (Ding & Liu 2015; Liu et al. 2008). Toutes ces protéines possèdent des rôles à la fois dans le noyau et dans les mitochondries : par exemple, PIF1, une hélicase appartenant à la superfamille 1 (tout comme *SETX*) est impliquée, au niveau du noyau, dans le redémarrage de la réplication après des pauses de la fourche de réplication et dans le maintien de l'intégrité des télomères. Cette protéine joue aussi un rôle au niveau de la mitochondrie en contribuant à la réduction des cassures double-brins de l'ADNmt. Les mécanismes permettant à ces protéines d'être dirigées vers la mitochondrie et de réguler leur localisation sont divers. En effet, ces protéines peuvent par exemple posséder dans leur séquence un « mitochondrial targeting signal » (MTS) permettant leur translocation depuis le cytoplasme vers la mitochondrie (comme c'est le cas pour RECQ4 (De et al. 2012). Des interactions protéine-protéine peuvent aussi permettre une translocation vers la mitochondrie : par exemple l'interaction de RECQ4 avec p53 cache son signal de localisation nucléaire et lui permet d'être transloqué dans la mitochondrie (De et al. 2012). L'épissage alternatif de PIF1 permet la synthèse de deux isoformes différentes : l'isoforme α , qui se localise au niveau du noyau et l'isoforme β qui se localise dans la mitochondrie (Futami et al. 2007). La présence d'un site de traduction alternatif dans le gène codant pour la protéine FEN1 permet la traduction d'une forme dénommée FENMIT localisée dans la mitochondrie (Kazak et al. 2013). Ces exemples mettent en évidence le fait que des hélicases ayant des fonctions dans le noyau peuvent aussi être dirigées vers la mitochondrie, même si ces dernières ne possèdent pas de MTS (comme c'est le cas pour *SETX*).

Il existe des relations entre des dysfonctionnements mitochondriaux et d'autres formes d'ALS (qui partagent donc des symptômes typiques de cette famille de maladies). En effet, l'ALS1 par exemple, est causée dans 20% des cas par des mutations du gène codant pour la superoxyde dismutase 1 (*SOD1*) (Cudkowicz et al. 1997), et plusieurs études (Palomo & Manfredi 2015) démontrent un lien entre différentes mutations de cette protéine et des dysfonctionnements mitochondriaux. Par ailleurs, une étude a démontré qu'une mutation de *CHCHD10*, une protéine de fonction inconnue, était à l'origine d'une maladie complexe caractérisée par une démence fronto-temporale accompagnée d'une sclérose amyotrophique latérale (Bannwarth et al. 2014). Cette protéine est localisée dans l'espace inter-membranaire des mitochondries et est responsable, lorsqu'elle est mutée, d'une fragmentation du réseau mitochondrial et de problèmes de maintenance des crêtes mitochondriales.

De plus, une étude de l'interactome de *SETX* a mis en évidence plusieurs interactions entre cette protéine et des protéines localisées (au moins partiellement) dans la mitochondrie (Suraweera et al. 2009). Parmi celles-ci se trouvent : *SLC25A33* (solute carrier family 25,

member 33) une protéine capable de transporter des nucléotides vers/ depuis la mitochondrie (Di Noia et al. 2014). VDAC1 (voltage-dependent anion-selective channel protein 1), un transporteur ionique présent dans la membrane externe des mitochondries (Blachly-Dyson et al. 1993). CHCHD6, une sous unité du complexe MICOS qui est localisé dans les mitochondries et joue un rôle dans la morphologie des crêtes mitochondriales (An et al. 2012). rpS3 (ribosomal protein S3), une protéine qui fait partie de la sous-unité 40S du ribosome et qui peut être recrutée depuis le cytosol vers le noyau ou la mitochondrie pour jouer un rôle de réparation de l'ADN nucléaire ou mitochondrial, respectivement (Kim et al. 2013). LRP130 (leucine-rich PPR motif-containing protein), une protéine capable de se lier à l'ARN aussi bien dans la mitochondrie que dans le noyau (ou elle s'associe avec des ribonucléoprotéines pour participer à la maturation des ARNm) (Mili & Piñol-Roma 2003).

C'est en se basant sur toutes ces observations que nous avons décidé d'investiguer plus en profondeur la possibilité d'une localisation mitochondriale de SETX. Nous espérons donc que ce travail contribuera à découvrir de nouveaux indices permettant de mieux comprendre les mécanismes moléculaires conduisant au développement de l'ALS4 et de l'AOA2.

3. *Masparpine (SPG21)*

3.1. *Caractéristiques et fonctions de SPG21*

La masparpine (SPG21), également connue sous le nom de « acidic-cluster protein of 33kDa (ACP33), est une protéine de 33kDa composée de 308 acides aminés (Zeitlmann et al. 2001) fortement conservée au cours de l'évolution. Ainsi, des orthologues sont retrouvés dans la plupart des espèces animales (y compris les insectes), et même dans certaines espèces végétales (Soderblom et al. 2010; Chertemps et al. 2012; Liu et al. 2014). En outre, SPG21 est exprimée de façon ubiquitaire dans les tissus humains (Zeitlmann et al. 2001). Ces données suggèrent que les rôles de cette protéine sont fondamentaux dans les cellules.

La séquence de SPG21 contient un domaine présentant une homologie partielle avec la superfamille des α/β hydrolases (les protéines qui comportent ce domaine sont impliquées dans une large variété de fonctions) (Simpson et al. 2003). Le domaine α/β hydrolase de SPG21 contient un coude nucléophile accompagné d'un brin β parallèle. Une sérine habituellement retrouvée dans la séquence des domaines α/β hydrolase est également présente en position 109 (Ser109) mais la protéine ne contient pas la triade catalytique acide-base-nucléophile (dans laquelle on retrouve une histidine comme acide aminé basique) nécessaire à l'activité catalytique des α/β hydrolases. Ceci suggère que la protéine pourrait avoir perdu son activité catalytique au cours de l'évolution (Zeitlmann et al. 2001).

Le rôle exact de SPG21 dans les cellules n'est pas encore connu, mais toutefois, certaines hypothèses ont été émises à propos des fonctions potentielles de la protéine, principalement sur base des informations disponibles à propos des interactions de SPG21 avec d'autres protéines.

Dans les cellules HUT 78 (une lignée cellulaire humaine de lymphocytes T), une interaction entre SPG21 et CD4 (cluster of differentiation 4), une glycoprotéine localisée au

niveau de la membrane plasmique des lymphocytes T CD4+ impliquée dans la réponse immunitaire cellulaire, a été mise en évidence (Zeitlmann et al. 2001). La présence de la sérine 109 (qui, pour rappel, est un acide aminé important du domaine α/β -hydrolase) est indispensable à l'interaction entre les deux protéines. Il est proposé que le domaine α/β -hydrolase de SPG21 puisse avoir perdu sa fonction catalytique pour devenir un site d'interaction protéine-protéine. Lors de cette étude, il a aussi été suggéré que l'interaction entre SPG21 et CD4 pourrait permettre de réguler négativement la faculté de CD4 à activer les lymphocytes T. Néanmoins, le fait que SPG21 soit exprimée de façon ubiquitaire dans les cellules humaines (et donc, dans des cellules n'exprimant pas CD4) indique que la régulation de CD4 n'est vraisemblablement pas l'unique fonction endossée par cette protéine.

Une autre étude réalisée avec des souris knock-out pour SPG21 a mis en évidence une conséquence de l'absence de SPG21 dans les neurones (Soderblom et al. 2010). En effet, des neurones prélevés au niveau du cortex cérébral de ces souris présentent, une fois en culture, une augmentation du nombre de branches axonales qui n'est pas accompagnée d'une augmentation de la longueur de l'axone. Ensemble, ces résultats permettent de proposer que SPG21 fonctionne comme régulateur de récepteurs cellulaires (Soderblom et al. 2010).

Une autre protéine avec laquelle SPG21 interagit est l'aldéhyde déshydrogénase ALDH16A1 (Hanna & Blackstone 2009), mais les fonctions de cette dernière ne sont pas encore connues à ce jour, c'est pourquoi il est difficile d'émettre des hypothèses à propos d'un lien potentiel entre cette interaction et la fonction de SPG21. Il est cependant intéressant de noter que plusieurs enzymes de la famille des aldéhydes déshydrogénases sont impliquées dans des pathologies neurodégénératives : ALDH3A2 par exemple, est responsable, lorsqu'elle est mutée, du syndrome de Sjörger-Larsson, une maladie neuro-cutanée dont les symptômes sont un retard mental, une ichtyose congénitale (peau sèche et squameuse) et une diplégie spastique (paraplégie spastique des membres inférieurs) (Rizzo 2007).

Pour terminer, une interaction entre SPG21 et la GTPase Rab7 a également été démontrée (McCray et al. 2010). Les Rab GTPases sont des protéines qui jouent des rôles prépondérants dans le trafic des vésicules. En oscillant entre une forme inactive cytosolique (liée à une guanosine diphosphate, GDP) et une forme active (liée à une guanosine triphosphate, GTP), ces protéines sont capables de se lier aux membranes des vésicules et de recruter des protéines impliquées dans le transport et la fusion vésiculaire. La possibilité que SPG21 influence ces processus n'a pas été étudiée à ce jour.

3.2. Deux mutations dans le gène codant pour SPG21 causent une paraplégie spastique héréditaire (HSP)

Les HSP sont une large famille de pathologies neurodégénératives qui se caractérisent par deux symptômes communs : une faiblesse et une spasticité des membres inférieurs (Fink 2013). Ces symptômes communs sont toutefois présents dans chaque HSP avec des degrés, vitesses de progressions, et âges de déclaration variables. Cette classe de pathologie est divisée en deux types : les HSP pures et les HSP complexes. Les HSP complexes se distinguent des HSP pures par la présence de divers symptômes additionnels (épilepsie, amyotrophie, démences, ...) en plus de la paraplégie spastique des membres inférieurs (Harding 1983).

Chaque type d'HSP est lié à un gène particulier, ainsi de nombreux gènes nommés « SPG » (pour Spastic Paraplegia, ou Spastic Paraplegia Gene) causent plus de 50 formes différentes de HSP. Ces gènes sont impliqués dans des fonctions diverses (revues par (Fink 2013)) : le transport axonal, la morphologie du réticulum endoplasmique, les fonctions mitochondriales, la formation de la myéline, le repliement protéique et la réponse au stress du réticulum endoplasmique, le développement neurologique (notamment des faisceaux corticospinaux), le métabolisme des acides gras et des phospholipides et finalement, le trafic vésiculaire.

Initialement, une étude réalisée par Harold E. Cross en 1967 (Cross & McKusick 1967) avait décrit pour la première fois le syndrome de Mast chez une population d'Amish du vieil ordre (une communauté religieuse présente au Canada et aux USA). Ce syndrome, qui était présent à une fréquence élevée dans cette population (considérée comme génétiquement isolée) et qui présentait comme symptômes une paraplégie spastique des membres inférieurs associée à une démence ainsi que d'autres troubles du système nerveux central, a donc été considéré comme une forme complexe d'HSP. Il a ensuite été découvert que les patients décrits par Harold E. Cross étaient tous homozygotes pour une insertion d'une base dans le 7^{ème} exon du gène *SPG21* (Ins601A) dont la conséquence était un décalage du cadre de lecture entraînant une substitution des 12 acides aminés suivant la mutation, avec finalement l'apparition d'un codon « stop » prématuré dans l'ARNm codant pour la protéine. La protéine codée par le gène *SPG21*, initialement dénommée « acidic-cluster protein of 33kDa » (ACP33) par Zeitlman et al. en 2001, a donc hérité d'une seconde dénomination : Maspardin (MAst syndrome, Spastic Paraplegia, Autosomal Recessive with Dementia) (Simpson et al. 2003). Des observations similaires, mais caractérisées par un âge d'apparition des symptômes plus tardif ont été réalisées chez deux frères Japonais homozygotes pour une autre mutation dans *SPG21* : la mutation en question était une substitution faux-sens entraînant le remplacement d'une proline par une alanine en position 108 dans la protéine (A108P) (Ishiura et al. 2014).

Plus précisément, les symptômes cliniques présentés par les patients atteints du syndrome de Mast sont une faiblesse (paraplégie) et une hypertonie musculaire (spasticité) des membres inférieurs. Ces derniers sont parfois accompagnés d'un retard développemental (se traduisant par des difficultés motrices et de coordination), de démence (c'est-à-dire une détérioration des fonctions cognitives) et de signes extrapyramidaux et cérébelleux. L'âge auquel les symptômes apparaissent est très différent en fonction des individus : certains patients déclarent la maladie à la fin de l'enfance alors que d'autres ne la déclarent qu'à partir de la soixantaine (Simpson et al. 2003; Ishiura et al. 2014). Chez tous les patients, les symptômes sont très progressifs. Les résultats d'imagerie par résonance magnétique (IRM) réalisées sur les cerveaux des patients atteints du syndrome de Mast ont révélé un corps calleux mince, associé à une atrophie de la matière grise et à une démyélinisation de la matière blanche (Simpson et al. 2003).

Un modèle murin du syndrome de Mast existe également (Soderblom et al. 2010). La souris knock out pour *SPG21* présente des troubles progressifs des fonctions motrices (les membres postérieurs étant les plus affectés). Cependant, ce modèle ne présente pas toutes les caractéristiques du syndrome de Mast : plus particulièrement, aucun effet n'a été détecté au niveau de la matière blanche de ces souris.

	membrane plasmique	Noyau	Mitochondrie	Lysosome	Peroxisome	Cytosol	Réticulum endoplasmique	Appareil de Golgi	« Shift » après traitement au triton WR-1339
β -galactosidase	0	0	0	1	0	0	0	0	oui
α -glucosidase	0	0	0	0,079	0,006	0,013	0,896	0,006	non
Glutamate déshydrogénase	0	0	0,918	0	0	0	0,082	0	non
SPG21	0	0	0	0,417	0	0,583	0	0	oui

Table 3 : Probabilité de localisation de SETX et d'enzymes marqueurs dans une population d'organites subcellulaires (Jadot et Lobel, Données non publiées)

Les probabilités de localisation dans chacun des compartiments subcellulaires varient de 0 à 1. La dernière colonne indique si la protéine a « shifté » dans la fraction supérieure avec les lysosomes allégés (après traitement au triton WR-1339 lors d'une centrifugation des lysosomes dans un gradient de densité au sucrose.

3.3. Localisation intracellulaire de SPG21

La littérature indique que SPG21 a été détectée dans le cytosol ainsi qu'au niveau de membranes de structures intracellulaires (Zeitlmann et al. 2001; Hanna & Blackstone 2009). Plus précisément, par immunofluorescence, la distribution de SPG21 dans des cellules HeLa a été décrite comme diffuse à travers le cytosol, avec un enrichissement distinct au niveau de compartiments localisés dans la région péri-nucléaire. De plus, des colocalisations partielles avec LAMP-1 (un marqueur de la membrane des lysosomes et endosomes tardifs), la γ -adaptine (un marqueur des vésicules recouvertes de clathrine qui voyagent entre le *trans*-Golgi et les endosomes), CD63 (un marqueur des compartiments endosomaux tardifs) et avec le récepteur au mannose-6-phosphate (un récepteur qui transporte les hydrolase acides du *trans*-Golgi et de la membrane plasmique vers les endosomes) ont été détectées (Hanna & Blackstone 2009). Par contre, la colocalisation avec GM130 (Golgi Matrix Protein 130, un marqueur du *cis*-golgi) et EEA1 (Early endosome antigen 1, un marqueur des endosomes précoces) est plus limitée. Ces résultats suggèrent qu'une partie de la population des protéines SPG21 pourrait se localiser au niveau des lysosomes ou des endosomes tardifs.

En accord avec cette vision, notre étude de la localisation des protéines du foie de rat a révélé que SPG21 pourrait être localisée, en partie dans les lysosomes et en partie dans le cytosol. En effet, des probabilités d'association de 0,417 (au niveau des lysosomes) et de 0,583 (dans le cytosol) ont été calculées sur base de l'identification de 3 peptides et 6 spectres (table 3). La présence de SPG21 dans les lysosomes a également été confirmée par le fait que cette dernière est détectée au niveau de la fraction dans laquelle se retrouvent les lysosomes « allégés » après injection du rat au triton WR-1339. Plusieurs questions restent cependant ouvertes : SPG21 est-elle une protéine résidente des lysosomes, est-elle intra-lysosomale, est-elle recrutée sur la membrane de ces compartiments à partir du cytosol, est-elle détectée dans ces compartiments car elle y est dégradée, et quelle pourrait être sa fonction dans/sur les lysosomes?

3.4. SPG21, un acteur possible du trafic vésiculaire intracellulaire

Plusieurs voies de trafic vésiculaire assurent le transport de protéines dans les cellules (Trousdale & Kim 2015). Le trafic vésiculaire permet à ces protéines de rejoindre leur destination, et parfois d'être ensuite recyclées vers leur compartiment d'origine. Par exemple, certains récepteurs membranaires tels que le CI-MPR (récepteur au mannose-6-phosphate cation indépendant) et la sortiline sont envoyés, avec leurs cargos d'hydrolases acides, depuis le réseau *trans*-Golgi vers des endosomes précoces dans des vésicules recouvertes de clathrine (Kornfeld 1992; Seaman 2004). Le pH acide des endosomes leur permet ensuite de libérer leurs cargos d'hydrolases acides. Après cette étape, ces récepteurs sont recyclés vers le *trans*-Golgi, par une voie de transport qualifiée de rétrograde (Seaman 2004; Bonifacino & Hurley 2008; Trousdale & Kim 2015). Un système de recyclage similaire prend aussi place entre les endosomes et la membrane plasmique pour certains récepteurs, dont le CI-MPR. Le recyclage du CI-MPR et de la sortiline vers le *trans*-Golgi est exécuté par une machinerie protéique

appelée le complexe rétromère (Seaman et al. 1998). Plus précisément, le rétromère est un complexe composé de cinq protéines : SNX1/2, SNX5/6 (des Sorting Nexin Proteins) et VPS26, VPS29 et VPS35 (des Vacuolar-associated protein sorting proteins) (chez les mammifères) (Bonifacino & Hurley 2008). Un trimère constitué des trois protéines VPS constitue un complexe de reconnaissance (cargo recognition complex, CRC) des cargos tels que le CI-MPR et la sortiline, alors que des dimères de protéines SNX constituent des complexes de « tubulation » qui contrôlent le bourgeonnement de la membrane des endosomes. Les vésicules dérivées de ce processus de bourgeonnement sont ensuite envoyées vers le *trans*-Golgi.

Il est intéressant de noter que la queue cytosolique du CI-MPR contient un motif de trois acides aminés hydrophobes Tryptophane-Leucine-Méthionine (WLM) qui lui sert de motif de reconnaissance par le complexe rétromère. En effet, la substitution de ces trois acides aminés par trois alanines induit une perte d'interaction de la queue C-terminale du récepteur avec la protéine du complexe rétromère VPS26 (Seaman 2007). En conséquence, le trafic depuis les endosomes vers le *trans*-Golgi s'en trouve perturbé. De même, la sortiline possède un motif d'acides aminés hydrophobes Phénylalanine-Leucine-Valine (FLV) qui est lui aussi indispensable à son recyclage par le complexe rétromère. Ces données suggèrent que des motifs hydrophobes permettent l'interaction de ces protéines avec le complexe rétromère (Seaman 2007). Il se trouve que SPG21 possède justement, dans sa séquence protéique, un motif d'acides aminés hydrophobes WLM, précédé d'un quatrième acide aminé hydrophobe (F). La présence de ce motif, couplée à l'observation que SPG21 pourrait se localiser en partie dans le cytosol, et en partie au niveau du système endo/lysosomal, suggère que SPG21 pourrait être capable d'interagir avec le complexe rétromère, hypothétiquement, à la surface de certains compartiments endo/lysosomaux. L'interaction rapportée entre Rab7 (une protéine cytosolique recrutée sur les endosomes tardifs) et SPG21 pourrait constituer un autre argument en faveur de cette hypothèse. En effet, il a été décrit que Rab7 joue un rôle dans le recrutement du CRC (« cargo recognition complex » du rétromère) sur les membranes endosomales (McCray et al. 2010; Trousdale & Kim 2015). Si SPG21 s'avère capable d'interagir avec une sous-unité du complexe rétromère via son motif hydrophobe, il sera très intéressant de tester la possibilité que SPG21 puisse jouer un rôle dans le trafic rétrograde à partir du système endo/lysosomal.

Plusieurs protéines impliquées dans les HSP semblent exercer une fonction importante dans le trafic intracellulaire. Par exemple la strumpelline (SPG8) a été identifiée comme faisant partie du complexe WASH (Derivery & Gautreau 2010). Ce complexe a pour fonction de connecter les tubulations/vésicules qui bourgeonnent à partir des endosomes au cytosquelette via une interaction avec VPS35 (Harbour et al. 2010). SPG48 (KIAA0415) est une sous-unité de l'adaptor protein complex 5 (AP-5), un complexe détecté au niveau de la membrane des endosomes tardifs et lysosomes, et qui pourrait être impliqué dans le trafic vésiculaire de cargos depuis ces compartiments vers d'autres (Hirst et al. 2011). SPG11 (spatacsin) et SPG15 (spastizin) sont deux protéines dont les mutations causent des formes complexes de HSP qui présentent des symptômes communs avec le syndrome de Mast : un fin corps calleux, des atteintes de la matière blanche et des désordres cognitifs (Anheim et al. 2009; Goizet et al. 2009). Des mutations de ces deux protéines causent un élargissement des lysosomes (Renvoisé et al. 2014). Ce dernier pourrait être causé par un dysfonctionnement du trafic endolysosomal puisque SPG15 interagit avec AP-5 (Hirst et al. 2013). Par ailleurs, des mutations dans SPG15 causent également une augmentation du nombre d'autophagosomes, une hypothèse serait que cette protéine joue un rôle dans la maturation des autophagosomes en autolysosomes en

participant à la fusion des autophagosomes avec les lysosomes (Vantaggiato et al. 2013). Un autre exemple est la kinesin heavy chain 5A (KIF5A ou SPG10) : cette protéine intervient dans le processus de transport axonal antérograde des neurofilaments (Xia et al. 2003). Certaines mutations dans KIF5A ont pour conséquence de diminuer la vitesse avec laquelle elle transporte des cargos le long des microtubules, alors que d'autres mutations rendent la protéine incapable de se lier aux microtubules pour le transport des cargos (Ebbing et al. 2008). Ensemble, ces exemples démontrent un lien entre le trafic vésiculaire et différents types de HSP. Ceci suggère qu'il est possible que le syndrome de Mast soit également causé par des troubles de ce mécanisme cellulaire important.

La seconde partie de ce travail se base sur l'hypothèse selon laquelle SPG21 pourrait jouer un rôle dans le trafic rétrograde qui prend place à partir du système endo-lysosomal. Approfondir nos connaissances à propos du rôle de SPG21 dans ce mécanisme pourrait améliorer la compréhension de la pathogenèse du syndrome de Mast, et à plus large échelle, des HSPs. Il nous apparaît qu'un premier pas vers l'étude de la fonction de SPG21 et, plus particulièrement, de son rôle dans le transport vésiculaire impose une connaissance précise de la localisation et du trafic intracellulaire de cette protéine, ce qui constitue, avec l'étude de la localisation subcellulaire de la protéine SETX, les objectifs premiers de ce travail. Dans un second temps, nous souhaitons également observer les conséquences des mutations responsables de ces deux maladies, notamment au niveau de la localisation, et du trafic intracellulaire de SETX et SPG21.

Matériel et méthodes

SPG21_Fusion_F	5'-CAGTGTGGTGGAAATTCATGGGAGAGATTAAGTCTCT-3'
SPG21_Fusion_R	5'-GATATCTGCAGAATTCGTTTAAACCTTATCGTCGTCA-3'
SPG21_FWLM_F	5'-GCTGCGGCGGCGCCTGCATTTATGCTCAAAAAA-3'
SPG21_FWLM_R	5'-CGCCGCCGCAGCGCTGTTTGCAGTCCAAGTTTG-3'
SPG21_A108P_F	5'-TCTTTTGGCCCTTCTTTGG-3'
SPG21_A108P_R	5'-CCAAAGAAGGGCCAAAAAGA-3'

Table 4 : Amorces utilisées dans le cadre des constructions génétiques

1. Matériel

Les produits suivants (MG132, leupeptine, pepstatine, ammonium persulfate, TEMED, bromure d'éthidium, ampicilline), et les produits requis pour la préparation des solutions utilisées dans ce travail ont été achetés chez la firme Sigma. Les cocktails d'inhibiteurs de protéases proviennent de la firme Roche, et la solution de polyacrylamide, le marqueur de poids moléculaire chargé dans les gels de protéines, le réactif de Bradford, et le Tween-20 de la firme Bio-Rad. Les membranes de PVDF (polyfluorure de vinylidène) proviennent de chez Amersham/GE Healthcare, et les films d'autoradiographie de chez Thermo Fisher. L'agarose et le LB ont été commandés chez Roth. Les enzymes de restrictions, la T4 DNA ligase et la polymérase Q5 ont été obtenues de la firme NEB (tout comme leur tampon respectif), les DNTPs de la firme Eurogentec et les kits de midi-préparation et maxi-préparation d'ADN de la firme Qiagen. Les purifications d'ADN sur gel d'agarose et sur colonnes ont été réalisées grâce au kit Wizard de chez Promega. Le DMEM, la trypsine, la pénicilline et la streptomycine ont été achetés chez Lonza. Les amorces ont été commandées chez Eurogentec (table 4).

Les dosages d'activités enzymatiques ont été réalisés avec les substrats suivants : Thymidine 5'-monophosphate p-nitrophenyl ester, cytochrome C de cœur de cheval, 4-methylumbelliferyl- β -d-galactopyranoside, et 4-methylumbelliferyl- α -d-glucopyranoside (SIGMA). Le substrat H-ARG-ARG-AMC a été commandé chez Bachem.

Les anticorps monoclonaux de souris suivants ont été utilisés : anti-senataxine (ab56984, ABCAM), anti-GAPDH (G8795, Sigma), anti-histone H1 (MA5-1375, ThermoFisher Scientific), anti-myc (2276, Cell signaling), anti- α -tubuline (T5168, Sigma), anti-flag (Sigma), anti-MHC (SC-20641, Santa Cruz), anti-LAMP-1 (H4A3, DSHB) et anti-LAMP-2 (H4B4, DSHB). L'anticorps polyclonal anti-GRP75 (sc-1058 Santa Cruz) produit chez la chèvre, et les anticorps de lapin anti-myc (#2278 Myc-Tag (71D10), Cell Signaling), et anti-VPS26 (Ab181352, ABCAM) ont aussi été utilisés. Les anticorps de chèvre anti-souris couplés à la « horseradish peroxidase » (HRP) (P0447, Dako), anti-lapin couplés à la HRP (P0448, Dako), et les anticorps de lapin anti-chèvre couplés à la HRP (P0160, Dako) ont été sélectionnés pour les analyses par western blotting. Dans les expériences d'immunofluorescence, les anticorps de chèvres anti-souris et anti-lapin couplés à des molécules Alexa Fluor (488 ou 568, Molecular Probes) ainsi que le DAPI (Molecular Probes) ont été utilisés.

2. Méthodes

2.1. Constructions génétiques

Nous avons acheté un plasmide PCR-XL-TOPO contenant le cDNA de *SETX* (codant pour la forme humaine de 302kDa de *SETX*) (clone : IRCBp5005A2112Q, SOURCE BIOSCIENCES) et nous avons réalisé un sous-clonage directionnel de ce cDNA dans le vecteur pcDNA3.1(+) dans lequel un site de restriction *NheI* avait été inséré dans le site multiple de clonage (pcDNA3.1_SETX). Brièvement, nous avons linéarisé PCR-XL-TOPO en utilisant l'enzyme de restriction *NotI* pour y insérer un linker (à bouts collants *NotI*) contenant, en son

centre, un site de restriction *NheI*. Grâce à l'ajout de ce nouveau site de restriction, nous avons excisé le cDNA de *SETX* en clivant ce nouveau plasmide PCR-XL-TOPO par *KpnI* et *NheI* et l'avons purifié sur gel d'agarose. Le cDNA purifié a ensuite été ligué dans un vecteur pcDNA3.1(+) préalablement linéarisé par *KpnI* et *NheI* et purifié sur colonne. Après vérification de l'insertion de *SETX* dans pcDNA3.1 par digestion et séquençage, une midi-préparation d'ADN a été préparée.

Nous avons acheté un plasmide pCMV6 contenant le cDNA de *SPG21* (pCMV6_SPG21) (NM_016630, OriGene). Ce cDNA code pour la forme humaine de *SPG21* contenant un épitope myc et un épitope flag à l'extrémité C-terminale. Nous avons réalisé un sous-clonage de ce cDNA dans le vecteur pcDNA3.A(+) (pcDNA3.1_SPG21) par la méthode In-Fusion (CLONTECH), en suivant les instructions du fabricant. En bref, le cDNA a été amplifié par PCR à partir du plasmide pCMV6_SPG21 en utilisant des amorces spécifiques des extrémités de *SPG21* contenant également une partie « flottante » de séquence identique aux extrémités générées après restriction du plasmide pcDNA3.1(+) par l'enzyme *EcoRI* (SPG21_Fusion_F et SPG21_Fusion_R). Après avoir purifié ce produit PCR sur une colonne grâce au kit Wizard (PROMEGA) et avoir purifié le plasmide de destination (pcDNA3.1 linéarisé par *EcoRI*) par précipitation au phénol-chloroforme, nous avons inséré l'insert dans le plasmide grâce au kit de clonage In-Fusion. Ce dernier se base sur un mécanisme de fusion de l'insert avec le plasmide par hybridation des extrémités flottantes, indépendamment d'une réaction de ligation. Après vérification de l'insertion de *SPG21* dans pcDNA3.1 par digestion et séquençage, une midi-préparation d'ADN a été préparée.

Nous avons aussi inséré une mutation par triple PCR dans la construction pcDNA3.1_SPG21 afin de substituer le motif d'acides aminés FWLM par quatre alanines (pcDNA3.1_SPG21-FWLM/AAAA). Pour ce faire nous avons acheté deux nouvelles amorces contenant la séquence codant pour le motif AAAA à côté des séquences adjacentes à celles qui codent pour le motif FWLM dans *SPG21* (respectivement SPG21_FWLM_F et SPG21_FWLM_R). Nous avons réalisé une première PCR afin d'amplifier le brin sens de *SPG21*, grâce à l'utilisation des amorces SPG21_FWLM_R et SPG21_infusion_F, ce produit PCR contient le début du gène et se termine par la séquence codant pour le motif AAAA (et non pour le motif FWLM, au niveau duquel le bout flottant de l'amorce ne s'est pas hybridé). Une seconde PCR (utilisant les amorces SPG21_FWLM_F et SPG21_infusion_R) a permis de faire de même pour le brin antisens : le second produit PCR est donc constitué de la séquence antisens du motif AAAA suivie de la fin de la séquence antisens du gène *SPG21*. En « poolant » ces deux produits, les séquences complémentaires codant pour le motif AAAA se sont hybridées, ce qui a permis, après ajout des amorces SPG21_infusion_F et SPG21_infusion_R d'amplifier la version mutée du gène *SPG21*. Ce dernier a ensuite été inséré dans un vecteur pcDNA3.1, comme décrit ci-dessus.

De la même façon, nous avons muté pcDNA3.1_SPG21 afin de substituer le codon codant pour l'acide aminé A108 par un codon codant pour un acide aminé P (pcDNA3.1_SPG21-A108P).

2.2. Culture cellulaire et transfections

Les différents types cellulaires ont été cultivés dans du milieu DMEM supplémenté avec 10% de sérum fœtal de bovin et 100 µg/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycin.

La différenciation des cellules C2C12 a été induite en cultivant des cellules confluentes avec du milieu DMEM supplémenté avec 1% de sérum de cheval, 100 µg/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycin durant 48h. La différenciation des cellules N1E-115 a été induite en les cultivant durant 24h dans du milieu DMEM sans sérum.

Les cellules HeLa S3 ont été transfectées avec le réactif de transfection X-tremeGENE 9 (ROCHE). En pratique un mix contenant le réactif de transfection et l'ADN selon le ratio 3 :1 a été préparé dans du milieu DMEM (sans sérum ni antibiotiques). Après 15 minutes d'incubation à température ambiante, le mix a été ajouté, goutte à goutte, sur les cellules dont le milieu avait été remplacé préalablement. Il est à noter que lors de la transfection simultanée de dix pétris (pour le fractionnement subcellulaires), seulement trois mix correspondant chacun à des quantités nécessaires à la transfection d'un pétris (5 µg d'ADN et 15 µL de réactif de transfection) ont été préparés, « poolés » après les 15 min d'incubation et répartis sur l'ensemble des dix pétris. La transfection par phosphate de calcium a été réalisée en ajoutant 200µl goutte à goutte de mix de transfection sur les cellules (cultivées en puits de plaque 6 puits) après renouvellement de leur milieu. Le mix de transfection est réalisé en mélangeant 100µl de tampon HBS 2x (NaCl 274mM, Na₂HPO₄ 1,5mM, HEPES 55mM, pH 7,0) avec une même quantité d'une solution de CaCl₂ 244mM contenant 2µg d'ADN.

Lorsqu'indiqué, les cellules N1E-115 ont été traitées avec de la caféine 2mM (H.Lafleur) durant 24 heures. Les cellules HeLa quant à elles, ont été traitées, avec du MG132 5µM, un mixe Leupeptine 50 µM /Pepstatine A 50µM. Il est à noter que le MG132, la leupeptine et la pepstatine sont stockés dans du DMSO, c'est pourquoi des cellules contrôles ont simultanément été traitées avec une concentration similaire de DMSO. Ces traitements ont duré 16h.

2.3. Western blotting

Les tissus de souris et lysats cellulaires ont été préparés dans du PBS-triton X-100 1% supplémenté avec des inhibiteurs de protéases. Après 15 min d'incubation sur glace, 2x10 sec de sonication, et 10 minutes de centrifugation à 13000 x g à 4°C, les concentrations protéiques des surnageants ont été mesurées par dosage colorimétrique avec le réactif de Bradford. Des quantités équivalentes de protéines ont ensuite été mélangées avec du tampon de Laemmli 5X contenant 5mM de dithiothreitol, puis chauffées pendant 5 minutes à 95°C et séparées dans un gel de polyacrylamide-sodium dodécyl sulfate (6% pour la détection de SETX, 12% pour la détection de l'histone H1, GRP75, GAPDH et 10% pour la GAPDH, LAMP-2, VPS26, α-tubuline, et MHC). Après transfert des protéines sur une membrane de polyfluorure de vinyldène, celle-ci a été bloquée pendant 15 minutes (minimum) dans du PBS-Tween 0,1% contenant 10% de lait en poudre allégé, à température ambiante, avant d'être incubée avec les anticorps primaires (dilués 1/1000 dans du PBS-Tween 0,1% contenant 0,2% de lait en poudre allégé). L'incubation avec les anticorps secondaires couplés à la HRP (horse radish peroxidase)

dilués 3000x dans du PBS-Tween 0,1% contenant 0,2% de lait en poudre allégé a été réalisée durant 45 minutes à température ambiante. Les signaux ont ensuite été révélés par chimiluminescence (Western Lightning Plus-ECL, Perkin Elmer).

2.4. Fractionnement subcellulaire par centrifugation différentielle

Les fractionnements subcellulaires par centrifugation différentielles ont été effectués sur des cerveaux de souris C57Bl6, des cellules N1E-115 ou des cellules HeLa transfectées en suivant un protocole de centrifugation différentielle pratiquement similaire à celui décrit par de Duve et son équipe (Beaufay et al. 1964; de Duve et al. 1955). En bref, les cerveaux de souris ont été, après prélèvement, homogénéisés dans une solution de sucrose 0,25M par deux passages dans un Potter-Elvehjem. L'homogénéisation des cellules (après les avoir récoltées dans une solution de sucrose 0.25M) a été réalisée par plusieurs passages dans un homogénéisateur de type Dounce pour les N1E-115 ou dans un homogénéisateur de type Balch pour les cellules HeLa. Les homogénats (H) ont ensuite été centrifugés 10min à 1000xg à 4°C (dans une centrifugeuse Allegra X-30R, Beckman Coulter) afin de permettre la sédimentation de la fraction N1 (enrichie en noyaux). Le surnageant (E1, pour Extrait, ou PNS, pour post nuclear supernatant) a été décanté, et le culot N1 a été resuspendu (et éventuellement ré-homogénéisé dans le cas du cerveau de souris et des neurones N1E-115) dans une solution de sucrose 0,25M. La fraction N1 a ensuite été centrifugée dans des conditions similaires. Le surnageant E2 a été décanté et ajouté au surnageant E1 pour former la fraction E. Le culot N a été resuspendu dans du sucrose 0,25M. Après avoir prélevé un aliquot de la fraction E, cette dernière a été soumise à des centrifugations de forces centrifuges croissantes avec une centrifugeuse de type L7 (Beckman Coulter), dans un rotor 50 TI (Beckman Coulter). De façon séquentielle, les fractions M (mitochondries lourdes), L (mitochondries légères) et P (microsomes) ont été préparées respectivement grâce à des centrifugations de 8 000 rpm (ou 10 000 rpm dans le cas du fractionnement de cellules HeLa) pour M, 25 000 rpm pour L et 35 000 rpm pour P. La dernière centrifugation permet d'obtenir, en plus du culot P, la fraction S (soluble). Six fractions sont ainsi obtenues : la fraction N contient les noyaux et des débris cellulaires comme de grands fragments de membrane plasmique ainsi que des cellules entières qui n'auraient pas été homogénéisées. La fraction E contient toutes les particules qui n'ont pas sédimenté dans la fraction N. La fraction M contient les mitochondries, ainsi que des lysosomes et peroxysomes de grosse taille. La fraction L contient des lysosomes et peroxysomes. La fraction P contient les microsomes : l'appareil de Golgi, le réticulum endoplasmique ainsi que des fragments de la membrane plasmique de plus petite taille. Finalement, la fraction S est composée de toutes les particules qui n'ont pas pu sédimenter dans ces conditions expérimentales (comme les protéines solubles du cytosol).

2.5. Fractionnement subcellulaire par centrifugation dans des gradients de densité

Il est possible de séparer les organites qui sédimentent dans les fractions M et L sur base de leur densité en centrifugeant cette fraction dans un gradient de densité. Dans le cadre de ce travail, nous avons utilisé deux types de gradients différents : le gradient de sucrose et le gradient de Percoll.

Le gradient de sucrose utilisé ici est un gradient de densité linéaire (dont la densité varie de 1,09 à 1,26g/ml). En pratique, une fraction ML et une fraction P ont chacune été chargées délicatement sur le haut d'un gradient de sucrose préalablement formé dans le tube. Les gradients ont ensuite été centrifugés à 39 000 rpm durant une nuit à 4°C dans un rotor SW55TI afin de permettre à chaque organite de migrer vers sa densité d'équilibration dans le gradient (on parle de centrifugation isopycnique, beaufays 1964). Les gradients ont ensuite été découpés du haut vers le bas par des sections parallèles et équidistantes afin d'obtenir 11 fractions de densités croissantes. Les indices de réfractons de chaque fraction ont ensuite permis de calculer leur densité.

Le gradient de Percoll utilisé dans ce travail est un gradient isotonique non linéaire. En pratique, une solution (sucrose 0.25M, EDTA 2mM, tris HCl 10mM pH 7,4) contenant 18% de Percoll a été préparée. Une fraction ML a ensuite été délicatement chargée au-dessus de la solution de Percoll avant centrifugation pendant 45min à 25 000 rpm à 4°C dans un rotor SW55TI. A la différence du gradient de sucrose, le gradient de Percoll se forme de lui-même durant cette centrifugation. Ensuite, le gradient a été découpé en 7 fractions par des sections parallèles et équidistantes et l'indice de réfraction a été mesuré pour établir la densité de chacune des fractions. Pour les analyses en western blot, les billes de Percoll ont été éliminées par l'ajout de 1% de triton pour solubiliser les protéines, suivi d'une centrifugation à 70 000 rpm pendant 20min à 4°C dans le rotor TLA120.1. Le surnageant peut alors être analysé par western blot.

2.6. Dosages enzymatiques

La distribution d'enzymes marqueurs dans les fractions collectées lors des expériences de fractionnement subcellulaires a été établie par la mesure de leur activité enzymatique *in vitro*.

Cytochrome C oxydase

La cytochrome C oxydase (ou complexe IV), un marqueur mitochondrial, a été dosée en suivant l'oxydation du cytochrome C réduit. Les échantillons ont été dilués dans un tampon de dilution (1mM EDTA, 1mM tampon phosphate pH7,4, triton-X100 0,04%) et 50 µl d'échantillon ont été ajoutés à 1ml de solution contenant le substrat (EDTA 1mM, tampon phosphate 0,03M, pH7,4 $2,7 \times 10^{-4}$ g/ml cytochrome C réduit à 90% par du dithionite). L'absorbance a ensuite été mesurée à 590nm pendant 30 secondes grâce au programme UV WinLab. Le rapport entre le logarithme de l'absorbance du cytochrome C entre 0 et 30 secondes a été calculé pour chaque fraction comme mesure de l'activité enzymatique.

Phosphodiesterase alcaline

La phosphodiesterase alcaline, une enzyme de la membrane plasmique, a été dosée par colorimétrie. En pratique 20µl de fractions diluées dans de l'H₂O distillée ont été ajoutés à 230µl de solution de substrat (1,61M thymidine 5'-monophosphate p-nitrophenyl ester, 2,17mM

acétate de zinc, 23,6mM NaOH, glycine-NaOH 0,11M pH 9,6). La réaction a été stoppée (après 6 h pour les échantillons provenant de cellules, et après 30 min pour les échantillons de cerveau) par l'ajout de 1ml de 0,1M NaOH. La lecture de l'absorbance a ensuite été réalisée à 400nm.

β-galactosidase et α-glucosidase alcaline

Les dosages de la β-galactosidase (lysosome) et de l'α-glucosidase alcaline (reticulum endoplasmique) ont été réalisés en utilisant leurs substrats couplés au 4-méthylumbelliferyl (4-méthylumbelliferyl-β-d-galactopyranoside pour la β-galactosidase et 4-méthylumbelliferyl-α-d-glucopyranoside pour l'α-glucosidase alcaline). La libération du 4-méthylumbelliferyl sous l'action de l'enzyme a ensuite été détectée par fluorescence. Pour la β-galactosidase des échantillons de 10μl de chaque fraction (éventuellement diluée dans de l'H₂O distillée) ont été ajoutés à 90μl de solution contenant 1mM de substrat (pour les fractions issues de fractionnement d'organes) ou 5mM de substrat (pour les fractions issues de fractionnements de cellules) (la solution de substrat est composée de 50 mM de citrate, triton X-100 0.05%, pH4,5) avant d'être incubés à 37°C pendant une durée variant de 2 à 3 heures.

Pour l'α-glucosidase des échantillons de 10μl de chaque fraction diluée dans l'H₂O distillée ont été ajoutés à 90μl d'une solution 0.1M glycine NaOH pH9.0, Triton-X100 0,005% contenant 1mM de substrat avant d'être incubée à 37°C pendant une durée variant de 2 à 3,5 heures. Les réactions ont ensuite été stoppées par l'ajout de 1,2ml de glycine-NaOH pH10,4 avant lecture de la fluorescence à 495nm.

Dipeptidyl peptidase 3

Le dosage de la dipeptidyl peptidase 3 est réalisé en utilisant un dipeptide couplé à l'aminométhylcoumarin (H-arg-arg-7-amido-4-méthylcoumarin). L'enzyme est capable d'hydrolyser le dipeptide, et de libérer l'aminométhylcoumarin, qui sera détecté par fluorescence. En pratique 50μl d'échantillon sont ajoutés à 150μl de solution de substrat 1,13mM (composée de Tris-HCl 0,17M pH8) et incubée pendant 2 à 4h. La réaction est ensuite stoppée par l'ajout de 1,2ml de glycine-NaOH pH10,4 avant lecture de la fluorescence à 495nm.

2.7. Immunofluorescence

Les cellules HeLa S3 ont été cultivées et transfectées sur des lamelles de verres (disposées dans des puits de plaques 12 puits). 48h après la transfection, les cellules ont été lavées avec du PBS avant fixation avec une solution de méthanol/acétone (80/20%, refroidie à -80°C) durant 20min à -20°C. Les cellules ont ensuite été lavées, et perméabilisées par une solution de PBS saponine 0,05% pendant 10min à température ambiante. Après lavage, les cellules ont été incubées avec une solution de PBS-BSA1% pendant 10min à température ambiante. Elles ont ensuite été incubées avec les anticorps primaires (dilués 1 :100 à 1 :200)

dans une chambre humide durant 45min à température ambiante, avant d'être lavées et incubées de façon similaire avec les anticorps secondaires couplés à des fluorochromes (dilués 1 :250). Finalement, les lamelles ont été lavées et incubées pendant 30min en présence de DAPI pour marquer les noyaux avant d'être montées sur des lames avec du Mowiol (Calbiochem). La révélation des signaux a été réalisée par microscopie confocale à fluorescence, avec un microscope Leica et un objectif 63x.

2.8. Co-immunoprécipitation

Des billes de protéine G agarose (Pierce) ont été préalablement lavées deux fois avec un tampon « d'immunoprécipitation » (tampon IP) (Tris-base 0.1M, NaCl 0.15M, TritonX-100 1%, pH7,4), par centrifugation à 8000 rpm dans une centrifugeuse de table Eppendorf réfrigérée. Les billes ont ensuite été incubées avec 0.5 µg d'anticorps anti-myc de souris pendant 2h à 4°C. Les lysats de cellules HeLa S3 (préalablement transfectées ou non) ont été préparés dans du tampon IP contenant des inhibiteurs de protéases (incubés 15 min sur glace puis centrifugés pendant 10 minutes à 13000 x g à 4°C). Les concentrations protéiques des lysats ont été mesurées par dosage colorimétrique avec le réactif de Bradford. Au terme de leur incubation avec l'anticorps, les billes ont été lavées deux fois avec le tampon d'IP tel que décrit ci-dessus, et des quantités similaires de protéines (environ 500-1000 µg) ont été incubées avec ces billes durant une nuit sous agitation à 4°C. Ensuite, les billes ont été lavées cinq fois (comme décrit ci-dessus) et les protéines précipitées ont été éluées dans du tampon de Laemmli (contenant du DTT). Les protéines LAMP-1 et VPS26 ont ensuite été analysées par western blot comme décrit ci-dessus, et SPG21 a été détectée en utilisant un anticorps anti-myc de lapin.

Résultats

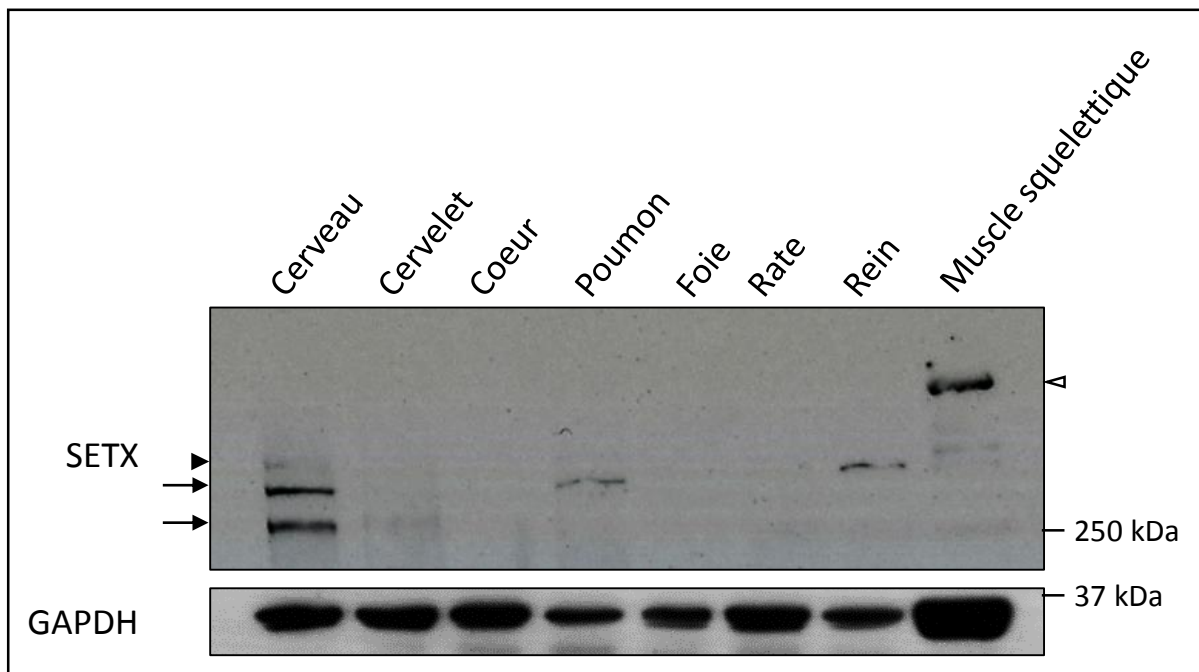


Figure 6 : Détection de SETX par western blotting dans divers organes de souris

Des lysats d'organes de souris ont été préparés dans du PBS-triton 1% contenant des inhibiteurs de protéases et des quantités égales de protéines ont été chargées et séparées dans un gel d'acrylamide. SETX a ensuite été détectée avec un anticorps commercial. La détection de la GAPDH a été utilisée comme contrôle de charge. Les deux flèches (à gauche) indiquent les deux bandes de masses moléculaires de ~250 et ~300kDa qui correspondent aux deux isoformes de SETX décrites chez la souris. La tête de flèche pleine (à gauche) indique une bande additionnelle de ~300kDa. La tête de flèche vide (à droite) indique une bande de masse moléculaire plus élevée détectée dans le muscle squelettique.

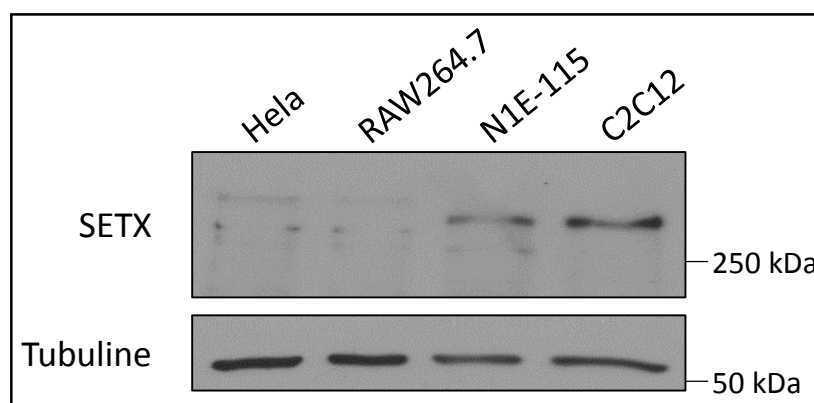


Figure 7 : Détection de SETX par western blotting dans diverses lignées cellulaires.

Après lyse des cellules (HeLa, RAW264.7, N1E-115 et C2C12) dans du PBS-triton 1% contenant des inhibiteurs de protéases, des quantités égales de protéines ont été chargées et séparées dans un gel d'acrylamide. SETX a ensuite été détectée par western blotting, ainsi que la tubuline comme contrôle de charge.

1. Etude de la localisation subcellulaire de la protéine Senataxine (SETX)

1.1. Distribution tissulaire de SETX

Trois isoformes de la Senataxine humaine sont actuellement décrites, leurs masses moléculaires théoriques étant de 302kDa, 299kDa et 306kDa. Quant à la Senataxine de souris, deux isoformes de 297kDa et 253kDa sont respectivement documentées. Afin de déterminer la distribution tissulaire de SETX, nous avons détecté sa présence dans différents lysats d'organes de souris (cerveau, cervelet, cœur, poumon, foie, rate, reins et muscle squelettique) par western blot (figure 6). Après détection de SETX par un anticorps commercial, deux bandes majeures de ~250kDa et approximativement 300kDa ont été visualisées dans le cerveau de souris, en accord avec les masses moléculaires attendues des deux isoformes décrites chez la souris (voir flèches). La bande de ~300kDa a aussi été détectée, avec une intensité plus faible, dans les lysats de poumon et de rein. De plus, une bande de masse moléculaire légèrement plus élevée (approximativement 350kDa) a été détectée dans le lysat de cerveau et, très faiblement, dans le lysat de muscle squelettique (voir tête de flèche pleine à gauche de la figure 6). Pour terminer, une bande de masse moléculaire beaucoup plus élevée a aussi été détectée dans le muscle (voir tête de flèche vide à droite de la figure 6). Il est intéressant de noter que la banque de données « Human Protein Atlas » (<http://www.proteinatlas.org/>) montre que les niveaux d'expression de SETX détectés par immunohistochimie dans différents tissus humains reflètent principalement la distribution tissulaire que nous avons observée sur les lysats d'organes de souris par western blot. En effet, cet outil décrit la présence de SETX dans le cerveau, le poumon, le rein, le cœur et le muscle squelettique alors qu'aucun signal n'est détecté dans le foie et la rate. A l'exception du cœur, ces résultats sont concordants avec nos observations, et suggèrent que les bandes observées ici représentent bien la protéine d'intérêt.

Nous avons ensuite analysé l'expression de SETX par western blot dans plusieurs lignées cellulaires : les HeLa (des cellules de type épithéliale provenant d'un adénocarcinome de col de l'utérus humain), les RAW264.7 (des cellules de type monocyte/macrophage leucémique de souris), les N1E-115 (une lignée cellulaire neuroblastique issue d'un neuroblastome de souris) et C2C12 (une lignée cellulaire myoblastique murine) (figure 7). Un signal a été détecté vers 300kDa dans les lysats de N1E-115 et C2C12 et une bande additionnelle, de masse moléculaire légèrement inférieure a aussi été détectée dans les N1E-115. Seules deux bandes de très faible intensité ont pu être visualisées dans les cellules HeLa et RAW264.7. Ensemble, ces données suggèrent que SETX est plus fortement exprimée dans les cellules dérivées du cerveau et des muscles squelettiques, des observations qui confirment les résultats obtenus sur les organes de souris.

Les cellules neuroblastiques N1E-115 présentent, à l'état basal, une morphologie relativement arrondie (figure 8A). Lorsque soumises à une privation de sérum, ou à une dépolarisation de la membrane, ces cellules s'aplatissent et développent des prolongements neuritiques (Oh et al. 2005) (figure 8A). De même, les cellules myoblastiques C2C12 peuvent être différenciées en myocytes, de grandes structures fusiformes multinucléées (Burattini et al. 2004) (figure 8A). Nous nous sommes demandé si l'expression de SETX dans les cellules pouvait varier lors de la différenciation de ces deux types cellulaires. Nous avons donc analysé des lysats de N1E-115 et C2C12 non différenciées et différenciées par western blotting. Un contrôle de la différenciation des cellules C2C12 en myocyte a aussi été réalisé en détectant la

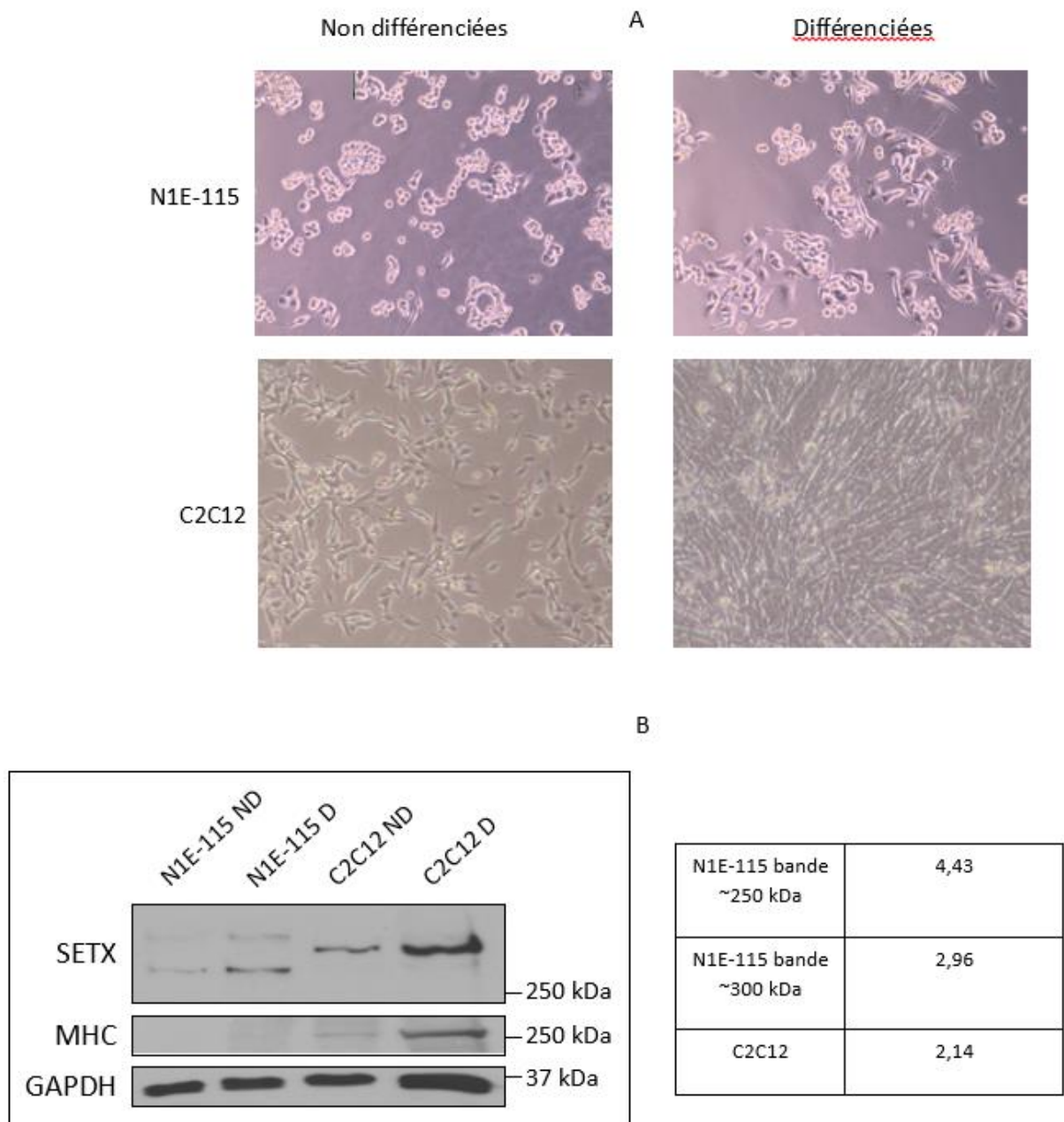
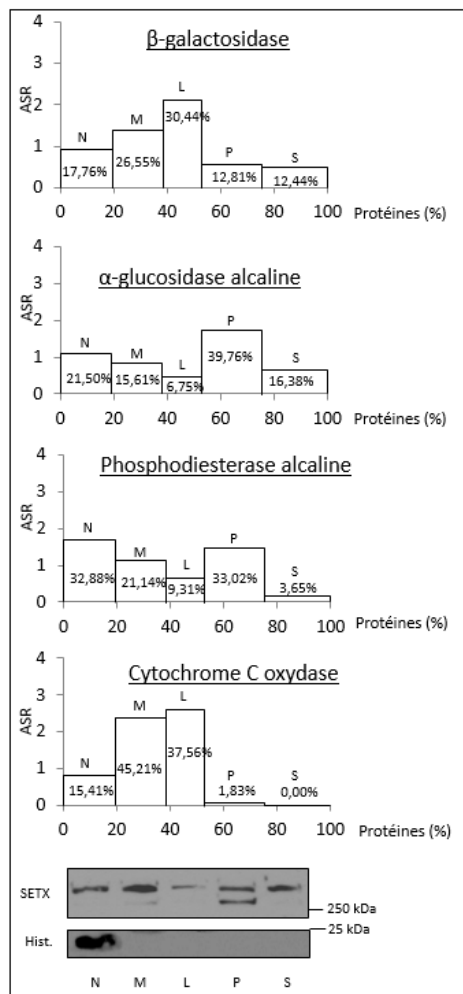


Figure 8 : Détection de SETX par western blotting dans les cellules N1E-115 et C2C12 différenciées et non différenciées.

(A) Des images de microscopie à contraste de phase montrent, à gauche, des cellules N1E-115 non différenciées, avec une morphologie relativement arrondie, et des cellules différenciées qui ont développé des prolongements neuritiques. À droite les images montrent des cellules C2C12 non différenciées (des cellules fusiformes mononucléées) et différenciées (grandes structures fusiformes multinucléées). (B) SETX a été détecté par western blotting dans les cellules non différenciées et différenciées, tel que décrit à la figure 2. La GAPDH a été utilisée comme contrôle de charge et la détection de la MHC (myosin heavy chain) comme contrôle de la différenciation des cellules C2C12. Les bandes détectées préalablement ont été quantifiées avant et après différenciation par le programme ImageJ et les intensités relatives des signaux dans les cellules différenciées par rapport aux cellules non différenciées sont présentées dans un tableau.



% de signal de SETX dans chaque fraction (sur base du WB) (bande de 250kDa)

N	1,93
M	10,22
L	1,34
P	82,21
S	4,30

% de signal de SETX dans chaque fraction (sur base du WB) (bande de ~300kDa)

N	21,00
M	31,45
L	4,23
P	17,87
S	25,45

Figure 9 : Fractionnement subcellulaire du cerveau de souris par centrifugation différentielle..

Du tissu de cerveau de souris (sans cervelet ni médulla oblongata) a été fractionné en cinq fractions : N (nucléaire), M (mitochondriale lourde), L (mitochondriale légère), P (microsomale) et S (soluble). Plusieurs enzymes marqueurs ont été dosées en utilisant des substrats fluorescents : β -galactosidase (lysosomes), α -glucosidase alcaline (réticulum endoplasmique), ou des substrats colorimétriques : phosphodiesterase alcaline (membrane plasmique) et Cytochrome C oxydase (mitochondrie). Les graphiques représentent, pour chaque enzyme, l'activité spécifique relative (ASR) en fonction du pourcentage cumulé de protéine dans les fractions. L'ASR correspond au rapport entre le pourcentage d'activité détectée dans une fraction et le pourcentage de protéine détectée dans cette fraction, elle témoigne donc de l'enrichissement de cette enzyme dans la fraction. La surface de chaque bâtonnet représente le pourcentage d'activité détecté dans chaque fraction. SETX et l'histone H1 (marqueur du noyau) ont été détectées par western blotting, après avoir chargé et séparé des quantités similaires de protéines dans un gel d'acrylamide. Les pourcentage de chaque bande détectée pour SETX dans chaque fraction ont été quantifiés sur base du western blot grâce au programme ImageJ et ont été rassemblés dans les tableaux présentés à la droite des graphiques.

protéine MHC (myosin heavy chain), un marqueur de cellule musculaire différenciée (figure 8B). Ces analyses ont révélé que l'intensité des deux bandes détectées pour SETX dans les N1E-115 augmente légèrement au cours de leur différenciation (~3x et ~4x pour les bandes inférieures et supérieures, respectivement). Dans les C2C12, l'intensité de la bande détectée augmente de ~2x après différenciation. Ces estimations ont été réalisées à partir des westerns blots grâce au programme ImageJ : en pratique, les intensités des signaux détectés avant et après différenciation ont été mesurées et normalisées par rapport au contrôle de charge GAPDH avant d'être comparées ensemble. Les résultats de cette analyse semi-quantitative indiquent que l'expression de SETX est plus élevée dans les neurones et cellules musculaires que dans leurs précurseurs non différenciés.

1.2. Localisation subcellulaire de SETX dans le cerveau de souris

SETX est décrite comme une protéine localisée au niveau du cytoplasme et du noyau (Chen et al. 2006) mais, comme mentionné dans l'introduction, plusieurs indices permettent d'envisager qu'elle soit également localisée au niveau de la mitochondrie. Afin de tester cette hypothèse, nous avons sélectionné le cerveau de souris, un organe dans lequel des intensités satisfaisantes de SETX sont détectées par western blot (figure 6), pour réaliser une étude précise de la localisation intracellulaire de SETX.

1.2.1. Fractionnement subcellulaire du cerveau de souris par centrifugation différentielle

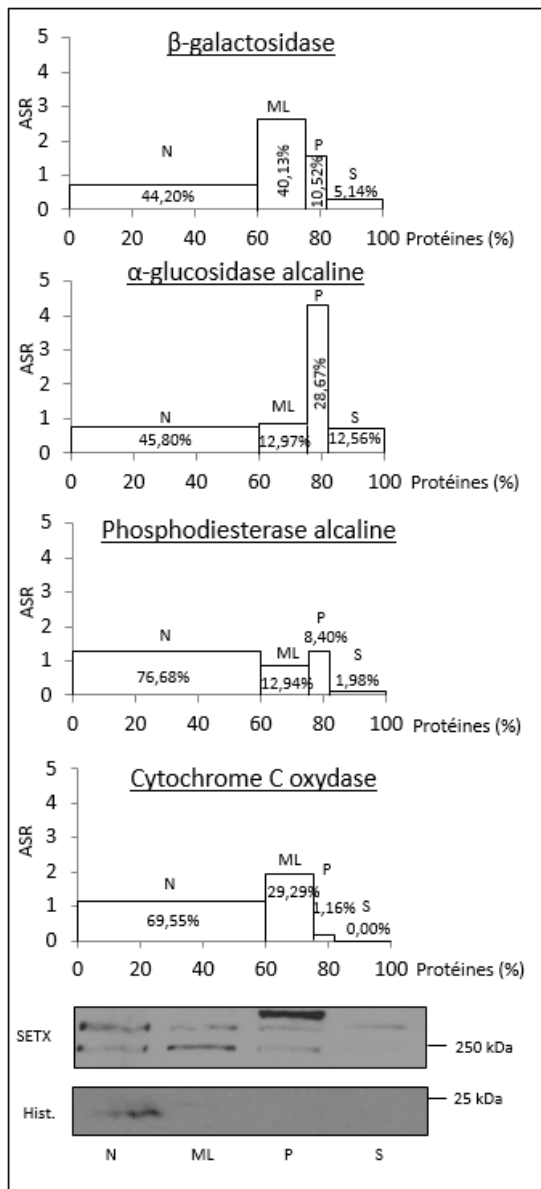
Tout d'abord, nous avons utilisé une approche de fractionnement subcellulaire par centrifugation différentielle (de Duve et al. 1955) (figure 9) : nous avons préparé un homogénat de cerveau de souris, et l'avons centrifugé avec une faible force centrifuge pour séparer la fraction N (fraction nucléaire) de la fraction E (extrait). La fraction E a ensuite été soumise à des forces centrifuges croissantes afin d'obtenir les fractions M (fraction mitochondriale lourde), L (fraction mitochondriale légère), P (fraction microsomale) et S (fraction soluble). La distribution des organites au sein des différentes fractions a été établie grâce à la détection par western blot ou par dosage enzymatique de protéines ou enzymes marqueurs de ces organites. Par western blot, ont été détectées l'histone H1 (une protéine marqueur du noyau) ainsi que SETX, en chargeant des quantités égales de protéines pour chaque fraction de sorte que le signal détecté soit représentatif de l'enrichissement de ces protéines au sein des différentes fractions. Afin d'obtenir des données semi-quantitative, il est également possible de calculer, à partir des signaux détectés en western blot, les quantités relatives de ces protéines dans chacune des fractions (en tenant compte du volume chargé et de la dilution de chaque fraction). Les marqueurs enzymatiques qui ont été dosés sont la β -galactosidase (une hydrolase lysosomale), l' α -glucosidase alcaline (une hydrolase du réticulum endoplasmique), la phosphodiesterase alcaline (une enzyme présente dans la membrane plasmique) ainsi que la cytochrome C oxydase (une enzyme mitochondriale). Les données issues de ces dosages ont été représentées sous forme d'un graphique dans lequel l'activité spécifique relative de l'enzyme ou ASR (c'est-à-dire le rapport entre son activité relative et la quantité relative de protéine détectées dans la fraction) est placée en ordonnée. L'ASR (la hauteur du bâtonnet) représente donc

l'enrichissement relatif de l'enzyme dans la fraction. En abscisse, se trouve la distribution relative des protéines au sein des fractions. Ainsi, l'aire de chaque bâtonnet représente l'activité relative de l'enzyme détectée dans chaque fraction (en % par rapport à l'activité totale présente dans l'homogénat). Il est à noter que la validité de chaque profil de distribution a été vérifiée par le calcul de la récupération : en pratique, l'activité ou le signal total détecté dans l'homogénat (soit la somme des activités ou signaux détectés dans les fractions E et N) doit être équivalent à la somme des activités ou signaux détectés dans toutes les fractions (soit les fractions N, M, L, P, S).

Les dosages enzymatiques et western blot qui ont été réalisés après fractionnement subcellulaire de cerveau de souris indiquent que la β -galactosidase (lysosome), l' α -glucosidase alcaline (reticulum endoplasmique), et l'histone H1 (noyau) sont respectivement plus enrichies dans les fractions L (avec 30% de l'activité totale dans cette fraction), P (avec 39% de l'activité totale dans cette fraction) et N (Figure 9). La phosphodiesterase alcaline (membrane plasmique) est quant à elle enrichie de façon similaire dans les fractions N et P (qui représentent ensemble approximativement 60% de l'activité totale). Finalement, la cytochrome C oxydase (mitochondrie) est enrichie de façon similaire dans les fractions M et L (dans lesquelles 80% de l'activité totale est détectée). Le western blot réalisé afin de détecter SETX indique que les deux bandes visualisées dans le cerveau présentent une distribution différente. La bande de ~250kDa est fortement enrichie dans la fraction P (dans laquelle 80% de la population totale de cette forme se retrouve). De toutes les enzymes marqueurs, l' α -glucosidase alcaline est celle qui présente l'enrichissement le plus élevé dans la fraction P, suggérant qu'une partie de la population des protéines SETX pourrait se localiser dans le réticulum endoplasmique. Cependant, à ce stade, nous ne pouvons exclure la possibilité que cette forme de SETX s'associe avec d'autres types de vésicules de petites tailles qui sédimenteraient dans la fraction P, tels que des endosomes ou des fragments de l'appareil de Golgi. La bande de ~300kDa, quant à elle, est détectée dans toutes les fractions, avec un léger enrichissement dans la fraction M (dans laquelle 30% de la population totale de cette forme se trouve). Etant donné que ce profil ne rappelle aucun des profils observés pour les protéines marqueurs, il est difficile de déduire la localisation précise de cette forme sur base de ces résultats. Il est possible que cette forme de SETX se distribue dans plusieurs organites subcellulaires, donnant lieu à un profil de distribution « mixte ». Alternativement, SETX pourrait être localisée au niveau d'organites qui n'ont pas été dosés ici. Le fait qu'aucune des bandes de SETX ne codistribue parfaitement avec l'histone H1 ou la cytochrome C oxydase, suggère que SETX n'a ni une localisation nucléaire exclusive, ni une localisation mitochondriale principale.

1.2.2. Fractionnement subcellulaire du cerveau de souris par centrifugation isopycnique

Pour tenter d'obtenir plus d'information sur la localisation intracellulaire de SETX, nous avons essayé d'améliorer la séparation et l'enrichissement des organites en ajoutant une étape de centrifugation dans un gradient de densité (centrifugation isopycnique). Dans cette expérience, la première étape de centrifugation différentielle est semblable à celle qui est décrite ci-dessus, à la différence près que la centrifugation permettant la sédimentation de la fraction M n'a pas été réalisée. De cette façon, les organites de la fraction M et L ont été



% de signal de SETX dans chaque fraction (sur base du WB) (bande de ~350kDa)

N	0,00
ML	0,00
P	100,00
S	0,00

% de signal de SETX dans chaque fraction (sur base du WB) (bande de ~300kDa)

N	85,42
ML	6,71
P	2,22
S	5,65

% de signal de SETX dans chaque fraction (sur base du WB) (bande de 250kDa)

N	66,60
ML	27,34
P	3,52
S	2,53

Figure 10 : Préparation de fractions ML et P à partir de cerveaux de souris par centrifugation différentielle.

Des cerveaux de souris (avec cervelets et médulla oblongatas) ont été homogénéisés et fractionnés en 4 fractions : N (nucléaire), ML (mitochondriale lourde + légère), P (microsomale) et S (soluble). Le profil de distribution des lysosomes (β -galactosidase), du réticulum endoplasmique (α -glucosidase alcaline), de la membrane plasmique (phosphodiesterase alcaline) et des mitochondries (cytochrome C oxydase) ont ensuite été établis tel que décrit dans la figure 4. SETX et l'histone H1 (un marqueur du noyau) ont été détectées par western blotting (en chargeant des quantités égales de protéines). Les pourcentage de chaque bande détectée pour SETX dans chaque fraction ont été quantifiés sur base du western blot grâce au programme ImageJ et reportés dans les tableaux présentés à droite des graphiques.

sédimentés ensemble lors de la centrifugation suivante. Les fractions « ML » et P ainsi préparées ont ensuite été chargées sur le haut de gradients linéaires de densité de sucrose (dont la densité variait de 1,09 à 1,26g/ml). Après centrifugation, les deux gradients ont chacun été découpés en 11 fractions (grâce à des sections parallèles et équidistantes). Les dosages enzymatiques et western blot ont été réalisés tel que décrit ci-dessus sur les fractions E, N, ML, P, S (figure 10) ainsi que sur les 11 fractions du gradient sur lequel la fraction ML avait été chargée, et sur les 11 fractions du gradient qui avait été chargé avec la fraction P (Figure 6). Il est à noter que le dosage de la cytochrome C oxydase n'a pas été réalisé sur les 11 fractions du gradient P, étant donné que l'activité de cette enzyme dans la fraction P de départ était très faible.

Bien que plusieurs différences soient observées par rapport à l'expérience décrite ci-dessus (la quantité relative de protéines totales présente dans la fraction N est nettement plus élevée et le western blot réalisé pour détecter SETX révèle une bande additionnelle de ~350kDa dans la fraction P) (figure 10 vs figure 9), nous avons obtenus des distributions d'enzymes et protéines marqueurs parmi les fractions E, N, ML, P et S (figure 10) semblables aux distributions précédemment établies (figure 9). La β -galactosidase et la cytochrome C oxydase se sont retrouvées enrichies dans la fraction ML, l' α -glucosidase alcaline dans la fraction P, l'histone H1 dans la fraction N, tandis que la distribution de la phosphodiesterase alcaline s'est étalée dans les fractions N, ML et P (sans enrichissement majeur dans aucune de ces fractions). Les changements observés par rapport à l'expérience précédente pourraient être expliqués par le fait que trois cerveaux complets de souris, comprenant les cervelets et médullas oblongatas, ont été utilisés dans cette expérience (figure 10), alors que ces deux parties avaient été exclues dans l'expérience rapportée en figure 9.

La détection de SETX par western blot dans les fractions N, ML, P et S a montré que la bande de ~250kDa est détectée dans toutes fractions, avec un léger enrichissement dans la fraction ML, dans laquelle la β -galactosidase et la cytochrome C oxydase sont également enrichies. Les quantifications indiquent que plus de 60% de la quantité totale de protéine SETX de ~250kDa se retrouve dans la fraction N, alors que ~25% de la quantité totale a sédimenté dans la fraction ML. La bande de ~300kDa, quant à elle, est présente de façon prédominante dans la fraction N (en effet, plus de 80% de la quantité totale de protéine de cette bande se retrouve dans cette fraction). Finalement, la bande de ~350kDa est uniquement détectée dans la fraction P.

Après centrifugation de la fraction ML dans le gradient de sucrose (figure 11A), les distributions des lysosomes (β -galactosidase) et du réticulum endoplasmique (α -glucosidase alcaline) se centrent sur une densité de 1,169g/mL, alors que la distribution des mitochondries (cytochrome C oxydase) se centre sur une densité de 1,188g/mL. La distribution de la phosphodiesterase alcaline est plus étalée dans les fractions comprises entre 1,096 et 1,169g/mL. Les deux bandes de SETX à ~250kDa et ~300kDa sont détectées dans 4 fractions comprises entre 1,117 et 1,169g/mL, ce qui constitue un chevauchement partiel entre le profil de ces bandes et celui de tous les marqueurs enzymatiques dosés. Aucune codistribution parfaite n'est observée, il est donc difficile d'attribuer une localisation précise à ces deux formes de SETX dans cette expérience. La bande de ~350kDa, quant à elle, se concentre dans la fraction de densité 1,169g/mL, soit la fraction où sont en majorité détectés l' α -glucosidase et la β -galactosidase. Couplé à l'observation selon laquelle le profil de distribution de cette bande ressemblait à celui de l' α -glucosidase lors de l'expérience de centrifugation différentielle

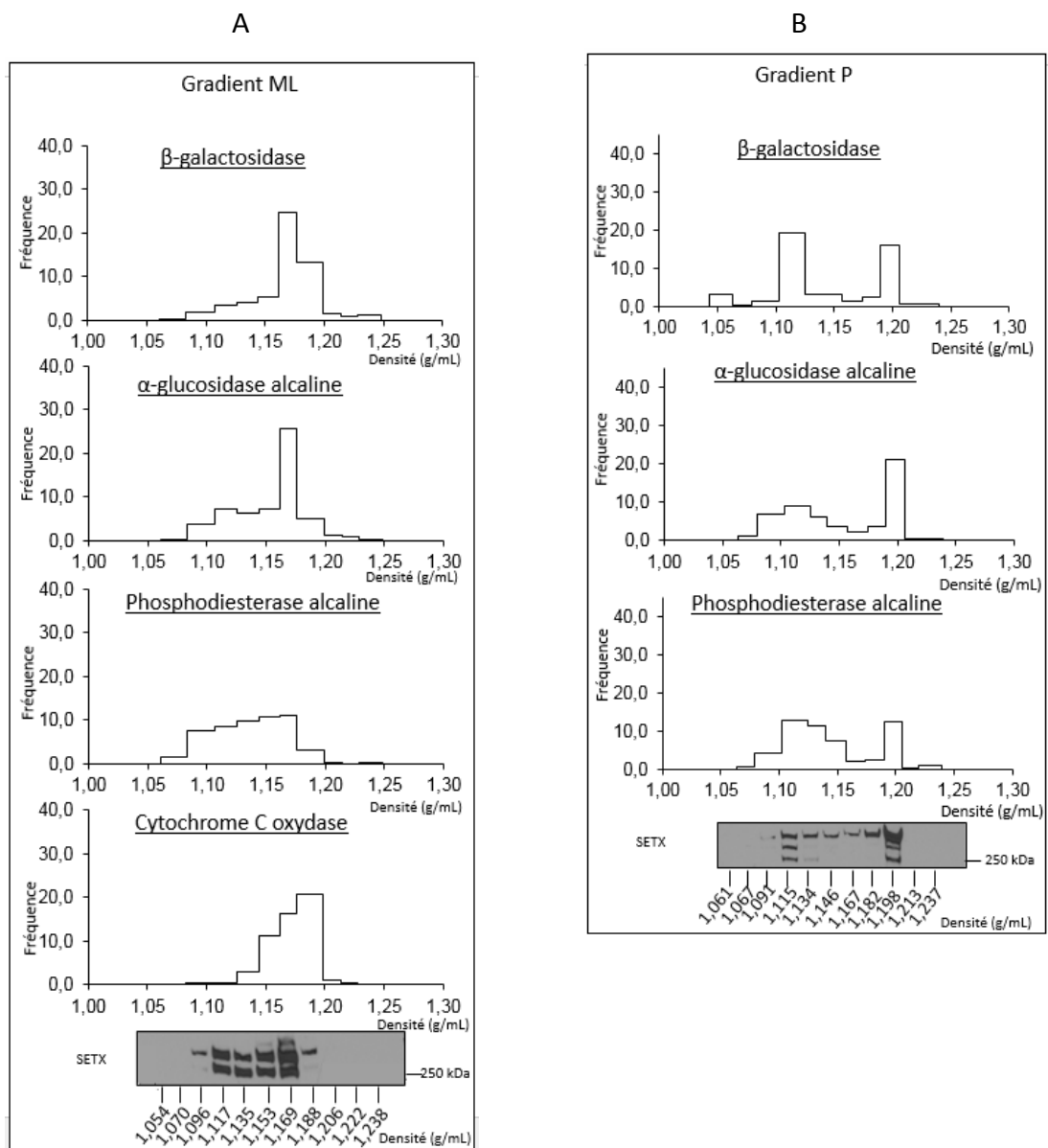
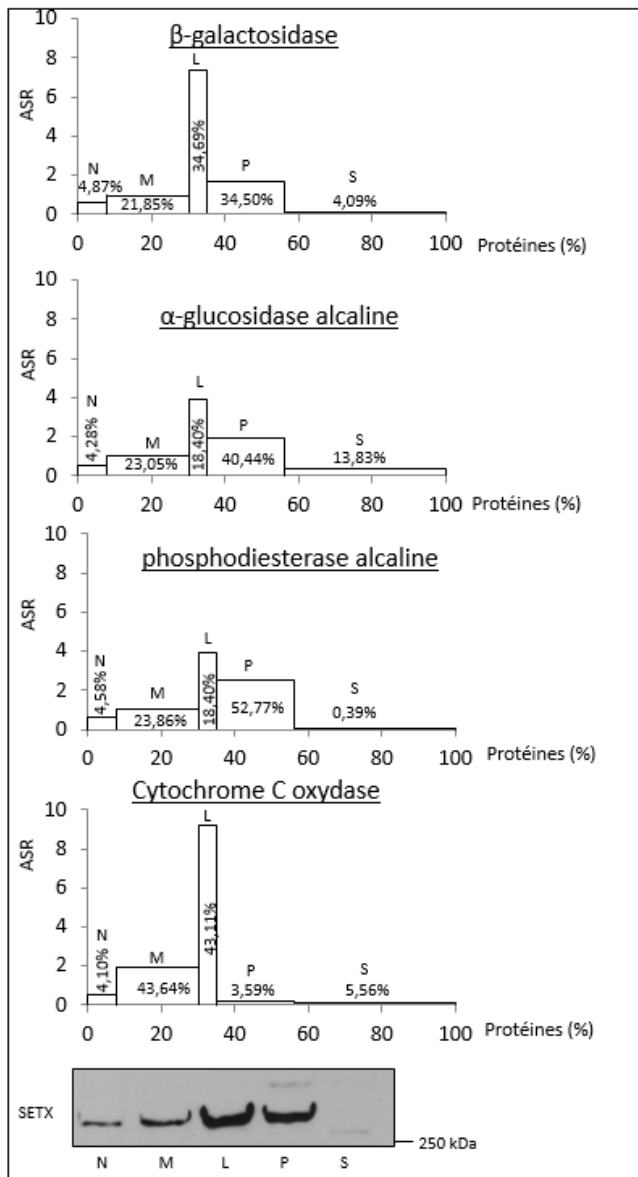


Figure 11 : Fractionnement subcellulaire du cerveau de souris par centrifugation isopycnique.

Les fractions ML (A) et P (B) préparées dans le fractionnement subcellulaire décrit à la figure 5 ont été chargées sur le haut d'un gradient linéaire continu de densité réalisé avec du sucrose (dont la densité varie de 1.09 à 1.26g/ml), et centrifugées pendant une nuit à 39 000 rpm à 4°C dans un rotor SW55ti. Des sections parallèles et équidistantes ont permis de découper le gradient en 11 fractions dans lesquelles SETX et les activités des enzymes marqueurs ont été détectées (comme décrits dans la figure 4). Les histogrammes représentent la fréquence (le pourcentage d'activité normalisé par rapport à l'incrément de densité de chaque fraction) en fonction de la densité de chaque fraction.



% de signal de SETX
dans chaque fraction
(sur base du WB)
(bande de 250kDa)

N	4,67
M	28,38
L	15,71
P	51,24
S	0

% de signal de SETX
dans chaque fraction
(sur base du WB)
(bande de ~300kDa)

N	0,00
M	0,00
L	0,00
P	100,00
S	0

Figure 12 : Fractionnement subcellulaire de cellules N1E-115 par centrifugation différentielle

Les homogénats cellulaires ont été fractionnés en cinq fractions (N, M, L, P, S) (comme décrit à la figure 4). Les graphiques montrent la distribution des marqueurs lysosomiaux (β -galactosidase), du reticulum endoplasmique (α -glucosidase alcaline), de la membrane plasmique (phosphodiesterase alcaline) et des mitochondries (cytochrome C oxydase). SETX a été détectée par western blotting, après avoir chargé et séparé des quantités égales de protéines dans un gel d'acrylamide. Les pourcentages de chaque bande détectée pour SETX dans chaque fraction ont été quantifiés sur base du western blot grâce au programme ImageJ. Les résultats de ces quantifications sont présentés sous forme de tableaux à droite des graphiques.

(enrichissement dans la fraction P, figure 10), ce résultat indique que la bande de ~350kDa pourrait être caractérisée par une localisation microsomale.

Dans le gradient de densité chargé avec la fraction P (figure 11B), les enzymes marqueurs présentent des profils de distribution relativement semblables : ils sont détectés avec plus d'intensité dans deux fractions de densité 1,115 et 1,198g/mL. Une distribution similaire à ces marqueurs est observée pour les deux bandes de SETX de ~250kDa et ~300kDa. La bande de ~350kDa est également détectée dans les deux fractions de densité 1,115 et 1,198g/mL (avec une intensité plus élevée dans cette dernière) mais elle est aussi détectée dans les fractions de densité comprise entre 1,115 et 1,198g/mL. Etant donné que tous les profils de distribution obtenus sont relativement semblables, il n'est pas possible de déterminer la localisation subcellulaire des bandes observées sur base de cette expérience.

En conclusion, le fractionnement du cerveau de souris dans un gradient de sucrose n'a pas permis d'améliorer la résolution des profils de distributions des marqueurs enzymatiques. Ainsi, l'ajout de cette étape de centrifugation isopycnique n'a pas permis d'apporter des informations additionnelles quant à la localisation des bandes de ~250kDa et ~300kDa de SETX dans cet organe. Néanmoins, les similitudes entre les profils de distribution de la bande de ~350kDa de SETX et de l' α -glucosidase alcaline aussi bien dans les expériences de centrifugation différentielle que dans celles de centrifugation isopycnique, supportent l'hypothèse d'une localisation microsomale de cette bande (avec la possibilité que cette forme soit localisée, partiellement, au niveau du réticulum endoplasmique).

1.3. Localisation subcellulaire de SETX dans les cellules N1E-115

Un paramètre qui pourrait contribuer à la faible séparation des profils de distribution des organites (et de SETX) dans le cerveau de souris pourrait être l'hétérogénéité cellulaire de cet organe. En effet, si la localisation de SETX était différente en fonction du type cellulaire, réaliser un fractionnement d'organe complet pourrait donner lieu à l'établissement d'un profil de distribution mixte de cette protéine. Nous avons donc décidé d'étudier la localisation subcellulaire de SETX par une méthode similaire de fractionnement subcellulaire, mais appliquée à un type cellulaire spécifique, afin de diminuer l'hétérogénéité de l'échantillon qui subissait le fractionnement et ainsi de réduire les chances d'observer un profil de distribution mixte de la protéine d'intérêt. La lignée cellulaire que nous avons sélectionnée dans ce but est la lignée de N1E-115 dans laquelle deux bandes de 300-350kDa étaient détectées pour SETX (figure 7).

Dans cette expérience, le protocole de fractionnement par centrifugation différentielle appliqué aux cellules N1E-115 a donné lieu, après dosage enzymatique, à des profils de distribution relativement similaires pour la β -galactosidase, l' α -glucosidase alcaline et la phosphodiesterase alcaline (avec une majorité d'activité détectée dans les fractions M, L et P). Tous ces marqueurs présentent un enrichissement élevé dans la fraction L, accompagné d'un enrichissement plus faible dans la fraction P (figure 12). La cytochrome C oxydase présente également un fort enrichissement dans la fraction L ainsi qu'un enrichissement légèrement plus élevé dans la fraction M par rapport aux autres marqueurs. Quant au western blot de SETX, la bande majoritairement détectée (de masse moléculaire de ~250kDa) présente un enrichissement

dans les fractions L et P, (avec une majorité de signal dans les fractions M, L et P) ce qui correspond au profil de distribution des marqueurs des lysosomes, du réticulum endoplasmique et de la membrane plasmique. La bande supérieure d'approximativement 300kDa est, quant à elle, très faiblement détectée dans la fraction P uniquement, un profil de distribution qui ne ressemble à aucun des marqueurs dosés. Ces résultats ne nous permettent pas de déterminer précisément dans quels organites la protéine se localise.

Pour rappel, SETX est décrit dans la littérature comme étant une protéine partiellement nucléaire. Afin de déterminer si les signaux détectés par western blot dans les fractions N des différents fractionnements subcellulaires que nous avons réalisés étaient la conséquence de la présence de la protéine dans le noyau, nous avons réalisé le test suivant : des fractions N et PNS (post nuclear supernatant, soit l'ensemble des constituants cellulaires restant en suspension après la centrifugation nécessaire à la formation du culot de N) ont été préparées à partir de cellules N1E-115 traitées, ou non traitées à la caféine. Pour rappel, il a été décrit que la caféine (un inhibiteur de la protéine ATM) réduit le nombre d'agrégats nucléaires de SETX détecté dans des cellules en phase G1 et S/G2 (Yüce & West 2013). Nous avons donc voulu tester si le traitement des N1E-115 par la caféine pouvait réduire la quantité de signal détectée pour SETX au niveau d'une fraction nucléaire préparée à partir de N1E-115 et, en contrepartie, augmenter sa présence dans le PNS. Pour se faire, des quantités égales de protéines issues des deux fractions ont été chargées sur un gel afin de détecter SETX par western blot. Plusieurs marqueurs spécifiques d'organites ont également été détectés : l'histone H1 pour le noyau, la 75kDa glucose-regulated protein (GRP-75, une « heat shock protein » (Lee 2014)) pour la mitochondrie, ainsi que la glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) comme marqueur cytosolique (résultats non présentés). Cependant, la détection de la GRP-75 et de la GAPDH avec des intensités équivalentes dans les fractions N et PNS a révélé que le fractionnement ne permettait pas de séparer correctement les noyaux du reste de l'homogénat lorsqu'il était appliqué aux cellules N1E-115. C'est pourquoi cette expérience n'a pas été poursuivie.

En conclusion, par plusieurs approches de fractionnement subcellulaires, nous n'avons pas pu assigner de localisation précise aux deux bandes de ~250kDa et ~300kDa détectées pour SETX. Ces deux bandes ne semblent pas présenter de localisation mitochondriale ou nucléaire claire. Néanmoins, nous ne pouvons pas exclure que la protéine soit présente dans ces fractions. La bande de ~350kDa quant à elle, semble présenter une distribution microsomale. Ceci pourrait indiquer que la protéine soit localisée dans le réticulum endoplasmique ou bien dans d'autres organites habituellement sédimentés avec ce dernier (comme des endosomes, ou l'appareil de Golgi).

1.4. Surexpression de SETX dans des cellules HeLa

Etant donné que les fractionnements subcellulaires se sont avérés peu concluants, nous avons décidé de réaliser une construction génétique permettant de surexprimer SETX dans les cellules HeLa, un type cellulaire auquel notre protocole de fractionnement subcellulaire est mieux adapté. Nous avons acheté un plasmide de transport PCR-XL-TOPO contenant le cDNA de SETX (ce cDNA code pour la forme humaine de 302kDa de SETX). Un « linker » contenant un site de restriction spécifique à ensuite été inséré dans cette construction afin de nous

permettre de réaliser un clonage directionnel du cDNA dans un plasmide d'expression pour cellule mammifères pcDNA3.1(+). Cependant, après transfections des cellules HeLa avec le réactif de transfection commercial X-tremeGENE 9 nous n'avons pas pu détecter la protéine par western blot grâce à notre anticorps anti-SETX. Sachant que le réactif de transfection X-tremeGENE 9 est un agent de transfection chimique composé d'un mélange de lipides non liposomaux, nous avons également réalisé un test de transfection avec une méthode différente : le phosphate de calcium, un autre agent chimique de transfection basé sur la formation d'un précipité contenant du phosphate de calcium et de l'ADN sur la surface des cellules (Kingston et al. 2003). Cette méthode ne nous a pas non plus permis d'observer une surexpression de la protéine.

2. *Etude de la localisation subcellulaire de la protéine maspardine (SPG21)*

2.1. *Analyse de la localisation de SPG21 par immunofluorescence et fractionnement subcellulaire dans des cellules HeLa transfectées*

Pour rappel, nous avons sélectionné SPG21 comme candidat d'étude car, dans le travail réalisé par notre laboratoire et celui du Docteur Lobel, cette protéine présente une probabilité de localisation élevée à la fois dans le lysosome et dans le cytosol, et parce qu'elle constitue un nouveau candidat intéressant potentiellement impliqué dans le trafic vésiculaire vers/ou à partir des endo/lysosomes. Afin d'élucider la fonction précise de SPG21, nous avons sélectionné un modèle cellulaire, les cellules HeLa, dans lesquelles nous avons surexprimé cette protéine fusionnée à deux tags (myc et flag). Nous avons ensuite analysé la localisation de la protéine par diverses méthodes.

2.1.1. *Construction d'un vecteur d'expression de SPG21*

Nous avons acheté un plasmide d'expression pCMV6 (pour cellules de mammifères) dans lequel est inséré le cDNA de la forme humaine de SPG21 (pCMV6_SPG21). Un épitope myc et un épitope flag sont fusionnés au niveau de l'extrémité C-terminale de la protéine. Afin de faciliter de futures manipulations de mutagenèse, nous avons sous-cloné la phase ouverte de lecture dans le plasmide pcDNA3.1(+) (pcDNA_SPG21) grâce au kit « In-Fusion ».

Les deux constructions, ainsi qu'un vecteur pcDNA3.1 vide ont chacune été transfectées dans des cellules HeLa avec le réactif de transfection X-tremeGENE 9. 48 heures après la transfection, les cellules ont été lysées et des quantités égales de protéines ont été chargées et séparées dans un gel avant d'être transférées sur une membrane de polyfluorure de vinylidène (PVDF). SPG21 a ensuite été détectée en utilisant des anticorps anti-myc (préparés chez la souris ou le lapin), et un anticorps anti-flag de souris. La tubuline a également été détectée comme contrôle de charge (figure 13). Cette expérience a révélé une absence de signal dans les cellules transfectées avec le vecteur vide, alors que les anticorps anti-myc et anti-flag détectent une bande dans les cellules transfectées avec pCMV6_SPG21 et pcDNA_SPG21. La protéine ainsi détectée est caractérisée par une masse moléculaire légèrement inférieure à 37kDa, ce qui correspond à la masse attendue de SPG21 (33kDa). Ces résultats indiquent que

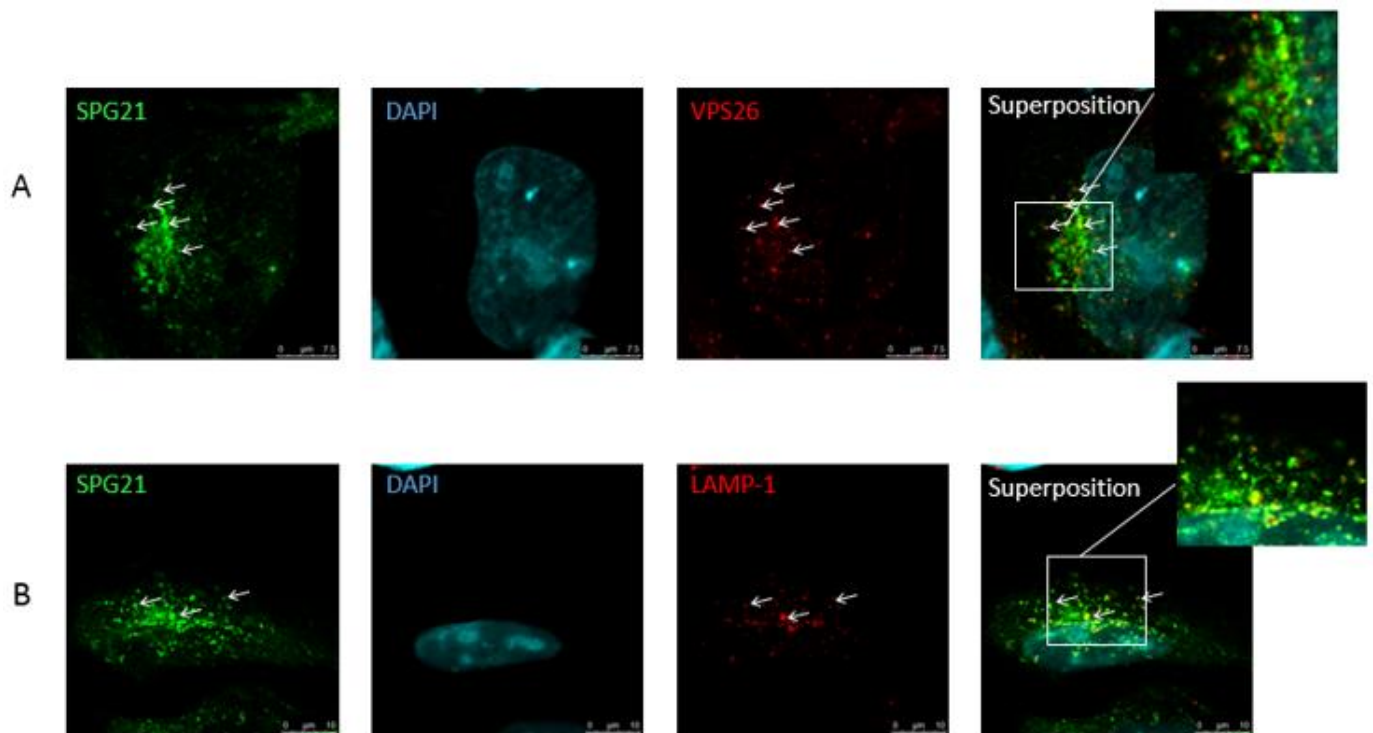


Figure 14 : Détection par immunofluorescence de SPG21, VPS26 et LAMP-1 dans des cellules HeLa transfectées avec SPG21.

Des cellules HeLa ont été transfectées avec pcDNA3.1_SPG21 pendant 48h avant d'être fixées et perméabilisées. Les noyaux ont été mis en évidence par le DAPI (en bleu). (A) SPG21 a été détecté avec un anticorps anti-myc de souris (en vert) et VPS26 (un marqueur des endosomes dans les cellules HeLa) avec un anticorps de lapin (en rouge). (B) LAMP-1 (une protéine marqueur des membranes des endosomes tardifs et lysosomes) a été détecté avec un anticorps de souris (en rouge) et SPG21 avec un anti-myc de lapin (en vert).

les deux constructions permettent bien de surexprimer la protéine d'intérêt, bien que cette expression soit plus élevée avec le plasmide pCMV6 par rapport au pcDNA3.1 (une séquence légèrement différente du promoteur CMV pourrait expliquer cette différence).

2.1.2. SPG21 colocalise partiellement avec LAMP-1 (un marqueur de la membrane des endosomes tardifs et lysosomes) et VPS26 (un marqueur du complexe rétromère)

Nous avons d'abord utilisé une approche morphologique pour obtenir des informations sur la localisation subcellulaire de SPG21 dans les cellules HeLa : l'immunofluorescence. En pratique, des cellules HeLa ont été transfectées par la construction pcDNA_SPG21 et fixées, 48 heures plus tard, de sorte que la protéine ait eu le temps d'être correctement exprimée et ciblée vers sa destination de résidence dans la cellule. Après perméabilisation, les cellules ont été incubées avec les anticorps primaires et secondaires, et leur noyau ont été marqués par le DAPI.

La détection de SPG21 par un anticorps anti-myc de souris (en vert) (figure 14A) a révélé qu'approximativement 40% de cellules avaient été transfectées. Dans ces cellules, un signal diffus dans le cytosol est observé, en accord avec la localisation prédite de SPG21 dans cet espace. Des signaux ponctuels sont aussi détectés dans la région périnucléaire. Ces derniers pourraient témoigner de la localisation de SPG21 sur/dans des organites subcellulaires. Enfin, de faibles quantités de SPG21 sont observées dans les noyaux. Le fait qu'une distribution identique est observée avec un anticorps anti-myc de lapin (figure 14B) suggère que ces signaux sont spécifiques de la détection de la protéine SPG21. Afin d'identifier les compartiments intracellulaires dans/sur lesquels SPG21 pourrait se localiser, nous avons aussi utilisé des anticorps pour détecter les marqueurs suivants : VPS26 (vacuolar protein sorting-associated protein 26) et LAMP-1 (lysosome-associated membrane protein 1). VPS26 est un composant du complexe rétromère qui est localisé au niveau des endosomes et du *trans*-Golgi. Toutefois, des résultats produits par C. Staudt dans notre laboratoire indiquent que VPS26 se localise majoritairement au niveau des endosomes dans les cellules HeLa. En effet, cette protéine n'est que très peu localisée dans le *trans*-Golgi dans ces cellules (communication personnelle). Nous avons donc utilisé cette protéine comme marqueur des endosomes. LAMP-1 (en rouge dans la figure 14B) quant à elle, est une protéine localisée dans la membrane des endosomes tardifs et des lysosomes. VPS26 (en rouge, figure 14A) est détecté sous forme de signaux ponctuels présents dans l'ensemble du cytoplasme de la cellule (quelques petits signaux ponctuels sont également détectés dans le noyau). Lorsque ce signal est superposé avec celui qui est issu de SPG21, nous observons que plusieurs signaux ponctuels issus des deux protéines colocalisent (voir flèches, figure 14). Concernant LAMP-1, plusieurs signaux ponctuels principalement localisés à côté du noyau sont visualisés. Lorsque les signaux de SPG21 et de LAMP-1 sont fusionnés, nous observons une colocalisation partielle de ces deux protéines. Ensemble, ces résultats suggèrent que SPG21 se localise en partie sur/dans des endosomes et/ou lysosomes.

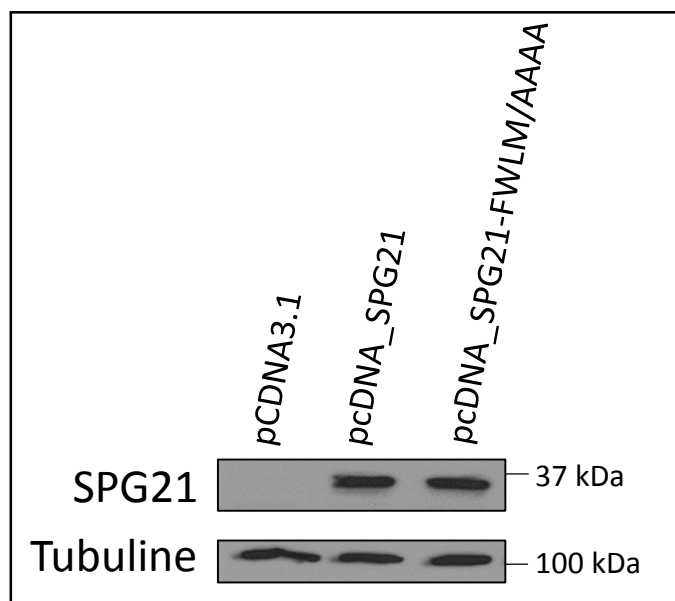


Figure 15 : Détection de SPG21 sauvage et de SPG21-FWLM/AAAA par western blotting dans des cellules HeLa S3 transfectées.

Des cellules HeLa transfectées avec pcDNA3.1 vide, pcDNA3.1_SPG21 ou pcDNA3.1_SPG21-FWLM/AAAA ont été lysées et des quantités équivalentes de protéines ont été chargées et séparées dans un gel d'acrylamide. SPG21 a été détectée par western blotting avec un anticorps anti-myc et la détection de la tubuline a été réalisée comme contrôle de charge.

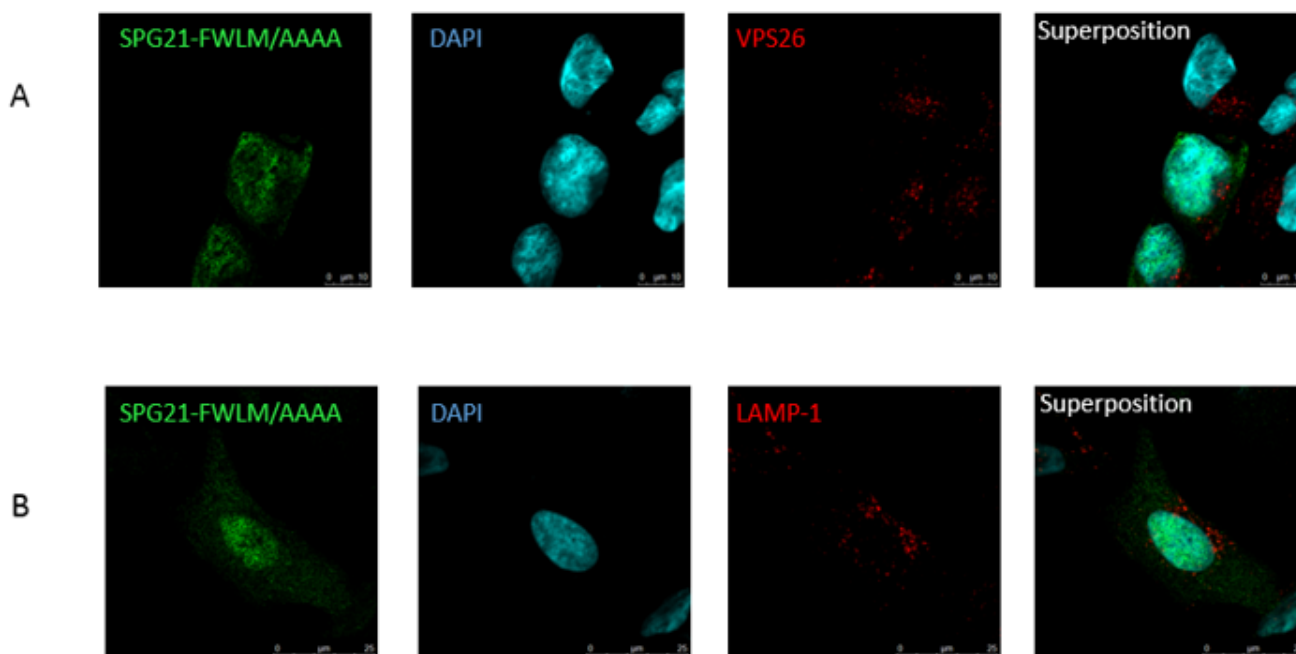


Figure 16 : Détection par immunofluorescence de SPG21-FWLM/AAAA, VPS26 et LAMP-1 dans des cellules HeLa transfectées.

Des cellules HeLa ont été transfectées avec pcDNA3.1_SPG21-FWLM/AAAA pendant 48h avant d'être fixées et perméabilisées. Les protéines SPG21, VPS26 et LAMP-1 ont ensuite été détectées tel que décrit à la figure 9. Les noyaux ont été mis en évidence par le DAPI (en bleu).

2.1.3. Effet de la mutation FWLM/AAAA sur la localisation subcellulaire de SPG21

Les résultats d'immunofluorescence permettent d'émettre l'hypothèse que SPG21 soit localisée (partiellement) soit à l'intérieur des endosomes et lysosomes, soit recrutées sur ceux-ci à partir du cytosol (où la protéine est aussi détectée). La présence, dans la séquence de SPG21, d'un motif de quatre acides aminés hydrophobes « FWLM » (Phénylalanine-Tryptophane-Leucine-Méthionine) pourrait supporter cette deuxième hypothèse. En effet, des motifs hydrophobes très similaires ont été découverts dans les parties cytosoliques de deux protéines (le récepteur au mannose-6-phosphate, CI-MPR et la sortiline). Ceux-ci leur permettent de s'associer au complexe rétromère et, en conséquence, de sortir des endosomes dans de petites vésicules. De façon similaire, le motif FWLM de SPG21 pourrait lui servir de point d'ancrage au complexe rétromère à la surface des endo/lysosomes. Afin de tester cette hypothèse, nous avons réalisé une mutation du motif FWLM pour voir si cela pouvait influencer la localisation de la protéine.

Pour ce faire, nous avons réalisé une nouvelle construction pcDNA_SPG21-FWLM/AAAA sur base de notre plasmide pcDNA_SPG21 wild-type (WT) par triple PCR afin de remplacer le motif FWLM par quatre alanines (AAAA) dans la protéine SPG21. Afin de vérifier que l'introduction de cette mutation ne produisait pas une protéine instable (caractérisée par une dégradation prématurée), des cellules HeLa ont tout d'abord été transfectées avec nos constructions pcDNA_SPG21 WT, pcDNA_SPG21-FWLM/AAAA ainsi qu'avec un plasmide pcDNA3.1 vide avant d'être lysées. La protéine « wild-type », et la protéine « mutée » ont ensuite été détectée par western blot avec un anticorps anti-myc (figure 15). Ceci a révélé que le mutant FWLM/AAAA est exprimé avec la même intensité que la protéine WT.

Nous avons ensuite réalisé une analyse par immunofluorescence (similaire à celle décrite précédemment dans la figure 14) dans des cellules HeLa transfectées avec la construction pcDNA_SPG21-FWLM/AAAA (figure 16). Cette expérience a révélé que le signal détecté pour SPG21-FWLM/AAAA (en vert) est relativement diffus dans la cellule, comme cela était le cas pour SPG21 WT. Cependant, contrairement à ce dernier, aucun signal ponctué n'a été observé. Il semble que la protéine ne soit pas recrutée sur/dans les organites subcellulaires positifs pour VPS26 ou LAMP-1. Il est à noter que la distribution de ces deux marqueurs demeure normale dans les cellules qui surexpriment le mutant. Une autre observation intéressante est la suivante : alors qu'un faible signal était détecté dans les noyaux pour SPG21 WT, nous avons observé un signal plus intense dans les noyaux pour SPG21-FWLM/AAAA. En conclusion, la perte du motif FWLM dans SPG21 a sévèrement impacté sa localisation subcellulaire. Ceci pourrait être causé par le fait que la perte du motif empêche SPG21 d'être recrutée sur les endo/lysosomes.

2.1.4. Analyse de la localisation de SPG21 par fractionnement subcellulaire

La colocalisation de SPG21 avec LAMP-1 en immunofluorescence, bien qu'informatrice, ne permet pas d'émettre d'hypothèse sur le fait que SPG21 puisse être localisée plus spécifiquement soit au niveau des lysosomes, soit au niveau des endosomes tardifs. En outre, cette analyse ne permet pas d'obtenir des données quantitatives à propos de la proportion de SPG21 localisée dans tel ou tel compartiment subcellulaire. C'est pourquoi nous avons

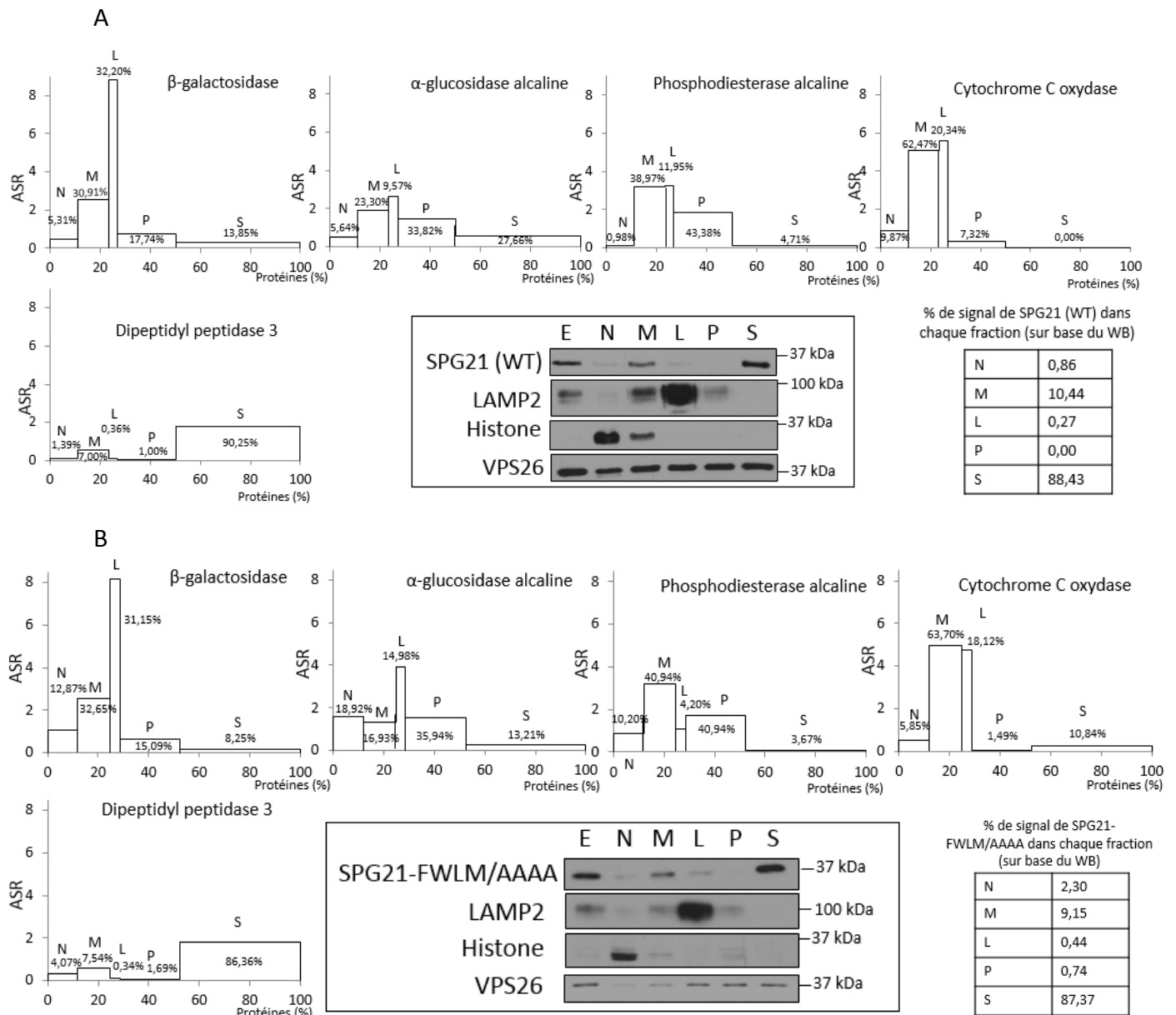


Figure 17 : Fractionnement subcellulaire par centrifugation différentielle de cellules HeLa transfectées avec SPG21 wild type et SPG21-FWLM/AAAA

Les homogénats de cellules HeLa transfectées avec SPG21 wild type (A) ou SPG21-FWLM/AAAA (B) ont été fractionnés en cinq fractions (N, M, L, P, S) (comme décrit à la figure 4). Les graphiques montrent la distribution des marqueurs lysosomiaux (β -galactosidase), du reticulum endoplasmique (α -glucosidase alcaline), de la membrane plasmique (phosphodiesterase alcaline) et des mitochondries (cytochrome C oxydase). SPG21, LAMP-2, l'histone H1 et VPS26 ont été détectées par western blotting après avoir chargé et séparé des quantités égales de protéines dans un gel d'acrylamide. Les pourcentages de signal détecté pour SPG21 dans chaque fraction ont été quantifiés sur base du western blot grâce au programme ImageJ. Les résultats de ces quantifications sont présentés sous forme de tableaux.

poursuivi notre étude de la localisation de la protéine via des méthodes de fractionnement subcellulaire.

Nous avons réalisé un fractionnement subcellulaire complet par centrifugation différentielle de cellules HeLa transfectées avec SPG21 WT ou SPG21-FWLM/AAAA (selon un protocole pratiquement similaire à celui décrit en 1.2.1) (figure 17). Les protéines marqueur dosées ou détectées en western blot sont : la β -galactosidase (lysosome), l' α -glucosidase alcaline (réticulum endoplasmique), la phosphodiesterase alcaline (membrane plasmique), la cytochrome C oxydase (mitochondrie), la dipeptidyl peptidase 3 (cytosol), LAMP-2 (lysosomal-associated membrane protein 2, pour la membrane des lysosome et endosomes), VPS26 (complexe rétromère au niveau des endosomes) et l'histone H1 (noyaux). Ces dosages et western blot ont été réalisés séparément pour le fractionnement de HeLa transfectées avec SPG21 WT (figure 17A) ou avec SPG21-FWLM/AAAA (figure 17B).

Nous pouvons observer que les profils de distribution des enzymes et protéines marqueurs sont relativement semblables dans les deux expériences (figure 12A et 12B). Plus de la moitié (~60%) du signal de la β -galactosidase est détecté dans les fractions M et L, avec un fort enrichissement de l'enzyme dans cette dernière. Pour l' α -glucosidase alcaline : la plupart du signal détecté est réparti dans les fractions N, M, L et P, et cette dernière contient approximativement 30% de l'activité totale. Un très léger enrichissement est aussi détecté pour cette enzyme dans la fraction L. Plus de 90% de l'activité de la phosphodiesterase alcaline est détectée dans les fractions M, L et P (avec un léger enrichissement dans les fractions M et L par rapport à la fraction P). La cytochrome C oxydase est très enrichie dans les fractions M et L qui contiennent plus de 80% de l'activité détectée pour cette protéine. Comme attendu, la majorité du signal détecté pour la protéine cytosolique dipeptidyl peptidase 3 est présent dans la fraction S. En western blot (après chargement de quantités égales de protéines), LAMP-2 est fortement enrichie dans la fraction L, et plus faiblement dans les fractions M et P (un profil qui ressemble relativement bien à celui de la β -galactosidase). La majorité du signal est détecté dans la fraction N pour l'histone H1. VPS26 est détecté dans toutes les fractions.

Concernant SPG21 WT (figure 17A), un signal plus intense est détecté par western blot, dans la fraction S. Un signal moins intense est également détecté dans les fractions N et M, et une bande de très faible intensité est visible dans la fraction L. Le calcul du signal relatif total présent dans chaque fraction indique que 88% des protéines SPG21 sont présentes dans la fraction S, et que 10% se localisent au niveau de la fraction M. Ce profil de distribution est en corrélation avec celui de la dipeptidyl peptidase 3, une observation qui semble indiquer une localisation cytosolique majoritaire de SPG21. La détection de SPG21 dans la fraction M et, dans une moindre mesure, dans la fraction L, au sein desquelles se retrouvent la majorité des lysosomes et endosomes est en accord avec la présence d'une partie de la population des protéines SPG21 dans/sur ces compartiments. Cependant, les faibles pourcentages de SPG21 dans ces fractions ne permettent pas de déterminer si la protéine est spécifiquement recrutée sur ces compartiments. En effet, la présence d'un pourcentage similaire de signal pour la Dipeptidyl peptidase 3 dans les fractions M et L suggère que des protéines cytosoliques peuvent se retrouver dans ces fractions (peut-être de façon non-spécifique, par absorption sur les membranes des compartiments qui sédimentent dans M et L, ou peut-être en raison de l'incorporation de fractions de cytosol à l'intérieur d'autophagosomes au cours du processus d'autophagie, ce qui amènerait des protéines cytosoliques dans les autophagolysosomes issus de la fusion des autophagosomes avec les lysosomes). Une perte de signal de SPG21 dans les

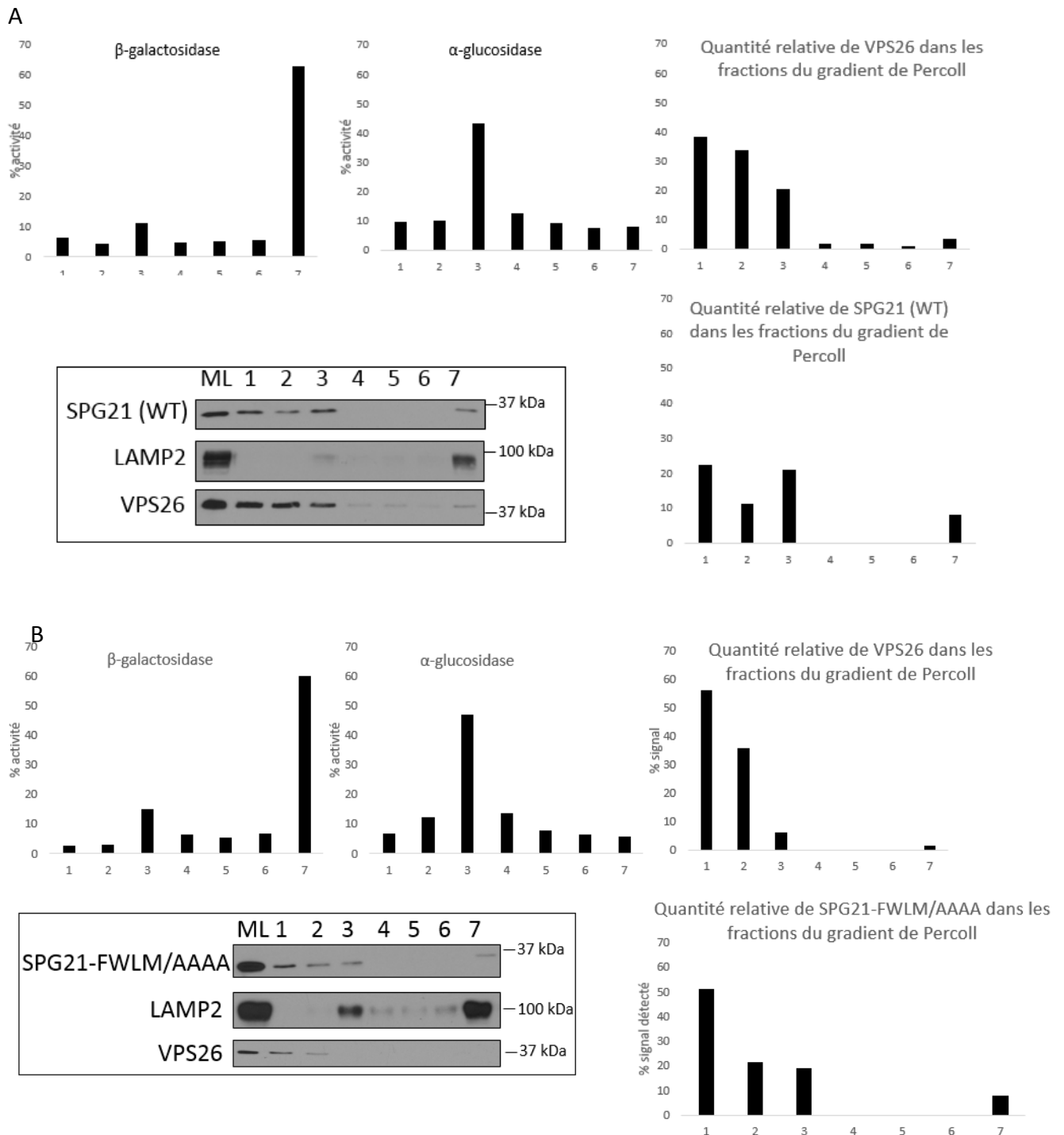


Figure 18 : Fractionnement subcellulaire par centrifugation isopycnique de SPG21 wild type et SPG21-FWLM/AAAA

(A) La fractions ML préparées dans le fractionnement subcellulaire décrit à la figure 12A (réalisé sur des cellules HeLa transfectées avec SPG21 wild type) a été chargée sur le haut d'un gradient non linéaire de Percoll 18% et centrifugée pendant 45 min à 25 000 rpm à 4°C. La β -galactosidase (lysosome) et de l' α -glucosidase alcaline (réticulum endoplasmique) ont été dosées. Les graphiques représentent le pourcentage d'activité détectée dans chaque fraction par rapport à l'activité totale détectée dans l'ensemble du gradient. SPG21, LAMP-2 et VPS26 ont été détectées par western blotting après avoir, pour chaque fraction, éliminé les billes et chargé des volumes similaires sur un gel d'acrylamide. Les pourcentages de SPG21 détectés dans chaque fraction du gradient ont été quantifiés à l'aide du programme ImageJ et les résultats sont présentés sous forme d'un tableau. (B) La fraction ML préparées dans le fractionnement subcellulaire décrit à la figure 12B (réalisé sur des cellules HeLa transfectées avec SPG21-FWLM/AAAA) ont subi une centrifugation dans un gradient de Percoll comme décrit en (A).

fractions M et L après mutation du motif FWLM serait un argument en faveur d'un recrutement spécifique de la protéine sur les endosomes ou lysosomes. Néanmoins nos résultats indiquent que la distribution de SPG21-FWLM/AAAA (figure 17B) est relativement similaire à celle de SPG21 WT : avec une majorité de signal dans la fraction S accompagné d'un signal plus faible dans les fractions M et L, ainsi qu'une faible détection dans la fraction N.

Afin de déterminer si le signal détecté pour SPG21 WT dans les fractions M et L se trouve associé à des lysosomes (notre hypothèse de départ), et si la perte du signal FWLM impacte spécifiquement cette association, nous avons ajouté une étape de centrifugation dans un gradient de densité de Percoll 18%. Les fractions M et L préparées lors des deux fractionnements subcellulaires complets de cellule HeLa transfectées respectivement avec SPG21 WT et SPG21-FWLM/AAAA ont été « poolées » avant d'être chargées sur le haut d'une solution de sucrose isotonique contenant 18% de Percoll (figure 18). Après centrifugation, un gradient de densité se forme par lui-même, à la différence du gradient de sucrose qui était formé préalablement. Le gradient de Percoll est de type non linéaire : il se caractérise par une légère augmentation de densité au début du gradient (dans les fractions 1 et 2), puis d'un plateau de densité qui s'étend jusqu'à la fraction 6, puis d'une forte hausse de densité dans la fraction 7 (7 fractions totales sont collectées). Comme attendu dans ce type de gradient, les lysosomes se retrouvent majoritairement dans la fraction la plus dense du gradient (fraction 7), comme indiqué par le fort pourcentage d'activité de la β -galactosidase et de LAMP-2 dans cette fraction (figure 18A-B). Les compartiments biosynthétiques, quant à eux, se retrouvent majoritairement au niveau de la fraction 3 (en effet, c'est dans cette fraction que l'enzyme marqueur du réticulum endoplasmique α -glucosidase alcaline montre le pourcentage d'activité le plus important). Il est à noter qu'une faible activité est également détectée dans la fraction 3 pour la β -galactosidase et pour LAMP-2 : ceci s'explique vraisemblablement par la présence, dans cette fraction, de compartiments endosomaux précoces. VPS26, quant à elle, est majoritairement détectée dans les trois premières fractions du gradient, en accord avec sa présence dans des endosomes (vraisemblablement situés dans la fraction 3) et dans le cytosol (les éléments solubles restant généralement tout au-dessus du gradient, dans les fractions 1 et 2). De façon similaire à VPS26, SPG21 WT est détecté dans les trois premières fractions du gradient, mais cette protéine présente en plus un signal dans la fraction 7 (figure 18A). La présence de SPG21 dans les fractions 3 et 7 pourrait indiquer que les protéines présentes dans les fractions M et L soient localisées au niveau des compartiments endosomaux et/ou biosynthétiques (fractions 3) et dans les lysosomes (fractions 7). La présence de SPG21 dans les fractions 1 et 2 pourrait refléter sa localisation cytosolique.

Bien qu'une légère diminution du signal de SPG21 dans les fractions 3 (endosomes) et 7 (lysosomes) soit observée dans le gradient de Percoll pour SPG21_FWLM/AAAA, au profit de la fraction 1 (figure 18B) la distribution de cette protéine demeure relativement similaire à celle de SPG21 WT, comme observé dans le fractionnement subcellulaire par centrifugation différentielle (figure 17). Curieusement, la quantification des signaux issus de VPS26 montre une diminution du pourcentage de protéine présent dans la fraction 3, au profit de la fraction 1 dans le gradient chargé avec la fraction ML préparée à partir de cellules HeLa transfectées avec la protéine mutée (figure 18B), par rapport au signal détecté pour cette protéine dans le gradient chargé avec la fraction ML préparée à partir de cellules HeLa transfectées avec la protéine WT (figure 18A). Ceci pourrait indiquer que l'expression du mutant FWLM/AAAA de SPG21 induit une modification du comportement de VPS26. Toutefois, ces résultats, bien

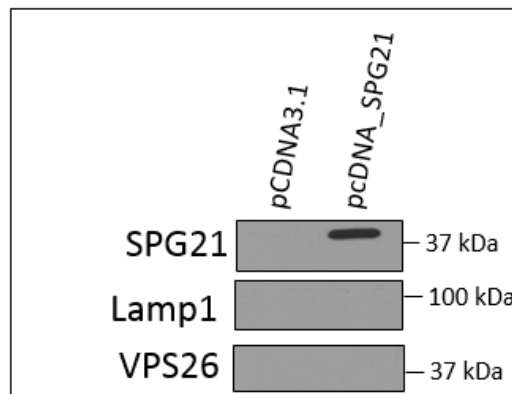


Figure 19 : Détection de LAMP-1 et VPS26 après immunoprécipitation de SPG21 à partir d'un lysat de cellules HeLa transfectées.

Des quantités similaires de protéines issues de lysats de cellules HeLa transfectées avec pcDNA3.1 vide ou pcDNA3.1_SPG21 ont été incubées avec des anticorps anti-myc préalablement couplé à des billes de protéine G agarose. Les protéines SPG21 ont été immunoprécipitées par centrifugation. Les précipités ont ensuite été élués dans du tampon de Laemmli (contenant du DTT) puis chargés et séparés sur gel de polyacrylamide. SPG21 a été détectée par des anticorps anti-myc de lapin. Des anticorps anti-LAMP-1 et anti-

qu'intéressants, doivent être considérés avec prudence étant donné que cette expérience n'a été réalisée qu'une seule fois.

En conclusion, en étudiant la localisation subcellulaire de SPG21 dans les cellules HeLa, nous avons confirmé que la protéine se localisait dans le cytosol des cellules, et qu'elle pouvait également colocaliser (en immunofluorescence) et codistribuer (après fractionnement subcellulaire) partiellement avec des marqueurs des endosomes et lysosomes. Nous avons également observé que la substitution du motif FWLM est responsable d'une modification de la localisation subcellulaire de la protéine détectée par immunofluorescence, et que cette mutation entraîne une légère modification du profil de distribution de la protéine lors du fractionnement subcellulaire par centrifugation dans un gradient de densité de Percoll. La possibilité que la mutation du motif FWLM puisse être responsable d'une modification de localisation de VPS26 peut également être envisagée.

2.2. Test d'interaction de SPG21 avec VPS26 et LAMP-1

Les résultats obtenus en immunofluorescence et en fractionnement subcellulaire ont permis d'identifier une colocalisation/codistribution partielle entre SPG21 et VPS26 d'une part, et entre SPG21 et LAMP-1 d'autre part. De plus, SPG21 présente un motif FWLM très similaire au motif qui permet à certaines protéines d'interagir avec le complexe rétromère. Afin de tester si des interactions pouvaient être mises en évidence entre SPG21, VPS26 et LAMP-1, nous avons réalisé une immunoprécipitation de SPG21 via des billes d'agaroses couplées à la protéine G et l'anticorps anti-myc de souris en utilisant comme matériel « source » des HeLa transfectées avec pcDNA_SPG21 ou pcDNA3.1 (vide) (figure 19). Les protéines immunoprécipitées ont ensuite été éluées et chargées sur gel afin de détecter SPG21, VPS26, et LAMP-1 par western blot. La détection de SPG21 avec un anticorps produit dans une espèce différente (lapin) confirme que la protéine a bien été immunoprécipitée. Cependant, ni VPS26 ni LAMP-1 n'ont été détectées parmi les protéines co-immunoprécipitées. Ceci pourrait s'expliquer par une absence d'interaction entre ces protéines, ou par une limitation de la technique utilisée. En effet, nous n'avons testé qu'une seule condition (la lyse des cellules a été réalisée dans du PBS-triton 1% à pH 7.4), ce qui pourrait ne pas avoir constitué des conditions optimales pour observer une interaction.

2.3. Effet de la mutation A108P sur l'abondance protéique de SPG21

Pour rappel, des mutations dans le gène codant pour SPG21 sont responsables du syndrome de Mast. Deux mutations différentes ont été identifiées : la mutation Ins601A, une insertion d'une adénine en position 601 dans *SPG21* qui occasionne une modification du cadre de lecture et l'apparition d'un codon stop prématuré dans l'ARNm de la protéine, ainsi que la mutation A108P qui correspond à une substitution de l'alanine en position 108 par une proline. Alors que la mutation Ins601A donne lieu à la synthèse d'une protéine tronquée, l'effet de la mutation A108P sur le comportement de la protéine n'a pas encore été déterminé.

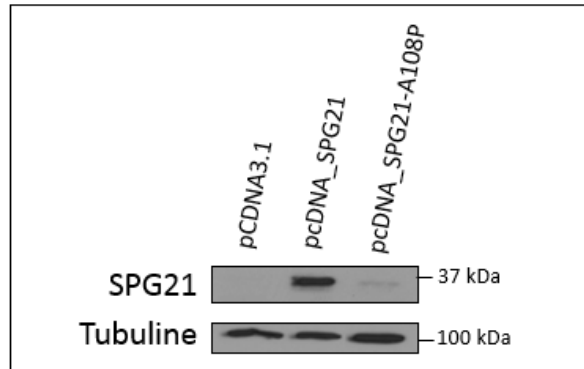


Figure 20 : Détection de SPG21 sauvage et de SPG21_A108P par western blotting dans des cellules HeLa S3 transfectées.

Des cellules HeLa transfectées avec pcDNA3.1 vide, pcDNA3.1_SPG21 ou pcDNA3.1_SPG21-A108P ont été lysées et des quantités équivalentes de protéines ont été chargées et séparées dans un gel d'acrylamide. SPG21 a été détectée par western blotting avec un anticorps anti-myc et la détection de la tubuline a été réalisée comme contrôle de charge.

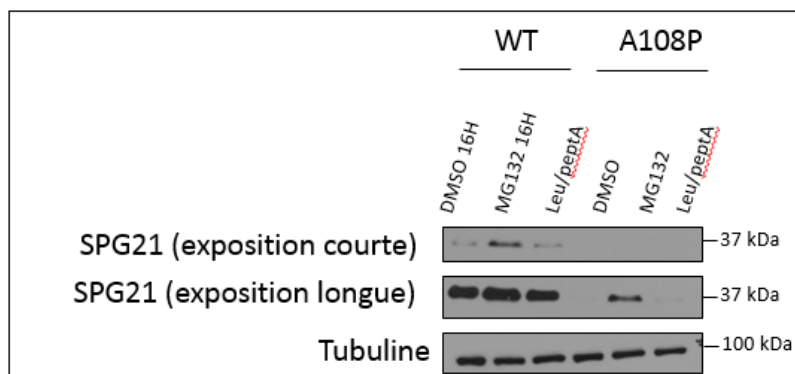


Figure 21 : Détection de SPG21 sauvage et de SPG21-A108P par western blotting dans des cellules HeLa S3 transfectées et traitées avec du DMSO, MG132 ou Leupeptine/pepstatine A

Des cellules HeLa transfectées avec pcDNA3.1_SPG21 (WT) ou pcDNA3.1_SPG21-A108P ont été lysées après 16h de traitement avec du DMSO, MG132 ou leupeptine/pepstatine A. Des quantités équivalentes de protéines ont été chargées et séparées dans un gel d'acrylamide. SPG21 a été détectée par western blotting avec un anticorps anti-myc. Deux durées d'exposition du film (courte et longue) sont présentées. La détection de la tubuline a été réalisée comme contrôle de charge.

Nous avons réalisé une nouvelle construction contenant la mutation A108P (pcDNA_SPG21-A108P) grâce à une triple PCR à partir de pcDNA_SPG21. Un western blot a ensuite été réalisé sur un lysat de cellules HeLa transfectées avec pcDNA_SPG21-A108P (figure 20). Des cellules HeLa transfectées avec un vecteur pcDNA3.1 vide ou avec notre vecteur pcDNA_SPG21 WT ont été respectivement utilisées comme contrôles négatif et positif du western blot. Après détection avec un anticorps anti-myc de souris, une bande dont la masse moléculaire est similaire à SPG21 WT est détectée pour la protéine mutée avec, cependant, une intensité très faible par rapport à la protéine sauvage.

Afin de déterminer si cette observation pouvait s'expliquer par le fait que la protéine mutée soit dégradée après avoir été exprimée dans les cellules, nous avons analysé les conséquences de l'inhibition de mécanismes de dégradation protéique (tel que le système ubiquitine-protéasome et la dégradation par des protéases intralysosomales) sur l'abondance de SPG21-A108P dans les cellules. Des cellules HeLa transfectées avec pcDNA_SPG21 (WT ou porteur de la mutation A108P) ont été traitées soit avec le MG132, soit avec de la leupeptine et de la pepstatine A. Le MG132 est un peptide aldéhyde (carbobenzoxy-leu-leu-leucinal) capable d'inhiber l'activité protéolytique du complexe du protéasome 26S (Lee & Goldberg 1998). La leupeptine est un inhibiteur de protéase capable d'inhiber les cystéine, sérine et threonine peptidases, alors que la pepstatine A est un inhibiteur des aspartyl proteases.

Il est à noter que le MG132, la leupeptine et la pepstatine A sont stockés dans du DMSO, c'est pourquoi des cellules contrôles ont simultanément été traitées pendant une même durée et avec une concentration similaire de DMSO. La tubuline a été détectée comme contrôle de charge dans tous les échantillons. Le western blot de SPG21 WT révèle que le signal augmente dans les cellules traitées au MG132 par rapport aux cellules contrôles tandis qu'aucune augmentation n'apparaît dans les cellules traitées avec la leupeptine/pepstatine A (figure 21). Ceci pourrait indiquer que la protéine SPG21 WT surexprimée est partiellement dégradée via le protéasome. La détection de SPG21-A108P dans les cellules contrôles (traitées au DMSO) est, comme précédemment, beaucoup plus faible que le signal détecté pour SPG21 WT dans les cellules contrôles. Le traitement à la leupeptine/pepstatine A ne donne pas lieu à une augmentation de l'intensité du signal détecté pour la protéine SPG21-A108P. Par contre, nous observons une augmentation de l'abondance de SPG21-A108P après traitement au MG132 (bien visible lors d'une plus longue exposition du film). Ces résultats permettent d'envisager l'hypothèse selon laquelle le syndrome de Mast pourrait être causé par une perte de fonction de SPG21 consécutive à sa dégradation par le protéasome.

Discussion et perspectives

1. *Senataxine (SETX)*

La Senataxine (SETX) est une hélicase d'ADN/ARN dont les mutations causent deux maladies neurodégénératives : la sclérose amyotrophique latérale 4 et l'ataxie avec apraxie oculomotrice 2 (Moreira et al. 2004; Chen et al. 2004). La fonction exacte de la protéine n'est pas encore connue, mais il a été suggéré qu'elle jouerait un rôle dans l'élimination des R-loops nucléaires : des structures constituées de brins d'ADN et ARN hybridés ensemble (Skourti-Stathaki et al. 2011; Skourti-Stathaki & Proudfoot 2014; Gan et al. 2011).

En utilisant un anticorps commercial anti-SETX, nous avons détecté trois bandes de ~250, ~300 et ~350kDa par western blot majoritairement exprimées dans le cerveau de souris. Une forme de masse moléculaire plus élevée a aussi été détectée dans le muscle squelettique. Deux isoformes de 297 et 253kDa sont documentées pour la forme murine de SETX. Cependant, aucune isoforme d'ARN codant pour une protéine de 350kDa ou plus n'est documentée. C'est pourquoi la détection de formes de masses moléculaires plus élevées pourrait s'expliquer par la présence de modifications post-traductionnelles de SETX. En effet, des modifications de la protéine par les voies d'ubiquitination/sumoylation ont été décrites (Richard et al. 2013; Bennett et al. 2013), et la présence de 15 motifs NXS/T dans la séquence de la protéine offre plusieurs sites potentiellement candidats pour des N-glycosylations. A noter qu'il est connu que certaines protéines nucléaires ou mitochondriales portent des glycanes (Hart & West 2009).

En ce qui concerne la localisation subcellulaire de SETX, cette protéine a été détectée à la fois dans le noyau (en accord avec la présence d'un « nuclear localisation signal » potentiel dans sa séquence) et dans le cytoplasme de différents types cellulaires (Chen et al. 2006). Plusieurs éléments (décrits en détail dans l'introduction) nous ont amenés à formuler l'hypothèse que cette protéine pourrait être localisée, au moins partiellement, dans les mitochondries. Au cours de ce travail, nous avons pu déterminer que cette hypothèse ne semble pas s'appliquer à la forme de ~350 kDa de SETX dans le cerveau de souris. En effet, son profil de distribution ressemble fortement à celui du marqueur du réticulum endoplasmique, l' α -glucosidase alcaline, après fractionnement de cet organe par centrifugation différentielle et isopycnique dans un gradient linéaire de sucrose (figures 10-11). Ce résultat pourrait refléter la présence de cette isoforme de SETX dans le réticulum, et/ou sa localisation dans d'autres types de vésicules de petites tailles sédimentées dans la fraction P tel que des fragments de l'appareil de Golgi, des vésicules de transport ou encore des endosomes. Les deux autres formes de SETX détectées en western blot dans le cerveau de souris (à des masses moléculaires de ~250 et ~300kDa) ont montré des profils de distribution qui ne correspondaient à aucun des profils de distribution des enzymes marqueurs (dont celui du marqueur mitochondrial, cytochrome C oxydase). Plusieurs raisons pourraient expliquer cette absence de superposition parfaite : 1- ces résultats pourraient refléter une localisation de SETX dans plusieurs organites (qui seraient différents pour les isoformes de ~250 et ~300 kDa vu que ces deux formes ne présentent pas la même distribution), ce qui donnerait lieu à un profil de distribution mixte ; 2- les formes de SETX pourraient se localiser dans des compartiments dont la distribution n'a pas été établie dans notre étude (endosomes, appareil de Golgi, autophagosomes, etc.) ; 3- SETX pourrait présenter une localisation intracellulaire spécifique, qui différerait dans les différents types cellulaires qui composent le cerveau. Dans cet ordre d'idée, SETX pourrait par exemple être localisée dans un unique organite, mais un organite différent dans un type

cellulaire par rapport à un autre (par exemple le noyau dans certaines cellules et la mitochondrie dans d'autres). En accord avec cette hypothèse, une étude de la localisation de SETX dans le cerveau de souris utilisant l'immunohistochimie a révélé que certaines cellules du cerveau concentraient la protéine dans le noyau, alors que d'autres montraient une plus haute expression dans le cytoplasme (Chen et al. 2006). 4- SETX pourrait être localisée dans un unique organite, mais avec des proportions très différentes en fonction du type cellulaire. Si cet organite avait un comportement différent lors de la centrifugation différentielle de divers types cellulaires, alors cela pourrait expliquer une divergence entre les profils de distribution d'un marqueur de cet organite et SETX. 5- SETX pourrait se localiser dans plusieurs compartiments intracellulaires, mais dans des proportions variables selon les types cellulaires. Nous avons tenté de diminuer cette complexité en sélectionnant un type cellulaire unique dans lequel la protéine est exprimée de façon endogène (les N1E-115). Cependant, les profils de distribution obtenus pour les divers marqueurs des organites se sont avérés trop proches les uns des autres pour permettre une analyse de la localisation de SETX dans ces cellules.

Bien que SETX ne présente pas un profil de distribution typique du noyau ou de la mitochondrie dans le cerveau, nos résultats n'excluent pas pour autant la possibilité qu'une certaine fraction du signal détecté pour la protéine se localise dans ces compartiments. C'est pourquoi d'autres éléments sont requis pour confirmer ou infirmer notre hypothèse de la présence de SETX dans les mitochondries. Il serait, par exemple, intéressant de déterminer la localisation subcellulaire de SETX dans les cellules musculaires C2C12, qui semblent exprimer fortement la protéine. L'utilisation d'un plasmide d'expression pour surexprimer la protéine dans un type cellulaire choisi pourrait ouvrir la porte à d'autres approches permettant d'obtenir des données plus précises quant à la localisation de la protéine. L'expression dans des cellules auquel notre protocole de fractionnement est adapté, et l'immunofluorescence ont été envisagées. Cependant, la transfection de la construction que nous avons créée n'a pas donné lieu à un signal pour SETX lors de l'analyse par western blot des cellules transfectées. Ce résultat négatif pourrait s'expliquer par une difficulté à faire entrer ce très gros plasmide (plus de 13000 paires de bases) dans les cellules par les méthodes de transfection choisies (le réactif de transfection commercial X-trème Gene 9, et le phosphate de calcium). Nous pourrions tenter de résoudre ce problème en clonant le cDNA encodant SETX dans un autre vecteur d'expression mammalienne, ou en modifiant la méthode de transfection (par exemple par l'utilisation d'autres méthodes de transfection chimiques utilisant des liposomes comme le réactif lipofectamine, ou bien par des méthodes physiques comme l'électroporation). Alternativement, l'absence de signal pour SETX dans les cellules transfectées pourrait suggérer une dégradation de la protéine surexprimée. Afin de vérifier si le plasmide rentre correctement dans les cellules et que SETX est effectivement transcrit en ARNm, nous pourrions réaliser une RT-PCR (reverse transcription PCR) quantitative dans des cellules HeLa transfectées pour détecter l'abondance de l'ARNm de SETX. Dans le cas où le plasmide serait correctement exprimé dans les cellules, il serait possible que la protéine surexprimée soit fortement dégradée. Il est à noter qu'une autre équipe ayant surexprimé SETX a observé une très faible augmentation de l'abondance protéique (Bennett & La Spada 2015). Ce phénomène pourrait être causé par le fait que l'extrémité amino-terminale de SETX soit responsable d'une régulation fine de l'abondance protéique par le système ubiquitine/protéasome (comme cela avait déjà été décrit pour Sen1p, l'orthologue de SETX (DeMarini et al. 1995)). Nous pourrions, dès lors, tenter d'inhiber ce mécanisme de dégradation protéique pour voir si cela impacte la présence de la protéine après transfection. L'ajout de tags (myc, flag ou GFP) en position N-

ou C-terminale de la protéine permettrait de contrôler que l'absence de signal n'est pas liée à l'anticorps anti-SETX utilisé (nous pourrions utiliser des anticorps dirigés contre le tag). Une autre méthode qui pourrait nous permettre de valider la spécificité de notre anticorps anti-SETX serait une extinction de l'expression de la protéine dans la lignée N1E-115 par siRNA (small interfering RNA). En effet, la disparition du signal détecté par western blot dans ces cellules confirmerait que notre anticorps détecte bien la protéine d'intérêt.

Etant donné qu'un traitement à la caféine est capable de réduire le nombre d'agrégats nucléaire de SETX (Yüce & West 2013), nous avons soulevé la possibilité que SETX puisse être recrutée depuis, le cytoplasme, vers le noyau, et que cette translocation soit inhibée par le traitement. Auquel cas, nous aurions observé une diminution de la portion de signal détectée dans la fraction nucléaire, au profit de la fraction PNS (post nuclear supernatant), il est à noter qu'un tel mécanisme de recrutement est notamment utilisé par d'autres hélicases nucléaires qui possèdent également des fonctions dans la mitochondrie. Par exemple, RECQ4, une fois exprimée dans le cytoplasme, peut rejoindre le noyau ou la mitochondrie (Ding & Liu 2015). Cependant, l'absence de profil de distribution distinct après fractionnement des N1E-115 ne nous a pas permis d'observer un tel effet.

S'il s'avérait que SETX soit localisée, au moins partiellement, dans la mitochondrie dans des cellules du cerveau et/ou dans le muscle, nous pourrions essayer de découvrir si les mutations causant l'ALS4 et l'AOA2 affectent cette localisation et/ou la fonction de SETX dans cet organe. Sur base de la littérature, des hypothèses peuvent être formulées quant au rôle de cette protéine dans les mitochondries. Par exemple, la fonction de résolution des R-loops de SETX pourrait jouer un rôle dans la réplication de l'ADN mitochondrial et dans la transcription des gènes mitochondriaux. En effet, en plus d'être présent dans le noyau, des R-loops ont été détectés dans la mitochondrie, mais leurs fonctions exactes ne sont pas encore caractérisées (El Hage et al. 2014; Brown et al. 2008). Il a été proposé qu'ils puissent moduler l'initiation de la réplication de l'ADN mitochondrial et influencer sa conformation. Ainsi, un défaut dans la localisation mitochondriale, ou dans la fonction de résolution des R-loops de SETX pourrait avoir un impact sur la synthèse des protéines mitochondriales. En pratique, il serait possible de tester les conséquences de l'expression d'une forme mutée de SETX sur la biologie de la mitochondrie par plusieurs approches : la caractérisation de la morphologie et du nombre de mitochondries par microscopie à fluorescence, l'utilisation de test de potentiel de membrane, l'analyse de l'abondance des protéines encodées par le génome mitochondrial ou la mesure de l'activité enzymatique des enzymes mitochondriales telle que la cytochrome C oxydase. Il pourrait aussi être intéressant d'analyser la localisation et le trafic subcellulaire de SETX dans des cellules qui ne possèdent pas d'ADN mitochondrial (comme les cellules d'ostéosarcome Rho(0)143B).

Il est aussi intéressant de noter que les formes de SETX détectées dans les cellules N1E-115 et C2C12 semblent être plus abondantes après que ces dernières aient été différenciées respectivement en neurones et myocytes. Plusieurs mécanismes pourraient causer cette modification. D'abord l'expression de la protéine pourrait être augmentée après différenciation. Pour tester cette hypothèse, nous pourrions réaliser une RT-PCR quantitative pour suivre l'évolution de l'abondance de l'ARNm de SETX durant la différenciation. Une hypothèse alternative serait que l'abondance protéique de SETX soit modifiée (par exemple par des régulations post traductionnelles de la protéine qui entraîneraient une modification de sa durée de vie dans la cellule). Par ailleurs, cette observation soutient l'hypothèse d'une fonction

importante de SETX dans les cellules qui ne sont pas en division (comme les neurones et cellules musculaires), alors que plusieurs observations mettent en évidence l'importance de SETX dans les cellules qui subissent de nombreuses divisions cellulaires. Par exemple, une étude a montré que SETX jouait un rôle important dans la spermatogenèse chez la souris (par un mécanisme lié à l'élimination des R-loops) (Becherel et al. 2013).

Pour conclure, un nombre non négligeable d'indices supportent l'hypothèse d'une localisation partielle de SETX dans la mitochondrie mais nous n'avons pas pu confirmer cette hypothèse en utilisant divers méthodes de fractionnement subcellulaire. Les nombreuses fonctions de SETX et le fait que cette protéine soit impliquée dans deux maladies neurodégénérative soulignent l'importance de cette protéine dans les cellules. Des expériences additionnelles sont donc nécessaires pour en apprendre plus à propos de SETX et, ainsi, améliorer la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires qui sont à l'origine de l'ALS4 et de l'AOA2.

2. Maspardine (SPG21)

La maspardine (SPG21) est une protéine qui comprend un domaine présentant une homologie partielle avec la superfamille des α/β hydrolases. Ce dernier ne possède pas d'activité catalytique et il a été suggéré qu'il servait plutôt de domaine d'interaction protéine-protéine (Zeitlmann et al. 2001). Des mutations dans le gène codant pour SPG21 causent le syndrome de Mast, une paraplégie spastique héréditaire complexe (Simpson et al. 2003). Le rôle de cette protéine demeure cependant inconnu. Dans ce travail, nous avons entamé la recherche de la fonction assurée par SPG21 dans les cellules de mammifères en réalisant une étude de sa localisation subcellulaire et en testant l'impact de l'introduction de mutation dans sa séquence (dont une mutation entraînant le syndrome de Mast) sur son expression, stabilité et localisation.

2.1. Localisation intracellulaire de la protéine SPG21 WT

Les résultats d'immunofluorescence réalisés en détectant la protéine surexprimée dans des cellules HeLa grâce à un anticorps anti-myc ont révélé une triple localisation de SPG21. En effet, la protéine est détectée de façon diffuse dans le cytosol ainsi que dans le noyau et est aussi présente sous forme de signaux ponctuels dans le cytoplasme. Ceci suggère que la protéine est en partie soluble et qu'elle pourrait être recrutée sur/dans des organites subcellulaires. Les colocalisations partielles observées entre SPG21 et LAMP-1 et entre SPG21 et VPS26, suggèrent que ces compartiments font partie de la voie endolysosomale. Ceci est en accord avec les résultats décrits dans la littérature qui assignent une double localisation à la protéine : dans le cytosol et au niveau d'endosomes (Hanna & Blackstone 2009). Etant donné que SPG21 ne possède pas de segment transmembranaire prédit, deux possibilités pourraient justifier les colocalisations que nous avons observées avec des marqueurs des endosomes et lysosomes. D'abord, SPG21 pourrait être localisée dans la lumière de ces organites pour y jouer un rôle qui n'est pas encore déterminé. Le fait que le domaine α/β hydrolases de SPG21 ne soit pas fonctionnel suggère que SPG21 n'a pas un rôle direct dans l'hydrolyse de substrats dans les

endo/lysosomes. L'autre possibilité qui pourrait engendrer une colocalisation entre SPG21 et des marqueurs membranaires des endo/lysosomes, serait que SPG21 soit recrutée sur les membranes de ces organites à partir du cytosol, tel que cela est décrit pour VPS26 (qui, pour rappel est un composant du complexe rétromère qui assure le recyclage de protéines endosomales vers le *trans*-Golgi par une voie de transport vésiculaire). D'ailleurs, la détection de la protéine dans le cytosol des cellules HeLa est une observation concordante avec cette hypothèse.

En utilisant des méthodes de fractionnement subcellulaire par centrifugation différentielle, nous avons observés que ~90% des protéines SPG21 se trouvent, à l'état basal, dans la fraction cytosolique et que ~10% des protéines SPG21 sédimentent avec les compartiments retrouvés dans les fractions M et L (notamment les lysosomes et endosomes tardifs). De plus, le fractionnement de cette fraction ML dans un gradient autoformé de Percoll révèle qu'environ la moitié de la fraction des protéines SPG21 associée à des membranes se localise au niveau des lysosomes. Ces données sont concordantes avec les résultats obtenus par immunofluorescence et supportent que SPG21 se localise dans le cytosol, ainsi qu'au niveau d'endosomes et de lysosomes.

Curieusement, les données issues de l'étude réalisée avec du foie de rat avaient amené à assigner une probabilité de localisation de SPG21 dans les lysosomes de ~0,4 et une probabilité de localisation de ~0.6 dans la fraction cytosolique. Bien qu'il ne soit pas possible d'obtenir une quantification précise du pourcentage de SPG21 associé aux lysosomes et au cytosol dans le foie sur base de ces probabilités, celles-ci suggèrent néanmoins que la fraction de SPG21 localisée dans les lysosomes est relativement élevée, alors que nous avons détecté moins de 10% de SPG21 au niveau des lysosomes de cellules HeLa. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer cette différence. Une première possibilité serait que la quantité relative de protéines SPG21 capables de s'associer aux compartiments endo-lysosomaux dans les cellules HeLa soit sous-estimée dans notre expérience de fractionnement subcellulaire. La présence d'épitopes myc et flag à l'extrémité de la protéine, par exemple, pourrait perturber le recrutement de cette protéine vers les endosomes/lysosomes. Une manière simple de tester cette hypothèse serait de réaliser une expérience similaire en détectant la protéine endogène, ou une protéine surexprimée non taggée. Un autre mécanisme qui pourrait induire une sous-estimation de la quantité de protéines SPG21 présente dans les fractions de cellules HeLa enrichies en compartiments endo-lysosomaux serait le fait que la protéine se détache de ces membranes durant le fractionnement. En effet, si la présence de SPG21 au niveau des endosomes et lysosomes était due à un recrutement de cette protéine sur la membrane de ces compartiments mais que cette association soit instable (peut-être en raison de la présence de tags), il serait possible d'imaginer que la protéine se « détache » des membranes lorsque celles-ci sont soumises à des forces centrifuges importantes, à des frictions lors des resuspensions des divers culots et lors du passage des lysosomes au travers du gradient composé de billes de Percoll. Ceci pourrait notamment expliquer la présence de la protéine dans les fractions 1 et 2 du gradient de Percoll, où du matériel soluble est habituellement retrouvé (à noter que l'absence de β -galactosidase dans les fractions 1 et 2 élimine la possibilité que les protéines SPG21 détectées dans ces fractions proviennent de lysosomes cassés durant la centrifugation dans le gradient de Percoll). Néanmoins, si cette hypothèse de détachement de SPG21 des membranes au cours du fractionnement s'avérait correcte, ce phénomène devrait aussi se dérouler lors du fractionnement de foie de rat (soumis à un protocole similaire de fractionnement par centrifugation différentielle), ce qui ne semble pas être le cas. Une hypothèse alternative qui

pourrait expliquer la différence de répartition de SPG21 dans notre fractionnement subcellulaire de HeLa par rapport au fractionnement subcellulaire de foie de rat serait que la protéine adopte une localisation différente dans ces deux modèles. En effet, le recrutement de SPG21 au niveau des endosome/lysosomes pourrait être médié par des protéines dont l'abondance est différente dans divers types cellulaires. Citons par exemple VPS26 et VPS35, des sous unités du complexe rétromère (au sein duquel SPG21 pourrait être recrutée, voir ci-dessous) qui sont plus abondantes dans certains organes (tel que le foie de rat) que dans d'autres (Haft et al. 2000). Une façon de tester cette hypothèse serait de réaliser un fractionnement similaire de cellules Hep3b, des hépatocytes humains, transfectés avec SPG21 et de déterminer la fraction de la population de cette protéine qui s'associe aux endo/lysosomes. De même nous pourrions détecter SPG21 par immunofluorescence pour voir si la proportion de signal ponctué de SETX augmente dans ces cellules.

2.2. Rôle du motif FWLM dans la localisation intracellulaire de SPG21.

Plusieurs protéines possèdent des motifs d'acide aminés hydrophobes qui permettent leur reconnaissance par le complexe rétromère (dont les sous-unités de la famille VPS et SNX sont recrutées sur la membrane des endosomes à partir du cytosol). Par exemple, le recyclage du CI-MPR (un récepteur membranaire qui transporte les hydrolases lysosomale depuis le *trans*-golgi vers les endosomes) est assuré par la liaison de son motif d'acides aminés hydrophobes WLM aux sous unités VPS26 et VPS35 du rétromère (Kornfeld 1992; Seaman 2004; Seaman 2007). Il est à noter que ce motif est présent dans la queue cytosolique du CI-MPR. De même, la sortiline, un autre transporteur d'hydrolases acides, recycle vers le *trans*-Golgi grâce à la reconnaissance du motif composé des acides aminés hydrophobes « FLV » par le rétromère (Seaman 2007). La présence dans la séquence de SPG21 d'un motif de quatre acides aminés hydrophobes FWLM (Phénylalanine-Tryptophane-Leucine-Méthionine), et les observations rassemblées sur la localisation subcellulaire de cette protéine, nous ont amenés à formuler l'hypothèse que SPG21 soit recrutée à la surface des endo/lysosomes via une interaction de son motif FWLM (ou de certains acide aminés de ce motif) avec le complexe rétromère. Pour tester cette hypothèse, nous avons substitué ce motif par quatre alanines dans la séquence protéique de SPG21 et analysé la localisation subcellulaire de la protéine mutée. Nos expériences ont mis en avant le fait que lorsque la protéine mutée SPG21-FWLM/AAAA est détectée par immunofluorescence, elle présente toujours un signal diffus à travers le cytosol, mais que plus aucun signal ponctué n'est observé. Ceci s'accompagne d'une absence de colocalisation avec les deux marqueurs LAMP-1 et VPS26. Afin d'étudier si ce changement de localisation est la conséquence d'une incapacité de la protéine mutée à interagir avec le complexe rétromère, nous avons réalisé un test de co-immunoprécipitation de SPG21 avec la sous-unité du rétromère VPS26. Cependant, cette sous-unité n'a pas pu être détectée parmi les protéines co-immunoprécipitées avec SPG21. Ceci peut soit suggérer que les deux protéines ne sont pas associées dans un même complexe, soit que des limitations techniques ont empêché la mise en évidence de leur interaction. Nous pourrions renouveler cette expérience en modifiant plusieurs paramètres (comme par exemple : tester différents tampons de solubilisation avec des concentrations en sels et en détergents variables, tester différents pH, etc). Aussi, l'utilisation de cross-linkers biochimiques a déjà été utilisée par d'autres équipes pour mettre en évidence des interactions entre des protéines et le complexe rétromère lorsque celles-ci n'étaient pas

visualisées par co-immunoprécipitations (Strochlic et al. 2007; Harrison et al. 2014). Certains cross-linkers réversibles permettent par exemple de lier des protéines qui interagissent entre elles pour faciliter leur co-immunoprécipitation. La réversibilité de cette liaison permet ensuite de séparer les protéines, pour les identifier (par western blot par exemple). Le DSP (dithiobis(succinimidylpropionate)) est un exemple de cross-linker réversible qui a permis de découvrir de telles interactions entre des protéines et le complexe rétromère (Strochlic et al. 2007). Il serait intéressant de tester l'interaction possible de SPG21 avec les diverses sous-unités du complexe. Nous pourrions aussi analyser la localisation subcellulaire de SPG21 dans des cellules déficientes pour l'une ou l'autre sous-unité du rétromère. Mais si ces expériences ne montrent aucune implication de ce complexe dans la localisation de SPG21, d'autres mécanismes impliqués dans le trafic des membranes des compartiments endolysosomiaux pourraient être testés. Nous pourrions aussi envisager de rechercher, sans a priori, les partenaires d'interaction de la protéine SPG21 en envoyant les protéines co-immunoprécipitées avec SPG21 pour identification par spectrométrie de masse.

Le fait que le profil de distribution de SPG21-FWLM/AAAA établi à partir des fractions obtenues par centrifugations différentielle et isopycnique demeure relativement similaire à celui obtenu pour SPG21-WT est quelque peu surprenant, au vu des résultats d'immunofluorescence (plus aucune colocalisation avec VPS26 et LAMP-1 pour le mutant, ce qui a été confirmé plusieurs fois de manière indépendante). Néanmoins, un léger déplacement de la distribution de la protéine a été observé dans le gradient de Percoll (vers la fraction 1), en accord avec une perte d'association des protéines mutées avec les endolysosomes. La portion de SPG21 qui demeure codistribuée avec la β -galactosidase et LAMP-1 pourrait représenter des protéines cytosoliques incorporées à l'intérieur des lysosomes/autolysosomes au cours du processus autophagique. Par ailleurs, les quantifications des signaux de VPS26 dans les gradients de Percoll suggèrent que cette dernière pourrait être moins efficacement recrutée sur les membranes lors de la surexpression de la protéine mutée (déplacement de sa distribution vers la fraction 1 du gradient). Ceci pourrait indiquer une éventuelle interaction de SPG21 et VPS26 dans les cellules. Toutefois, ces résultats doivent être considérés avec prudence car cette expérience n'a été réalisée qu'une seule fois.

Il est aussi intéressant de noter que la protéine SPG21 sauvage se localise en partie dans le noyau et que la mutation du motif FWLM a donné lieu à une augmentation du signal détecté dans ce compartiment. Cette observation soulève la question suivante : le motif FWLM pourrait-il jouer un rôle dans l'export de SPG21 à partir du noyau ? Il a été démontré que des motifs d'acides aminés hydrophobes (riches en leucine) sont impliqués dans la translocation de certaines protéines depuis le noyau vers le cytosol, on parle dans ce cas de NES (nuclear export signal) (Wen et al. 1995; Fischer et al. 1995), dont la séquence se rapproche plus ou moins d'une séquence consensus Φ -X₂₋₃- Φ -X₂₋₃- Φ -X- Φ (dans laquelle Φ correspond aux acides aminés Leucine, Valine, Isoleucine, Méthionine ou Phénylalanine et ou x est n'importe quel acide aminé (Kutay & Güttinger 2005). Mais il semble que les acides aminés du motif FWLM ne fassent pas partie d'un tel site. Pour tester si SPG21 est transportée à travers l'enveloppe nucléaire, nous pourrions traiter des cellules avec des inhibiteurs d'exportines nucléaires (plus communément dénommée SINE pour Selective inhibitors of nuclear export) comme par exemple la leptomycin B (un composé capable de se lier à la Cystéine528 de XPO1, une exportine nucléaire) (Das et al. 2015) et observer les conséquences de ce traitement sur la localisation de SPG21 en immunofluorescence et en fractionnement subcellulaires.

2.3. Effet de la mutation A108P sur la stabilité de la protéine SPG21

Pour rappel, deux mutations différentes de SPG21 causent le syndrome de Mast. Alors que la mutation Ins601A a pour conséquence un décalage de la phase ouverte de lecture et l'apparition d'un codon stop prématuré dans l'ARNm de la protéine, aucune donnée n'est décrite dans la littérature à propos des conséquences de la mutation A108P. Nous avons réalisé une construction génétique permettant de surexprimer le mutant SPG21-A108P couplé à des épitopes myc et flag. Contrairement, à la protéine sauvage, la protéine SPG21-A108P est très faiblement exprimée dans les cellules HeLa. Nous avons observé que le traitement des cellules au MG132, un inhibiteur du protéasome, permettait une augmentation de l'abondance protéique de SPG21-A108P. Ceci soulève l'hypothèse selon laquelle cette protéine pourrait être massivement dégradée par le protéasome (par exemple à cause d'un mauvais repliement de la protéine). Dans nos expériences, l'utilisation d'un inhibiteur du protéasome a permis de limiter la dégradation de SPG21. Toutefois, il serait nécessaire de contrôler si la protéine mutée SPG21-A108P qui n'est plus dégradée est capable d'assurer les fonctions de la protéine sauvage. Par ailleurs, cette mutation entraîne la substitution de l'alanine 108 par une proline, or cette dernière possède une structure particulière composée d'un noyau pyrrole. De par cette structure, cet acide aminé possède une géométrie plus contraignante que l'alanine. Ainsi, il est possible que cette substitution modifie la position de la Sérine 109, un acide aminé important du domaine α/β hydrolase qui a été démontré comme indispensable à l'interaction de SPG21 avec CD4 (cluster of differentiation 4). Ce constat souligne l'importance de tester la possibilité que la mutation A108P entraîne une perte de fonction de la protéine. Pour ce faire, nous pourrions commencer par vérifier si, dans des cellules HeLa traitées avec du MG132, la protéine mutée qui échappe à la dégradation est capable de rejoindre les endo/lysosomes. Et, lorsque plus d'informations seront disponibles sur la fonction de SPG21, nous pourrions analyser l'impact de la mutation sur celle-ci.

Le recrutement de SPG21 sur les membranes endo/lysosomales et l'observation que plus d'une dizaine de gènes dont les mutations sont responsables de divers formes de HSP encodent des protéines dont les fonctions sont en relation avec le trafic membranaire (Blackstone et al. 2011), suggère que SPG21 pourrait participer à des événements de transport prenant place entre les endo/lysosomes et d'autres compartiments. Pour étudier cette possibilité, nous pourrions notamment comparer le contenu endo/lysosomal dans des cellules contrôles et des cellules surexprimant SPG21, ou des cellules contrôles et déficientes pour cette protéine (knocked-out ou knocked-down), soit par une approche ciblée en mesurant l'abondance relative d'une sélection de protéines par western blotting ou dosages enzymatiques, soit par une approche à plus grande échelle, en utilisant la spectrométrie de masse quantitative pour détecter un grand nombre de protéines et leur abondance relative. Nous pourrions aussi analyser si la surexpression ou l'extinction de SPG21 impacte la sécrétion de protéines endo/lysosomales (une perturbation d'un trafic vésiculaire à partir de ces compartiments pourrait perturber leur capacité à fusionner avec la membrane plasmique, ou perturber le recyclage de récepteurs d'acides hydrolases qui, par défaut, seraient sécrétés dans le milieu). Enfin, nous pourrions étudier plus en détail les caractéristiques des endo/lysosomes dans les cellules qui surexpriment, ou qui ont perdu SPG21, 1-par immunofluorescence et microscopie électronique afin de déterminer si leur forme ou taille est modifiée suite à ces manipulations, 2-par fractionnements subcellulaires. L'accumulation de protéines ou de produits de dégradation dans ces compartiments en raison de la perturbation d'un trafic vésiculaire prenant place à partir des

endo/lysosomes pourrait potentiellement entraîner une surcharge et un gonflement de ces compartiments, induisant des modifications d'aspect et de taille visibles par des analyses morphologiques (par exemple en immunofluorescence ou en microscopie électronique) ou par des analyses de fractionnement subcellulaire (dans des gradients isopycniques par exemple).

En conclusion, des expériences supplémentaires sont requises pour confirmer l'hypothèse d'un rôle de SPG21 dans le trafic vésiculaire rétrograde et pour déterminer si ce rôle hypothétique est en lien avec la pathogenèse du syndrome de Mast. La découverte du fait que la protéine se localise au niveau des endosomes, mais peut-être aussi au niveau des lysosomes (ce qui n'avait pas été démontré jusqu'ici), qu'un motif FWLM contrôle l'association de la protéine avec ces compartiments, et que la mutation A108P impacte la stabilité de la protéine, sont autant de premiers pas qui, nous l'espérons, nous rapprocheront de la découverte de la fonction de la protéine dans les cellules de mammifères.

Références

- An, J. et al., 2012. CHCM1/CHCHD6, novel mitochondrial protein linked to regulation of mitofilin and mitochondrial cristae morphology. *The Journal of biological chemistry*, 287(10), pp.7411–26.
- Anheim, M. et al., 2009. Ataxia with oculomotor apraxia type 2: clinical, biological and genotype/phenotype correlation study of a cohort of 90 patients. *Brain : a journal of neurology*, 132(Pt 10), pp.2688–98.
- Bannwarth, S. et al., 2014. A mitochondrial origin for frontotemporal dementia and amyotrophic lateral sclerosis through CHCHD10 involvement. *Brain : a journal of neurology*, 137(Pt 8), pp.2329–45.
- Beaufay, H. et al., 1964. Tissue fractionation studies. 18. Resolution of mitochondrial fractions from rat liver into three distinct populations of cytoplasmic particles by means of density equilibration in various gradients. *The Biochemical journal*, 92(1), pp.184–205.
- Becherel, O.J. et al., 2013. Senataxin plays an essential role with DNA damage response proteins in meiotic recombination and gene silencing. *PLoS genetics*, 9(4), p.e1003435.
- Bennett, C.L. et al., 2013. Protein interaction analysis of senataxin and the ALS4 L389S mutant yields insights into senataxin post-translational modification and uncovers mutant-specific binding with a brain cytoplasmic RNA-encoded peptide. *PloS one*, 8(11), p.e78837.
- Bennett, C.L. & La Spada, A.R., 2015. Unwinding the role of senataxin in neurodegeneration. *Discovery medicine*, 19(103), pp.127–36..
- Blachly-Dyson, E. et al., 1993. Cloning and functional expression in yeast of two human isoforms of the outer mitochondrial membrane channel, the voltage-dependent anion channel. *The Journal of biological chemistry*, 268(3), pp.1835–41.
- Blackstone, C., O’Kane, C.J. & Reid, E., 2011. Hereditary spastic paraplegias: membrane traffic and the motor pathway. *Nature reviews. Neuroscience*, 12(1), pp.31–42
- Bomont, P. et al., 2000. Homozygosity mapping of spinocerebellar ataxia with cerebellar atrophy and peripheral neuropathy to 9q33-34, and with hearing impairment and optic atrophy to 6p21-23. *European journal of human genetics : EJHG*, 8(12), pp.986–90.
- Bonifacino, J.S. & Hurley, J.H., 2008. Retromer. *Current opinion in cell biology*, 20(4), pp.427–36.
- Brown, T.A., Tkachuk, A.N. & Clayton, D.A., 2008. Native R-loops persist throughout the mouse mitochondrial DNA genome. *The Journal of biological chemistry*, 283(52), pp.36743–51.
- Burattini, S. et al., C2C12 murine myoblasts as a model of skeletal muscle development: morpho-functional characterization. *European journal of histochemistry : EJH*, 48(3), pp.223–33.
- Chance, P.F. et al., 1998. Linkage of the gene for an autosomal dominant form of juvenile amyotrophic lateral sclerosis to chromosome 9q34. *American journal of human genetics*, 62(3), pp.633–40.
- Chang, Y.-F., Imam, J.S. & Wilkinson, M.F., 2007. The nonsense-mediated decay RNA surveillance pathway. *Annual review of biochemistry*, 76, pp.51–74.

- Chen, Y.Z. et al., 2006. Senataxin, the yeast Sen1p orthologue: Characterization of a unique protein in which recessive mutations cause ataxia and dominant mutations cause motor neuron disease. *Neurobiology of Disease*, 23, pp.97–108.
- Chen, Y.-Z. et al., 2004. DNA/RNA helicase gene mutations in a form of juvenile amyotrophic lateral sclerosis (ALS4). *American journal of human genetics*, 74(6), pp.1128–35.
- Chertemps, T. et al., 2012. Characterization of maspardin, responsible for human Mast syndrome, in an insect species and analysis of its evolution in metazoans. *Die Naturwissenschaften*, 99(7), pp.537–43.
- Choe, J., Ahn, S.H. & Kim, Y.K., 2014. The mRNP remodeling mediated by UPF1 promotes rapid degradation of replication-dependent histone mRNA. *Nucleic acids research*, 42(14), pp.9334–49.
- Craigien, W.J. et al., 2013. Exome sequencing of a patient with suspected mitochondrial disease reveals a likely multigenic etiology. *BMC medical genetics*, 14(1), p.83.
- Cross, H.E. & McKusick, V.A., 1967. The mast syndrome. A recessively inherited form of presenile dementia with motor disturbances. *Archives of neurology*, 16(1), pp.1–13.
- Cudkovicz, M.E. et al., 1997. Epidemiology of mutations in superoxide dismutase in amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of neurology*, 41(2), pp.210–21.
- Das, A. et al., 2015. Selective inhibitors of nuclear export (SINE) in hematological malignancies. *Experimental hematology & oncology*, 4, p.7.
- De, S. et al., 2012. RECQL4 is essential for the transport of p53 to mitochondria in normal human cells in the absence of exogenous stress. *Journal of cell science*, 125(Pt 10), pp.2509–22.
- DeMarini, D.J. et al., 1995. The yeast SEN3 gene encodes a regulatory subunit of the 26S proteasome complex required for ubiquitin-dependent protein degradation in vivo. *Molecular and cellular biology*, 15(11), pp.6311–21.
- Derivery, E. & Gautreau, A., 2010. Evolutionary conservation of the WASH complex, an actin polymerization machine involved in endosomal fission. *Communicative & integrative biology*, 3(3), pp.227–30.
- Ding, L. & Liu, Y., 2015. Borrowing nuclear DNA helicases to protect mitochondrial DNA. *International journal of molecular sciences*, 16(5), pp.10870–87.
- Duquette, A. et al., 2005. Mutations in senataxin responsible for Quebec cluster of ataxia with neuropathy. *Annals of neurology*, 57(3), pp.408–14.
- de Duve, C. et al., 1955. Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *The Biochemical journal*, 60(4), pp.604–17.
- Ebbing, B. et al., 2008. Effect of spastic paraplegia mutations in KIF5A kinesin on transport activity. *Human molecular genetics*, 17(9), pp.1245–52.
- Fink, J.K., 2013. Hereditary spastic paraplegia: clinico-pathologic features and emerging molecular mechanisms. *Acta neuropathologica*, 126(3), pp.307–28.

- Fischer, U. et al., 1995. The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs. *Cell*, 82(3), pp.475–83.
- Futami, K., Shimamoto, A. & Furuichi, Y., 2007. Mitochondrial and nuclear localization of human Pif1 helicase. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 30(9), pp.1685–92.
- Gan, W. et al., 2011. R-loop-mediated genomic instability is caused by impairment of replication fork progression. *Genes & development*, 25(19), pp.2041–56.
- Goizet, C. et al., 2009. SPG15 is the second most common cause of hereditary spastic paraplegia with thin corpus callosum. *Neurology*, 73(14), pp.1111–9.
- Guenther, U.-P. et al., 2009. IGHMBP2 is a ribosome-associated helicase inactive in the neuromuscular disorder distal SMA type 1 (DSMA1). *Human molecular genetics*, 18(7), pp.1288–300.
- Haft, C.R. et al., 2000. Human orthologs of yeast vacuolar protein sorting proteins Vps26, 29, and 35: assembly into multimeric complexes. *Molecular biology of the cell*, 11(12), pp.4105–16.
- El Hage, A. et al., 2014. Genome-wide distribution of RNA-DNA hybrids identifies RNase H targets in tRNA genes, retrotransposons and mitochondria. *PLoS genetics*, 10(10), p.e1004716.
- Hammer, M.B. et al., 2012. Clinical and molecular findings of ataxia with oculomotor apraxia type 2 (AOA2) in 5 Tunisian families. *Diagnostic molecular pathology: the American journal of surgical pathology, part B*, 21(4), pp.241–5.
- Hanna, M.C. & Blackstone, C., 2009. Interaction of the SPG21 protein ACP33/masparidin with the aldehyde dehydrogenase ALDH16A1. *Neurogenetics*, 10(3), pp.217–228.
- Harbour, M.E. et al., 2010. The cargo-selective retromer complex is a recruiting hub for protein complexes that regulate endosomal tubule dynamics. *Journal of cell science*, 123(Pt 21), pp.3703–17.
- Harding, A.E., 1983. Classification of the hereditary ataxias and paraplegias. *Lancet (London, England)*, 1(8334), pp.1151–5.
- Harrison, M.S. et al., 2014. A mechanism for retromer endosomal coat complex assembly with cargo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(1), pp.267–72.
- Hart, G.W. & West, C.M., 2009. Nucleocytoplasmic Glycosylation.
- Hirst, J. et al., 2013. Interaction between AP-5 and the hereditary spastic paraplegia proteins SPG11 and SPG15. *Molecular biology of the cell*, 24(16), pp.2558–69.
- Hirst, J. et al., 2011. The fifth adaptor protein complex. *PLoS biology*, 9(10), p.e1001170.
- Ishiura, H. et al., 2014. Molecular epidemiology and clinical spectrum of hereditary spastic paraplegia in the Japanese population based on comprehensive mutational analyses. *Journal of human genetics*, 59(3), pp.163–72.
- Kaygun, H. & Marzluff, W.F., 2005. Regulated degradation of replication-dependent histone mRNAs requires both ATR and Upf1. *Nature structural & molecular biology*,

12(9),pp.794–800.

- Kazak, L. et al., 2013. A cryptic targeting signal creates a mitochondrial FEN1 isoform with tailed R-Loop binding properties. *PloS one*, 8(5), p.e62340.
- Kim, Y., Kim, H.D. & Kim, J., 2013. Cytoplasmic ribosomal protein S3 (rpS3) plays a pivotal role in mitochondrial DNA damage surveillance. *Biochimica et biophysica acta*, 1833(12), pp.2943–52.
- Kingston, R.E., Chen, C.A. & Rose, J.K., 2003. Calcium phosphate transfection. *Current protocols in molecular biology / edited by Frederick M. Ausubel ... [et al.]*, Chapter 9, p.Unit 9.1.
- Kornfeld, S., 1992. Structure and function of the mannose 6-phosphate/insulinlike growth factor II receptors. *Annual review of biochemistry*, 61, pp.307–30.
- Kutay, U. & Güttinger, S., 2005. Leucine-rich nuclear-export signals: born to be weak. *Trends in cell biology*, 15(3), pp.121–4.
- Lee, A.S., 2014. Glucose-regulated proteins in cancer: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Nature reviews. Cancer*, 14(4), pp.263–76.
- Lee, D.H. & Goldberg, A.L., 1998. Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. *Trends in cell biology*, 8(10), pp.397–403.
- Liu, D. et al., 2014. A novel α/β -hydrolase gene IbMas enhances salt tolerance in transgenic sweetpotato. *PloS one*, 9(12), p.e115128.
- Liu, P. et al., 2008. Removal of oxidative DNA damage via FEN1-dependent long-patch base excision repair in human cell mitochondria. *Molecular and cellular biology*, 28(16), pp.4975–87.
- Luo, W. & Bentley, D., 2004. A ribonucleolytic rat torpedo RNA polymerase II. *Cell*, 119(7), pp.911–4.
- McCray, B.A., Skordalakes, E. & Taylor, J.P., 2010. Disease mutations in Rab7 result in unregulated nucleotide exchange and inappropriate activation. *Human molecular genetics*, 19(6), pp.1033–47.
- Medghalchi, S.M. et al., 2001. Rent1, a trans-effector of nonsense-mediated mRNA decay, is essential for mammalian embryonic viability. *Human molecular genetics*, 10(2), pp.99–105.
- Mili, S. & Piñol-Roma, S., 2003. LRP130, a pentatricopeptide motif protein with a noncanonical RNA-binding domain, is bound in vivo to mitochondrial and nuclear RNAs. *Molecular and cellular biology*, 23(14), pp.4972–82.
- Miller, M.S. et al., 2015. Senataxin suppresses the antiviral transcriptional response and controls viral biogenesis. *Nature immunology*, 16(5), pp.485–94.
- Moreira, M.-C. et al., 2004. Senataxin, the ortholog of a yeast RNA helicase, is mutant in ataxia-ocular apraxia 2. *Nature genetics*, 36(3), pp.225–227.
- Németh, A.H. et al., 2000. Autosomal recessive cerebellar ataxia with oculomotor apraxia (ataxia-telangiectasia-like syndrome) is linked to chromosome 9q34. *American journal of human genetics*, 67(5), pp.1320–6.

- Di Noia, M.A. et al., 2014. The human SLC25A33 and SLC25A36 genes of solute carrier family 25 encode two mitochondrial pyrimidine nucleotide transporters. *The Journal of biological chemistry*, 289(48), pp.33137–48.
- Oh, J. et al., 2005. Differentiation of neuroblastoma cell line N1E-115 involves several signaling cascades. *Neurochemical research*, 30(3), pp.333–48.
- Padmanabhan, K. et al., 2012. Feedback regulation of transcriptional termination by the mammalian circadian clock PERIOD complex. *Science (New York, N.Y.)*, 337(6094), pp.599–602.
- Palomo, G.M. & Manfredi, G., 2015. Exploring new pathways of neurodegeneration in ALS: the role of mitochondria quality control. *Brain research*, 1607, pp.36–46.
- Peng, M. et al., 2008. Primary coenzyme Q deficiency in Pdss2 mutant mice causes isolated renal disease. *PLoS genetics*, 4(4), p.e1000061.
- de Planell-Saguer, M. et al., 2009. Biochemical and genetic evidence for a role of IGHMBP2 in the translational machinery. *Human molecular genetics*, 18(12), pp.2115–26.
- Rabin, B.A. et al., 1999. Autosomal dominant juvenile amyotrophic lateral sclerosis. *Brain : a journal of neurology*, 122 (Pt 8, pp.1539–50.
- Redinbo, M.R., 1998. Crystal Structures of Human Topoisomerase I in Covalent and Noncovalent Complexes with DNA. *Science*, 279(5356), pp.1504–1513.
- Renvoisé, B. et al., 2014. Lysosomal abnormalities in hereditary spastic paraplegia types SPG15 and SPG11. *Annals of clinical and translational neurology*, 1(6), pp.379–389.
- Richard, P., Feng, S. & Manley, J.L., 2013. A SUMO-dependent interaction between Senataxin and the exosome, disrupted in the neurodegenerative disease AOA2, targets the exosome to sites of transcription-induced DNA damage. *Genes & development*, 27(20), pp.2227–32.
- Rizzo, W.B., 2007. Sjögren-Larsson syndrome: molecular genetics and biochemical pathogenesis of fatty aldehyde dehydrogenase deficiency. *Molecular genetics and metabolism*, 90(1), pp.1–9.
- Seaman, M.N., 2007. Identification of a novel conserved sorting motif required for retromer-mediated endosome-to-TGN retrieval. - PubMed - NCBI. *Journal of Cell Science*, pp.2378–2389.
- Seaman, M.N., McCaffery, J.M. & Emr, S.D., 1998. A membrane coat complex essential for 1 endosome-to-Golgi retrograde transport in yeast. *The Journal of cell biology*, 142(3), pp.665–81.
- Seaman, M.N.J., 2004. Cargo-selective endosomal sorting for retrieval to the Golgi requires retromer. *The Journal of cell biology*, 165(1), pp.111–22.
- Simpson, M.A. et al., 2003. Maspardin is mutated in mast syndrome, a complicated form of hereditary spastic paraplegia associated with dementia. *American journal of human genetics*, 73(5), pp.1147–56.
- Skourti-Stathaki, K. & Proudfoot, N.J., 2014. A double-edged sword: R loops as threats to genome integrity and powerful regulators of gene expression. *Genes & development*,

28(13), pp.1384–96.

Skourti-Stathaki, K., Proudfoot, N.J. & Gromak, N., 2011. Human senataxin resolves RNA/DNA hybrids formed at transcriptional pause sites to promote Xrn2-dependent termination. *Molecular cell*, 42(6), pp.794–805.

Soderblom, C. et al., 2010. Targeted disruption of the Mast syndrome gene SPG21 in mice impairs hind limb function and alters axon branching in cultured cortical neurons. *Neurogenetics*, 11(4), pp.369–78.

Steinmetz, E.J. et al., 2006. Genome-wide distribution of yeast RNA polymerase II and its control by Sen1 helicase. *Molecular cell*, 24(5), pp.735–46.

Strohlic, T.I. et al., 2007. Grd19/Snx3p functions as a cargo-specific adapter for retromer-dependent endocytic recycling. *The Journal of cell biology*, 177(1), pp.115–25.

Suraweera, A. et al., 2009. Functional role for senataxin, defective in ataxia oculomotor apraxia type 2, in transcriptional regulation. *Human molecular genetics*, 18(18), pp.3384–96

Trousdale, C. & Kim, K., 2015. Retromer: Structure, function, and roles in mammalian disease. *European journal of cell biology*, 94(11), pp.513–21.

Ursic, D. et al., 1997. The yeast SEN1 gene is required for the processing of diverse RNA classes. *Nucleic acids research*, 25(23), pp.4778–85.

Vantaggiato, C. et al., 2013. Defective autophagy in spastizin mutated patients with hereditary spastic paraparesis type 15. *Brain : a journal of neurology*, 136(Pt 10), pp.3119–39..

Vercauteren, K., Gleyzer, N. & Scarpulla, R.C., 2009. Short hairpin RNA-mediated silencing of PRC (PGC-1-related coactivator) results in a severe respiratory chain deficiency associated with the proliferation of aberrant mitochondria. *The Journal of biological chemistry*, 284(4), pp.2307–19.

Wen, W. et al., 1995. Identification of a signal for rapid export of proteins from the nucleus. *Cell*, 82(3), pp.463–73.

Wilson, L. et al., 2007. Pyruvate induces mitochondrial biogenesis by a PGC-1 alpha-independent mechanism. *American journal of physiology. Cell physiology*, 292(5), pp.C1599–605.

Xia, C.-H. et al., 2003. Abnormal neurofilament transport caused by targeted disruption of neuronal kinesin heavy chain KIF5A. *The Journal of cell biology*, 161(1), pp.55–66..

Yüce, Ö. & West, S.C., 2013. Senataxin, defective in the neurodegenerative disorder ataxia with oculomotor apraxia 2, lies at the interface of transcription and the DNA damage response. *Molecular and cellular biology*, 33(2), pp.406–17.

Zeitlmann, L. et al., 2001. Cloning of ACP33 as a novel intracellular ligand of CD4. *The Journal of biological chemistry*, 276(12), pp.9123–32.