

Université de Montréal

Développement et caractérisation de modèles *C. elegans* pour la maladie de Machado-Joseph

Par
Yasmin Fard Ghassemi

Département de Biochimie et médecine moléculaire
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine en vue de l'obtention du grade de Maître ès
Sciences en Biochimie

Juin, 2016

© Yasmin Fard Ghassemi, 2016
Université de Montréal

Faculté de médecine

Ce mémoire intitulé :
Développement et caractérisation de modèles *C. elegans* pour la maladie de Machado-Joseph

Présenté par :
Yasmin Fard Ghassemi

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Louis Rokeach
Président-rapporteur

Dr. J. Alex Parker
Directeur de recherche

Dr. Zoha Kibar
Membre du jury

Résumé

Les maladies à expansion de polyglutamine sont un ensemble de troubles neurodégénératives héréditaires se développant lorsqu'il y a répétitions de trinuécléotides CAG dans les gènes causatifs au-delà d'un certain seuil. L'expansion des répétitions de trinuécléotides CAG entraîne des désordres neurologiques héréditaires précoces, dont de multiples formes d'ataxie spinocérébelleuse (SCA). Parmi celles-ci, le type le plus commun et dominant est l'ataxie spinocérébelleuse de type 3 (SCA3), aussi connue sous le nom de la maladie de Machado-Joseph (MMJ). Ce dernier est un désordre neurologique progressif autosomique dominant. Le gène causatif de MMJ est *ATXN3* (*ATAXINE-3*). Plusieurs études récentes suggèrent une association entre ce gène et la modulation du stress du réticulum endoplasmique (RE) (1-8). Lors de ce travail de maîtrise, des souches transgéniques de *C. elegans* exprimant les formes sauvage et mutante du gène *ATXN3* humain ont été générées.

Les résultats suggèrent des phénotypes importants chez la souche transgénique mutante associés à la pathologie humaine: défaut de motilité, longévité réduite et profil neurodégénératif considérable. Ceci dit, ces résultats nous ont poussé à vouloir déterminer si l'utilisation des composés chimiques, connus en tant que modulateurs du stress du RE et possédant des rôles neuroprotecteurs, sont capables de restaurer les phénotypes notés. Les composés utilisés, c'est-à-dire le Bleu de Méthylène, le Salubrinal et le Guanabenz, ont démontré une capacité de corriger les phénotypes rapportés dans la souche transgénique mutante. De plus, ces composés ont aussi été en mesure de prévenir une augmentation du niveau du stress oxydatif et de la réponse au stress du RE exhibé chez les vers mutants. Par le

développement de nouveaux modèles *C. elegans* pour la MMJ, où il y a expression du gène *ATXN3* complet dans les motoneurones, il a été possible de trouver qu'une modulation chimique du stress du RE peut réduire considérablement la neurodégénérescence et par conséquent, être une possible nouvelle approche thérapeutique pour traiter cette pathologie.

Mots clés

Maladie à expansion de polyglutamine, répétitions de trinuéotides, MMJ, désordre neurologique, *ATXN3*, *C. elegans*, défaut de motilité, longévité, motoneurones, neurodégénérescence, stress oxydatif, stress du RE, composés neuroprotecteurs, modulateurs du stress du RE.

Abstract

Polyglutamine expansion diseases are a class of dominantly inherited neurodegenerative disorders that develop when a CAG repeat in the causative genes is unstably expanded above a certain threshold. The expansion of trinucleotide CAG repeats causes hereditary adult-onset neurodegenerative disorders such as multiple forms of spinocerebellar ataxia (SCA). The most common dominantly inherited spinocerebellar ataxia is the type 3 (SCA3) also known as Machado-Joseph disease (MJD), an autosomal dominant, progressive neurological disorder. The gene causing MJD is *ATXN3* (*ATAXIN-3*): MJD is caused by an abnormal CAG trinucleotide repeat expansion in the *ATXN3* gene. Several recent studies have shown that this gene is associated with endoplasmic reticulum (ER) stress (1-8). In this study, we generated transgenic *C. elegans* strains expressing wild type or mutant human *ATXN3* genes and tested them for recovery of locomotor phenotype, lifespan and neurodegeneration phenotypes upon treatment with compounds known to modulate ER stress and having neuroprotective roles. We observed differences between both transgenic lines and found that the motility defects, the reduced lifespan and the neurodegeneration can be rescued by methylene blue, guanabenz and salubrinal. These compounds were also able to prevent the oxidative stress and the ER stress response induced by mutant transgenic worms. We introduce novel *C. elegans* models for MJD based on the expression of full-length *ATXN3* in GABAergic motor neurons. Using these models we discovered that chemical modulation of the ER unfolded protein response reduced neurodegeneration and could be a new therapeutic approach for the treatment of MJD.

Key words

Polyglutamine expansion diseases, MJD, trinucleotide repeats, neurological disorder, *ATXN3*, *C. elegans*, motility defects, lifespan, motor neurons, neurodegeneration, oxidative stress, ER stress, neuroprotective compounds, ER stress modulators.

Tables des matières

RÉSUMÉ	I
MOTS CLÉS	II
ABSTRACT	III
KEY WORDS	IV
LISTE DES TABLEAUX	VII
LISTE DES FIGURES	VIII
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	IX
REMERCIEMENTS	XI
A. INTRODUCTION	1
I. LES MALADIES À EXPANSION DE POLYGLUTAMINE.....	1
I.1. Généralité sur les maladies à répétitions.....	1
I.2. Origines et caractéristiques des maladies à expansion de polyglutamine.....	2
I.3. L'instabilité causée par l'expansion des protéines poly-Q.....	4
I.4. Les causes possibles de la toxicité générée par expansion des protéines poly-Q.....	8
I.5. Stratégies thérapeutiques.....	10
II. L'ATAXIE SPINOCÉRÉBELLEUSE DE TYPE 3 (SCA3).....	14
II.1. Origines et caractéristiques de SCA3.....	14
II.2. Profil clinique de la MMJ.....	14
II.3. Héritage et génétique de la MMJ.....	16
III. ATAXINE-3.....	18
III.1. Caractéristiques et structure de la protéine ataxin-3.....	18
III.2. Fonctions et rôles biologiques.....	20
III.2.1. Voies de l'homéostasie protéique (« protéostasis »).....	20
III.2.2. Régulation de la transcription.....	22
III.2.3. Les autres rôles de la protéine ataxine-3.....	22
IV. LE MODÈLE GÉNÉTIQUE À L'ÉTUDE, <i>C. ELEGANS</i>	24
IV.1. <i>C. elegans</i>	24
IV.1.1. Origine et caractéristiques.....	24
IV.1.2. ATXN3 et <i>C. elegans</i>	27
IV.1.3. Études précédentes sur ATXN3 utilisant <i>C. elegans</i> comme modèle.....	28
IV.1.4. Description de nos modèles transgéniques <i>C. elegans</i> utilisés.....	29
IV.2. Autres organismes modèles associés avec ATXN3 et MMJ.....	30
IV.3. <i>C. elegans</i> , ATX-3 et stress du réticulum endoplasmique.....	33
IV.3.1. Réticulum endoplasmique et la réponse UPR (« unfolded protein response »).....	33
IV.3.2. Lien entre <i>C. elegans</i> , ATX-3 et stress du réticulum endoplasmique.....	37
V. BUT DE CETTE ETUDE.....	39
B. MATÉRIELS ET MÉTHODES	41
SOUCHES <i>C. ELEGANS</i>	41
LES SOUCHES TRANSGÉNIQUES ATXN3 ET LES CONSTRUCTIONS DE PLASMIDE.....	41
POPULATIONS AVEC ÂGE SYNCHRONISÉ.....	42
TEST DE PARALYSIE EN CULTURE SOLIDE.....	43
TEST DE LONGÉVITÉ.....	43
MICROSCOPIE À FLUORESCENCE.....	44

PRIMERS UTILISÉS POUR PCR SEMIQUANTITATIVE.....	45
TEST DES COMPOSÉS CHIMIQUES SUR AGAR	46
TEST DES COMPOSÉS EN MILIEU LIQUIDE	46
LYSATS DE NÉMATODES	47
LYSATS DE CELLULES.....	47
QUANTIFICATION PROTÉIQUE	48
IMMUNOBUVARDAGE DE TYPE WESTERN.....	48
STATISTIQUES	49
C. MANUSCRIT.....	50
ABSTRACT.....	51
BACKGROUND.....	52
RESULTS.....	55
DISCUSSION	61
MATERIALS AND METHODS.....	70
REFERENCES.....	78
FIGURE LEGENDS.....	82
D. DISCUSSION	88
DÉVELOPPEMENT DE NOUVELLES SOUCHES TRANSGÉNIQUES MMJ CHEZ C. ELEGANS.....	88
DÉFAUT DE MOTILITÉ, UNE RÉDUCTION DE LA LONGÉVITÉ ET UNE NEURODÉGÉNÉRESCENCE CHEZ LA SOUCHE C. ELEGANS MUTANTE.....	89
UNE RESTAURATION PARTIELLE DES FONCTIONS CHEZ LA SOUCHE MUTANTE C. ELEGANS PAR L'UTILISATION DES COMPOSÉS CHIMIQUES NEUROPROTECTEURS	93
PRÉVENTION DU STRESS OXYDATIF ET DU STRESS DU RE CAUSÉS PAR L'EXPANSION DES RÉPÉTITIONS DE TRINUCLÉOTIDES À PARTIR DES MOLÉCULES MODULATRICES DU RE	95
LE LIEN ENTRE CETTE ÉTUDE ET DES EXPÉRIENCES FUTURES	98
E. CONCLUSION.....	100
BIBLIOGRAPHIE.....	103

Liste des tableaux

A. Introduction

Tableau I : Liste des maladies à expansion de polyglutamine.

Liste des figures

A. Introduction

Figure 1.1 : Instabilité produite durant la réplication de l'ADN

Figure 1.2 : Modèle de réparation pour l'expansion des répétitions de trinuécléotides par excision de base

Figure 1.3 : Modulation des mécanismes responsable de la toxicité des protéines poly-Q pour traiter la MMJ

Figure 1.4 : Schéma structurel de la protéine ATX-3.

Figure 1.5 : Le cycle de vie de *C. elegans*.

Figure 1.6 : Les neurones GABAergiques.

Figure 1.7 : Les mécanismes des médiateurs principaux de la réponse UPR

C. Manuscrit

Figure 1: Transgenic *C. elegans* ATXN3 models.

Figure 2: Lifespan and neuronal phenotypes in ATXN3 transgenics.

Figure 3: Methylene blue, salubrinal or guanabenz suppress paralysis during aging and, extend lifespan in ATXN3-CAG89 worms.

Figure 4: Methylene blue, salubrinal or guanabenz suppress acute paralysis in ATXN3-CAG89 transgenics.

Figure 5: Rescue of motor neuron degeneration by small molecules in ATXN3-CAG89 transgenics.

Figure 6: Reduction of oxidative stress in ATXN3-CAG89 transgenics by methylene blue, guanabenz and salubrinal.

Figure 7: Methylene blue, guanabenz and salubrinal rescue the ER stress response in ATXN3-CAG89 transgenic worms.

Liste des sigles et abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ARN	Acide ribonucléique
FMR1	Fragile X mental retardation 1
Poly-Q	Polyglutamine
<i>ATXN3</i>	Gène humain ataxine-3
<i>atx-3</i>	Gène <i>C. elegans</i> ataxine-3
ATX-3	Protéine ataxine-3
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
SCA	Ataxie spinocérébelleuse
SCA3	Ataxie spinocérébelleuse de type 3
MMJ	Maladie de Machado-Joseph
SLA	Sclérose Latérale Amyotrophique
BM	Bleu de Méthylène
Sal	Salubrinal
Gua	Guanabenz
kDa	Kilo Dalton
NGM	Nematode Growth Media
RE	Réticulum endoplasmique
SLN	Signal de Localisation Nucléaire
SEN	Séquence Exports Nucléaires
DUB	Désubiquitination
UIM	domaine d'Interaction avec Ubiquitine
UPR	Réponse de protéine mal conformée (Unfolded protein response)
UTR	Région non traduit (Untranslated Region)
MMP-2	Matrix Metalloproteinase-2
AAP	Accumulation-associated protein
SDF1 α	Stromal cell-derived factor 1 alpha
A β	Amyloid beta
IL-1ra	Interleukin 1 receptor antagonist
IL-1 β	Interleukin 1 beta
MAP2	Microtubule-associated protein 2
CBP	CREB-binding protein
p300	protéine p300
PCAF	p300/CBP-associated factor
HSF-1	Heat Shock Factor-1
IIS	Insulin/insulin-like growth factor signaling
MMR	Mismatch repair
GRP94/HSP90B1	Heat shock protein 90kDa beta member 1
GRP78/Bip	Binding immunoglobulin protein
PCR	Réaction en chaîne par polymérase (Polymerase chain reaction)
ARNm	ARN messenger
XBP-1	X box binding protein 1

ATF6	Activating transcription factor 6
IRE1	Inositol-requiring enzyme 1
PERK	PRKR-like ER kinase
HSP-4	Heat shock protein 4
eIF2 α	Eukaryotic translation initiation factor 2 alpha
MOD-5	Modulation of locomotion defective 5
SERT	Serotonin reuptake transporter
FOXO	Forkhead box O subclass
FDA	Food and Drug Administration

Remerciements

Je voudrais d'abord et avant tout remercier infiniment mon directeur de recherche, Dr Alex Parker. En effet, l'accomplissement de mon cheminement de maîtrise n'aurait pas été possible sans son aide, sa patience, ses recommandations et son encadrement. Il m'a offert deux projets extraordinaires qui m'ont permis d'apprendre grandement sur le monde scientifique et aussi, m'ont permis de connaître la communauté scientifique travaillant sur notre organisme modèle, *C. elegans*. Merci pour toutes les conférences auxquelles j'ai eu la chance d'assister et de présenter, avec une grande passion, mes projets de recherche. Un grand merci pour tout.

Je voudrais ensuite remercier les magnifiques membres du laboratoire du Dr Parker: Julie, Sarah, Claudia, Kathrin, Arnaud, Audrey, James, Gilles et Constantin. En effet, grâce à vous, l'ambiance du laboratoire était géniale et, chaque matin, j'avais hâte de venir vous voir et accomplir mes projets de recherche. Merci pour votre bonne humeur, votre présence et votre aide. Nous avons vécu beaucoup de beaux moments ensemble depuis deux ans et, à vrai dire, je peux définitivement dire que je vous considère comme ma deuxième famille. Merci à vous tous.

Merci aux membres de mon jury d'avoir accepté de lire et d'évaluer mon mémoire de maîtrise. Merci de m'accorder votre temps et votre aide.

Enfin, je souhaiterais terminer en remerciant mes amis et membres de ma famille pour leurs soutien et encouragements. Merci d'être toujours présents pour moi, peu importe la situation. Je voudrais faire un remerciement spécial à ma mère. C'est grâce à elle et à tous ses encouragements et son soutien inconditionnel que je suis à ce stade de ma vie en ce moment. Merci infiniment pour tout, de faire de moi la personne que je suis aujourd'hui.

Encore une fois un GRAND MERCI à toutes et à tous!

A. Introduction

I. Les maladies à expansion de polyglutamine

I.1. Généralité sur les maladies à répétitions

La répétition de trinuécléotides n'a été considérée comme une maladie qu'en 1991, suite à l'identification du syndrome de l'X fragile (dû à une expansion des trinuécléotides CGG/CCG dans le gène *FMRI*) et à la maladie de Kennedy (due aux répétitions de nucléotides CAG/CTG dans le gène du récepteur des androgènes localisé sur le chromosome X) (9-12). Ceci dit, les maladies à répétitions sont un ensemble de maladies héréditaires se développant lorsqu'il y a des répétitions des nucléotides dans une partie spécifique d'un gène donné (11,13,14). La sévérité de ces maladies dépend de la longueur et du taux des répétitions de nucléotides (12). Les répétitions de nucléotides sont considérées fréquentes dans le génome humain et leur longueur est variable. Ces répétitions de trois, quatre, cinq ou même six nucléotides peuvent causer de nombreux changements pathologiques entraînant des troubles neurologiques et neuromusculaires chez l'individu atteint (11,14). Ces maladies sont divisées en trois catégories : les maladies à expansion de polyglutamine, les maladies à expansion non-polyglutamiques et les maladies génétiques de polyalanine. Dans le cas de notre étude, nous nous intéressons aux maladies à expansion de polyglutamine. La raison expliquant ce choix est, entre autres, due au fait que la prévalence de ce type de maladies à répétition est sujet à

une augmentation importante dans la population générale sans présence d'un traitement pharmacologique efficace.

I.2. Origines et caractéristiques des maladies à expansion de polyglutamine

Les maladies à expansion de polyglutamine (poly-Q) sont une classe de maladies neurodégénératives héréditaires dominantes (à l'exception de la maladie de Kennedy étant considérée comme une maladie rare récessive liée à l'X) se développant lorsqu'il y a une expansion anormale des trinucleotides cytosine-alanine-guanine (CAG) dans la région codante du gène (1,15-18). Cette répétition de trinucleotides CAG est traduite, lors de la synthèse protéique, en un ensemble de résidus de glutamine formant une accumulation de protéines poly-Q entraînant une série de complications et de changements délétères chez les individus atteints de ces maladies : modification du protéome menant à des altérations fonctionnelles, génération d'espèces protéiques toxiques poly-Q, agrégations protéiques, dérégulation transcriptionnelle, stress protéotoxique et dysfonctions mitochondriales (16,18-21). Toutefois, il est à noter que les mécanismes exacts de ces maladies restent encore à découvrir.

Les maladies à expansion de poly-Q regroupent neuf maladies neurodégénératives : la maladie de Huntington, la maladie de Kennedy, la maladie de Naito-Oyanagi et six formes de l'ataxie spinocérébelleuse (SCA 1, 2, 3, 6, 7, et 17) (Tableau I) (1,18,22). Elles sont caractérisées par une augmentation des protéines mal repliées et d'agrégation dans les inclusions ubiquitaires nucléaire et cytoplasmique (23). Ces maladies sont principalement caractérisées par une perte sélective des neurones, surtout au niveau du cervelet, du tronc cérébral et du tractus spinal due

à l'agrégation des protéines poly-Q et l'effet toxique engendré par celles-ci (18,23). Cet effet toxique est observé dans les neuf maladies neurodégénératives des maladies à expansion de poly-Q (24). Une fois que cette répétition a atteint un seuil pathologique sur une des allèles (Tableau I), un ensemble de complications physiques et psychologiques (par exemple, anxiété et limitation dans les interactions sociales) est observé chez l'individu atteint (1,25). Elles sont considérées comme étant des maladies à pénétrance complète, toutefois, dans certains cas, si l'allèle est d'une longueur intermédiaire (entre 20 à 40 répétitions de CAG), la pénétrance peut être réduite (26,27).

L'ataxie spinocérébelleuse de type 3 (SCA3) et la maladie de Huntington possèdent la plus haute prévalence mondiale parmi les neuf maladies neurodégénératives à expansion de poly-Q (18,28). SCA3, le type de l'ataxie spinocérébelleuse la plus commune, est aussi connue sous le nom de la maladie de Machado-Joseph (MMJ) (18,29).

Tableau I : Liste des maladies à expansion de polyglutamine (1).

Disease name	Mutated gene	Protein product	Putative function	CAG repeat size		Regions most affected
				Normal	Pathogenic	
HD	<i>HD</i>	Huntingtin	Signaling, transport, transcription	6–34	36–121	Striatum, cerebral cortex
DRLPA	<i>DRPLA</i>	Atrophin 1	Transcription	7–34	49–88	Cerebellum, cerebral cortex, basal ganglia, Luys body
SBMA	<i>AR</i>	Androgen receptor	Steroid-hormone receptor	9–36	38–62	Anterior horn and bulbar neurons, dorsal root ganglia
SCA1	<i>SCA1</i>	Ataxin-1	Transcription	6–39	40–82	Cerebellar Purkinje cells, dentate nucleus, brainstem
SCA2	<i>SCA2</i>	Ataxin-2	RNA metabolism	15–24	32–200	Cerebellar Purkinje cells, brainstem, frontotemporal lobes
SCA3	<i>ATXN3/MJD/SCA3</i>	Ataxin-3	Deubiquitinating activity and transcription regulation	10–51	55–87	Cerebellar dentate neurons, basal ganglia, brainstem, spinal cord
SCA6	<i>CACNA1A</i>	$CACNA1_A$	P/Q-type $\alpha 1A$ calcium channel subunit	4–20	20–29	Cerebellar Purkinje cells, dentate nucleus, inferior olive
SCA7	<i>SCA7</i>	Ataxin-7	Transcription	4–35	37–306	Cerebellum, brainstem, macula, visual cortex
SCA17	<i>SCA17</i>	TBP	Transcription	25–42	47–63	Cerebellar Purkinje cells, inferior olive

Abbreviations: HD, Huntington's disease; DRPLA, dentatorubral-pallidolusian atrophy; SBMA, spinal and bulbar muscular atrophy; SCA, spinocerebellar ataxia; MJD, Machado-Joseph disease; $CACNA1_A$, calcium channel, voltage dependent, P/Q type, $\alpha 1A$ subunit; TBP, TATA box binding protein.

I.3. L'instabilité causée par l'expansion des protéines poly-Q

Les séquences répétitives sont considérées comme une forme de microsatellites comprenant entre 1 à 6 nucléotides se répétant plusieurs fois. Les microsatellites forment environ 30% du génome humain et sont situés dans les régions codantes et non-codantes. Les poly-Q constituent le groupe de microsatellite le plus commun, avec des longueurs de nucléotides variables (14,30). Les variations dans la longueur des nucléotides dans la séquence d'ADN entraînent une instabilité génique et celle-ci peut mener à des complications sérieuses dans l'organisme de l'individu atteint allant jusqu'à l'apparition des maladies.

Les changements dans la longueur des répétitions de trinuécléotides peuvent être substantiels. Dans les régions codantes, des expansions d'environ 29 à 35 nucléotides par génération suffisent pour atteindre un état pathologique. Par exemple, dans le cas de SCA3, une répétition de 40 nucléotides suffit pour former une expansion dans environ 80 à 90% des cas au moment de la transmission parentale (31). Contrairement à l'expansion des nucléotides dans les régions codantes, dans les parties non-codantes une expansion d'environ 100 à 1000 nucléotides par génération est nécessaire pour atteindre le seuil critique et pathologique (31). Toutefois, dans les deux cas, lorsqu'il y a une augmentation du nombre de répétitions de nucléotides et leur arrivée à un seuil critique entraîne des expansions successives et une augmentation de l'instabilité génique menant à un stade pathologique. Aussi, une fois la maladie développée, elle devient de plus en plus sévère avec une apparition plus précoce à chaque génération successive. Ceci représente le phénomène d'anticipation (13,31,32). En effet, plus la longueur des répétitions est longue, plus l'apparition des symptômes est précoce et cette répétition corrèle avec le temps : avec l'avancement chronologique, la longueur des

répétitions augmente et par conséquent, dans la génération suivante, le moment d'apparition de la maladie est à un stade beaucoup plus précoce comparativement à la génération précédente (33).

L'expansion des nucléotides survient surtout durant la transmission de l'allèle du parent à l'enfant, mais aussi, lors du développement de la progéniture et de la différenciation des tissus. Le parent duquel l'allèle est transmis est considéré comme étant un facteur important : lorsque l'allèle transmis est de provenance paternelle, une augmentation de l'instabilité est notée. En effet, la probabilité de développer une instabilité est grandement augmentée lorsque le père est à l'origine de l'expansion et ceci est le cas pour de nombreuses maladies. Ces maladies regroupent celles causées par une expansion des répétitions trinuécléotides dans les régions codantes, dont les maladies à expansion de polyglutamine et, les maladies causées par une expansion des répétitions trinuécléotides dans les régions non-codantes, comme l'ataxie spinocérébelleuse de type 12 (SCA12) (13).

De plus, la formation des boucles d'ADN lors de la réplication et/ou de la réparation est une des étapes cruciales dans les mécanismes d'expansion des nucléotides ou dans leurs délétions. En effet, la réplication et la réparation de l'ADN sont deux mécanismes jouant des rôles essentiels dans cette variabilité et instabilité génique. En effet, elles peuvent être des causes du développement d'un changement au niveau des gamètes et par conséquent, aux modifications observées dans les générations successives. Le glissement de l'ADN polymérase sur le brin d'ADN est considéré comme étant le principal mécanisme d'instabilité des répétitions trinuécléotides.

Durant la réplication, les unités des répétitions trinuécléotides peuvent être désalignés et par conséquent, mener à la formation d'une boucle d'ADN hélicoïdal supplémentaire externe entraînant une augmentation ou une diminution de la longueur des répétitions. Ce processus dépend du mécanisme entrepris: (i) il y aura une augmentation de la longueur des répétitions trinuécléotides s'il y a formation de la boucle externe sur le brin fille ou (ii) une diminution de la longueur des répétitions trinuécléotides s'il y a formation de cette boucle supplémentaire externe sur le brin mère. Dans le premier cas, il y aura une expansion et dans le second, une contraction et une délétion des répétitions ; une instabilité est observée au niveau des deux cas (31) (**Figure 1.1**).

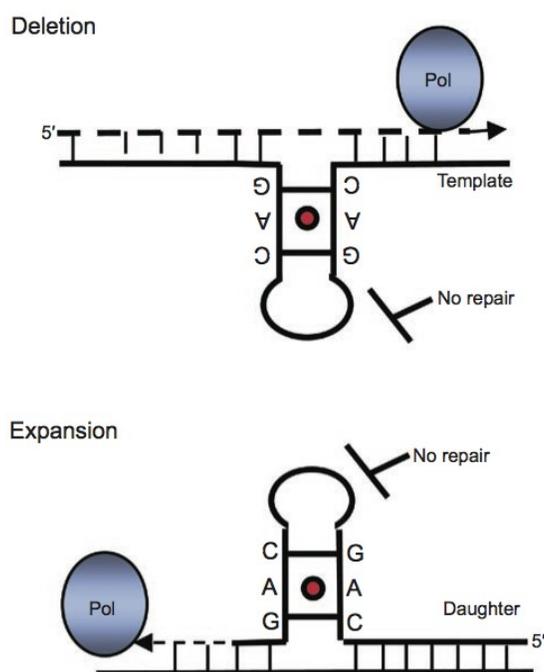


Figure 1.1 : Instabilité produite durant la réplication de l'ADN (31).

Schéma démontrant les deux possibles conformations pouvant être prises par les brins d'ADN lors de la réplication due à l'instabilité causée par les répétitions de trinuécléotides.

Pour ce qui est de la réparation de l'ADN, le modèle de réparation par excision de base est le modèle considéré pour la réparation de l'expansion des répétitions des trinuécléotides. Avec le vieillissement, la respiration mitochondriale forme davantage de dommages oxydatifs endogènes et mène ainsi à des lésions oxydatives de la séquence d'ADN. Ces lésions oxydatives ont tendance à s'accumuler dans les répétitions trinuécléotides avec l'âge. Ceci dit, il existe une corrélation positive entre les lésions oxydatives et l'âge. Dans une situation normale, par le système d'excision de base, suite au clivage du brin à l'endroit où il y a présence des bases endommagées par l'oxydation, il y aura formation d'une épingle à cheveux (regroupant les répétitions trinuécléotides inappropriés) et déplacement du brin pour le processus de réparation (dans le but de combler les lacunes) et une fois la réparation achevée, il y aura ligature du brin clivée. Ce sont les protéines MMR (« *Mismatch repair* », protéines responsables de la réparation des mésappariements ; dans ce cas, il s'agit des protéines Msh2/Msh3) qui permettent de garder la structure de l'épingle à cheveux jusqu'à la réparation des dommages et la ligature du brin. Lorsqu'il y a un dysfonctionnement au niveau du processus d'excision de base ou des protéines MMR, il y a une absence de réparation. Cette absence de réparation mène à une expansion des répétitions trinuécléotides et par conséquent, à la production d'une instabilité (13,31) (**Figure 1.2**). Ces altérations dans la séquence d'ADN permettent la création de diversité dans le génome, un facteur requis pour l'évolution. Il est à noter que toutes ces variations dans la séquence d'ADN ne sont pas nécessairement responsables du développement d'un état pathologique ; dépendamment de plusieurs facteurs dont la longueur et la sévérité de l'instabilité des répétitions seules certaines des variations survenues dans le génome sont la cause des maladies (13).

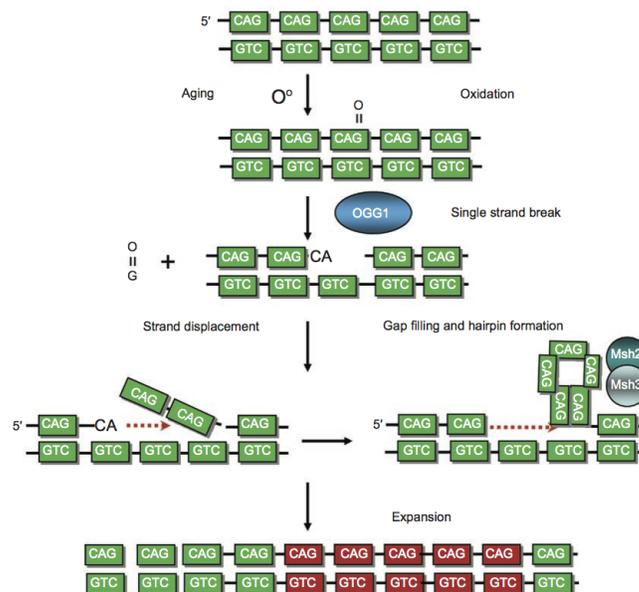


Figure 1.2 : Modèle de réparation pour l'expansion des répétitions de trinuécléotides par excision de base (31).

Schéma démontrant le principe de la méthode de réparation par excision de base. Il s'agit d'un exemple pour la maladie de Huntington, une maladie neurodégénérative à expansion de polyglutamine.

I.4. Les causes possibles de la toxicité générée par expansion des protéines poly-Q

Plusieurs mécanismes sont déclenchés par l'expansion des protéines poly-Q : (i) altérations fonctionnelles (des changements au niveau des interactions intermoléculaires, par exemple), (ii) génération d'oligomères toxiques due à la transition à un état d'agrégation, (iii) génération de fragments poly-Q toxiques (iv) changements transcriptionnels dus à l'interaction des poly-Q avec des facteurs de transcription spécifiques (v) stress protéotoxique dû à la perturbation des systèmes du contrôle de la qualité des cellules (vi) dysfonction mitochondriale et/ou (vii) agrégation des protéines (16,18-21,23). Une des caractéristiques

fondamentales des maladies à l'expansion de poly-Q est l'agrégation des protéines ou, la formation des corps d'inclusion enfermant les protéines poly-Q dans le noyau et/ou le cytoplasme des neurones (et dans les cellules gliales dans certains rares cas) (1,16,34).

Pendant de nombreuses années, les corps d'inclusion ont été associés avec l'état pathogénique des maladies à expansion de poly-Q ; ils étaient considérés comme étant la cause de la toxicité. Toutefois, les recherches récentes suggèrent plutôt un rôle protecteur pour ces corps d'inclusion : en effet, il a été démontré que ces corps sont les résultats des mécanismes cellulaires protecteurs déclenchés contre la toxicité produite par l'expansion et le mal repliement des protéines poly-Q (1,16,35-37). Afin d'appuyer cette proposition, dans une des nombreuses études effectuées sur les maladies à expansion de poly-Q, il a été démontré que la formation des corps d'inclusion mène une réduction de l'expression de protéine huntingtine mutante (un sous-ensemble des maladies à l'expansion de poly-Q) et aussi une diminution des risques de la mort neuronale et de dysfonction neuronale (35). Les mêmes observations ont été faites pour l'agrégation protéique, le marqueur des maladies à l'expansion de poly-Q (35,38).

Aussi, il a été démontré que la toxicité produite par les protéines poly-Q n'est pas seulement associée à l'expansion des protéines obtenues par la traduction des répétitions trinuécléotides, mais également, aux répétitions trinuécléotides de l'ARN lui-même. En effet, l'ARN, par le recrutement des protéines intracellulaires spécifiques, peut aussi être considérée comme étant une cause possible de la toxicité produite par l'expansion des protéines poly-Q (1,39).

Les maladies à expansion de poly-Q partagent de nombreux aspects communs permettant ainsi une compréhension plus approfondie et généralisée des mécanismes menant à leur état pathogénique. Toutefois, comme pour toutes autres maladies, elles possèdent aussi

des aspects qui leur sont propres. La différence observée au niveau du profil neurodégénératif et de la sévérité des symptômes pour chacune des maladies à l'expansion de poly-Q est entre autres due en partie au fait que chacune des polypeptides poly-Q est insérée dans des protéines hôtes différentes avec des propriétés distinctes (structure, localisation subcellulaire, abondance, etc). Ceci explique au moins en partie la différence observée chez les personnes atteintes des différentes formes des maladies à l'expansion de poly-Q (15).

I.5. Stratégies thérapeutiques

À ce jour, aucun traitement n'a été développé pour traiter spécifiquement les maladies à expansion de polyglutamine. Il existe des traitements pharmacologiques symptomatiques pour traiter certains des symptômes cliniques comme la spasticité, le parkinsonisme, la dystonie et les crampes musculaires (40-45). Toutefois, il n'existe aucun médicament pour l'ataxie. Le trouble de la coordination des mouvements volontaires dû à un problème au niveau du système nerveux et plus précisément au niveau du cervelet, contrôlant la coordination des muscles, est le symptôme le plus commun de ces maladies (29,38). Pour l'instant, les traitements de physiothérapie et d'ergothérapie sont les seules options disponibles afin de diminuer les symptômes associés à l'ataxie (29).

Même si aucun traitement pharmacologique n'est disponible, il existe plusieurs approches thérapeutiques possibles. Deux cibles thérapeutiques principales sont présentes : (i) l'altération du niveau des protéines toxiques et (ii) la modulation des mécanismes responsables de la toxicité des protéines poly-Q. Pour ce qui est de la première approche, il s'agit d'une

stratégie commune pour les maladies héréditaires dont l'étiologie héréditaire est connue. Cette stratégie est l'extinction de gène (processus épigénétique empêchant la production d'une protéine à partir d'un gène ; il s'agit d'un processus qui rend directement silencieux le gène causatif). Il a été démontré dans un modèle de souris transgénique de la maladie de Machado-Joseph (MMJ) exprimant une expansion de la protéine humaine ATX-3, une correction des phénotypes associés avec MMJ, à savoir une réduction des déficits moteurs, de la formation des inclusions et des dommages neuronaux, une fois l'expression de la protéine pathogénique (ATX-3) rendue silencieuse (46). La méthode utilisée pour l'extinction de gène pour plusieurs maladies génétiques est l'ARN interférent (ARNi). Cette méthode a également été démontrée prometteuse pour les maladies à expansion de poly-Q (46,47). D'après plusieurs recherches effectuées chez différents modèles (cellules, rats), l'utilisation de l'ARNi a permis une diminution de la production des protéines poly-Q expansées, une réduction de la formation des inclusions et de la dysfonction neuronale (48-50).

Une autre approche thérapeutique possible à envisager serait la modulation des mécanismes responsable de la toxicité des protéines poly-Q. Par exemple (i) en diminuant les événements protéolytiques, il y aurait une diminution des fragments toxiques ; (ii) en contrôlant les altérations au niveau du noyau et par la modulation de la formation des agrégations, il est possible de diminuer les effets néfastes produits par les espèces toxiques ; (iii) une augmentation de la dégradation des protéines poly-Q à partir des mécanismes protéosomiaux, lysosomiaux et autophagosomiaux permettrait une diminution des espèces toxiques dans les cellules ; (iv) une diminution des conséquences de la toxicité des protéines poly-Q, dont l'amélioration de la fonction mitochondriale permettrait une augmentation

bénéfique de la viabilité cellulaire (38) (**Figure 1.3**). Le point (iii) suggérant une diminution du niveau des protéines poly-Q en augmentant davantage leur dégradation par la stimulation des systèmes cellulaires régulateurs serait entre autres une alternative intéressante à entreprendre. Il serait possible de mettre au point cette approche par l'utilisation des solutions qui ciblent et induisent davantage par l'exemple l'autophagie (1).

Les stratégies mentionnées ci-haut sont des approches intéressantes à étudier en profondeur afin de trouver un traitement pharmacologique précis pour la plupart des symptômes des maladies à expansion de poly-Q dont l'ataxie.

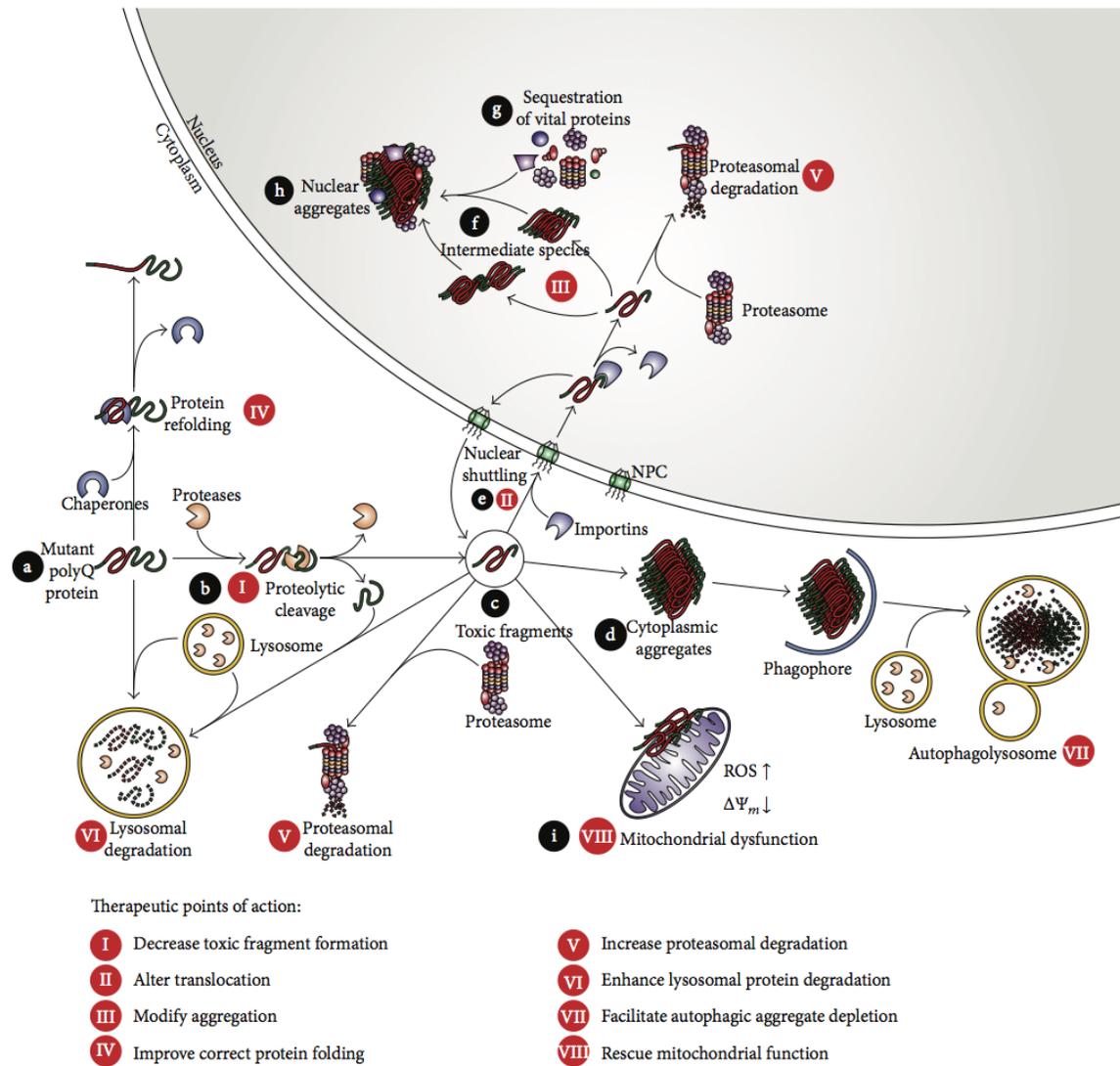


Figure 1.3 : Modulation des mécanismes responsables de la toxicité des protéines poly-Q pour traiter MMJ (38).

Une stratégie thérapeutique possible serait le contrôle des voies intracellulaires responsables de la toxicité causée par l'expansion de poly-Q. Par cette façon, on cible directement les causes produisant une toxicité et par conséquent, l'élimination partielle ou totale des effets néfastes est assurée.

II. L'ataxie spinocérébelleuse de type 3 (SCA3)

II.1. Origines et caractéristiques de SCA3

SCA3 est considérée comme étant la forme d'ataxie spinocérébelleuse la plus commune mondialement parmi les 30 différentes formes de l'ataxie identifiées (29,51-53). Elle est aussi connue sous le nom de la maladie de Machado-Joseph (MMJ). Ce n'est qu'en 1972 que cette maladie a été découverte pour la première fois suite à sa manifestation chez des familles acores/ portugaises (54). La MMJ est un désordre neurologique progressif autosomique dominant causée par une expansion instable des trinuécléotides CAG dans la région codante du gène *ATXN3* (55,56). Ce trouble neurologique représente une incidence mondiale d'environ 0.2% (29). Ce trouble neurologique est accompagné par une neurodégénérescence sélective dans le système nerveux et principalement dans le cervelet, les noyaux gris centraux, la substance noire, le striatum, le tronc cérébral et la moelle épinière (1,22,57).

II.2. Profil clinique de la MMJ

L'âge de détection des manifestations de la maladie varie grandement d'un individu à un autre. L'âge moyen où débutent les premiers signes de la maladie est autour de 40 ans. Toutefois, des cas extrêmes se situant entre 4 et 70 ans ont aussi été reportés (58). En moyenne les individus atteints possèdent une durée de vie d'environ 21 ans suite à la détection de la maladie (53).

La maladie de Machado-Joseph est caractérisée par un haut degré de pléomorphisme. En effet, ce pléomorphisme est observé dans la variabilité existant quant à l'âge se manifestant les premiers symptômes de cette maladie, mais aussi, dans les signes neurologiques ainsi que leur degré de sévérité dépendamment de chaque personne. Même à cette différence, il existe quelques ressemblances entre les individus atteints de cette maladie. Par exemple, chez la majorité des patients, le principal et premier symptôme noté est l'ataxie (dans 92.4% des cas à l'étude) et les symptômes de vision double (53). D'autres symptômes fréquents sont la dystonie, la rigidité, la spasticité, des crampes musculaires, des fasciculations, la neuropathie périphérique, un dysfonctionnement du système nerveux autonome et dans certains cas, des troubles cognitifs (1,29,55). Aussi, il a été démontré que dans la plupart des cas, il existe un lien direct entre la sévérité des symptômes et la longueur des répétitions trinuécléotides : plus la longueur de la répétition est grande, plus les symptômes notés chez le patient sont sévères (53).

Ceci dit, la MMJ représente une forte hétérogénéité phénotypique et ceci explique, entre autres, sa classification clinique en trois sous-types correspondant aux trois premières familles portugaises atteintes de MMJ (Joseph, Thomas, Machado respectivement) : le type 1 étant associé à une apparition précoce (environ vers 24 ans), une progression rapide des symptômes et des signes pyramidaux et dystoniques ; le type 2 avec une apparition intermédiaire (environ vers 41 ans) marquée par une ataxie cérébelleuse prédominante et pure ; le type 3 étant associé à une apparition tardive et une neuropathie périphérique (53,55). La neuropathie périphérique peut être considérée comme étant une des sources importantes quant à la déstabilisation produite chez les patients atteints (59,60). Aussi, chez certains des patients, les axones des

neurones moteurs sont spécifiquement endommagés, renforçant davantage l'association de la MMJ à une maladie dégénérative des neurones moteurs (61).

D'après de nombreuses études, il a été démontré que le poids du cerveau des patients atteints de la MMJ est remarquablement réduit comparativement aux individus sains (62-65). De plus, une dépigmentation dans la substance noire et une atrophie dans plusieurs régions ont été observées chez plusieurs patients atteints de la MMJ (63,66,67). Une méthode intéressante pour diagnostiquer la MMJ est l'imagerie par résonance magnétique. En effet à partir de cette méthode, il a été possible à détecter de nombreuses manifestations de cette maladie dans différentes régions du système nerveux (65,68,69).

II.3. Héritage et génétique de la MMJ

La MMJ est un désordre neurologique autosomique dominant. Par conséquent, chacun des enfants de parents affectés ou porteurs asymptomatiques aura un risque *à priori* de 50% d'être eux-mêmes porteur. Il n'y a aucune différence quant au sexe: les deux sexes possèdent une probabilité équivalente à recevoir ou à transmettre l'allèle mutant et exprimer la maladie. Il s'agit d'une maladie avec une pénétrance complète ; très peu de cas (2%) a été rapporté comme étant sans pénétrance (53). Toutefois, il a été noté dans une étude que, même si la pénétrance observée dans la MMJ est dépendante de l'âge, les probabilités à être porteur de la mutation diminuent avec l'âge chez les individus asymptomatiques. En effet, comme l'âge moyen où débutent les premiers signes de la maladie est autour de 40 ans, si l'individu ne développe pas de symptômes jusqu'à cet âge, les chances à en développer par après est

diminué avec l'âge. Entre autres, cette probabilité devient environ nulle lorsque l'individu atteint un âge de 70 ans (70). Outre les facteurs génétiques, les facteurs environnementaux, même si mineurs, jouent aussi un rôle important dans le développement des maladies poly-Q (53).

C'est en 1993 qu'il a été découvert que le locus de la maladie de Machado-Joseph est placé sur le chromosome 14 (71). Par la suite, en 1994, d'autres chercheurs ont observé une expansion des trinuécléotides CAG dans la partie codante du gène *ATXN3* se trouvant sur le chromosome 14 en position 14q24.3-14q32.45 chez tous les individus atteints de la maladie de Machado-Joseph à l'étude (56). La MMJ est donc le résultat d'une mutation (expansion des trinuécléotides CAG) au niveau du gène *ATXN3*. Cette répétition de trinuécléotides CAG au-delà d'un seuil (plus que 55 répétitions de trinuécléotides CAG) entraîne une expansion anormale dans la longueur de la protéine ataxine-3 (ATX-3) produisant une mauvaise structure tridimensionnelle. Par conséquent, la protéine ATX-3 devient non fonctionnelle et donc, dans l'incapacité à remplir ses fonctions, dont le retrait de l'ubiquitine des protéines à rejeter par l'organisme. Ces protéines vont s'oligomériser et ensuite, former des agrégats. Toutefois, tel que mentionné plus tôt, le rôle de ces agrégats reste encore à discuter ; les chercheurs sont en controverse quant à leur rôle dans l'organisme (bénéfique ou non pour les maladies à l'expansion de polyglutamine) (72).

La structure génomique du gène *ATXN3* a été publiée plusieurs années après son association avec la MMJ (73). Pour les allèles sauvages, la répétition des trinuécléotides CAG se situe entre 12 à 44 unités et en cas d'une mutation, l'expansion est entre 61 à 87 CAG. Bien que rare, mais il existe aussi des allèles associées avec MMJ ayant une longueur intermédiaire

d'expansion : des répétitions de CAG de 45 et 51 à 56 unités (74-77). Ce gène encode pour une protéine appelée ataxine-3 (ATX-3) (56).

III. Ataxine-3

III.1. Caractéristiques et structure de la protéine ataxin-3

L'épissage alternatif permet au gène *ATXN3* de se présenter sous environ 56 ARN messagers matures. Parmi eux, plus de la moitié sont dégradés par le système de dégradation des ARN messagers non-sens ; les autres menant à la formation de 20 protéines isoformes (73,78,79). Le gène *ATXN3* code pour la protéine ataxin-3 (ATX-3). Ataxine-3 possède 339 acides aminés et un poids moléculaire d'environ 42 kDa pour des individus sains (53). La protéine ATX-3 est exprimée dans presque toutes les cellules (73). Elle est présente dans le cytoplasme, le noyau et les mitochondries. Toutefois, il est à noter que, dans les neurones, elle est principalement considérée comme étant une protéine cytoplasmique (80). Dans le cerveau, elle est surtout présente dans les neurones, mais on en trouve aussi une petite quantité dans les cellules gliales (53).

La protéine ataxine-3 appartient à la famille des protéases à cystéine. Structurellement, ATX-3 est composé d'un domaine catalytique globulaire N-terminal, d'un domaine Joséphine, de deux à trois domaines d'interaction avec l'ubiquitine (UIM) et une séquence de poly-Q avec une longueur variable dans la partie C-terminal (**Figure 1.4**). Le domaine Joséphine

possède une lysine ubiquitinable (K117) et deux séquences exports nucléaires (SEN ; courtes séquences d'acides aminés permettent l'exportation de la protéine ciblée hors du noyau vers le cytoplasme) (1). Il est principalement composé de deux sous-secteurs : le domaine catalytique globulaire et une hélice en forme d'épingle de cheveux (81,82). À la surface de ce domaine se trouvent deux sites de liaison pour l'ubiquitine : le site 1 se trouvant à la proximité de la fente catalytique séparant les deux sous-secteurs et le site 2 placé sur la surface opposée (83). Le domaine Joséphine possède une activité de désubiquitination (DUB) lui permettant ainsi de cliver l'ubiquitine des protéines qui doivent subir une dégradation et être rejetées par l'organisme (84). Il est à noter que dans ce domaine, les acides aminés sont fortement conservés, une des caractéristiques principales des résidus catalytiques d'une protéase cystéine à laquelle appartient cette protéine (1,81). Pour ce qui est des domaines d'interaction avec l'ubiquitine (UIM), ils sont situés de part et d'autre de la séquence de poly-Q. Dépendamment des isoformes de l'ataxine-3, il existe deux à trois UIM dans la structure : deux des UIM, localisés en N-terminal de la région de poly-Q, sont toujours conservés ; seulement le UIM placé dans la partie C-terminal du domaine de poly-Q n'est pas toujours conservé. Les UIM possèdent cinq résidus de sérines identifiés comme étant des sites potentiels de phosphorylation (S236, S256, S260/261, S340, S352) (1). Pour ce qui est du domaine poly-Q, il est d'une longueur variable. En effet, chez les individus sains, la répétition de trinuécléotides CAG se situe entre 10 à 51 et en cas de mutation, jusqu'à 55 à 87 répétitions pour les individus atteints de la maladie de Machado-Joseph (26,85). Enfin, il existe aussi un signal de localisation nucléaire (SLN) entre le deuxième UIM et la région poly-Q (1). Ce signal est entre autres une séquence d'acides aminés permettant l'importation de la protéine ciblée dans le noyau cellulaire par un transport nucléaire (86).

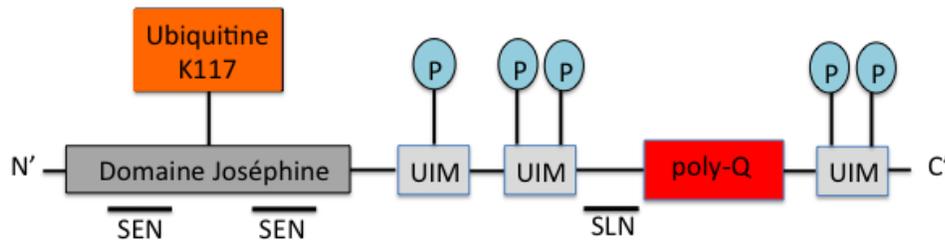


Figure 1.4 : Schéma structurel de la protéine ataxine-3.

La protéine ataxine-3 est composée d'un domaine Joséphine, trois domaines d'interaction avec ubiquitine (UIM) et une région poly-Q. Le domaine Joséphine contient une lysine ubiquitinable et deux séquences exports nucléaires (SEN). Cette protéine contient aussi cinq sites de phosphorylation (P) qui sont présents dans les UIM et, une séquence de localisation nucléaire (SLN) et 5' de la séquence poly-Q.

III.2. Fonctions et rôles biologiques

L'ataxine-3 est une protéine avec plusieurs fonctions essentielles à la cellule. En effet, il a été démontré qu'elle joue un rôle important dans : les voies de l'homéostasie protéique, la régulation de la transcription, la réparation de l'ADN, la régulation des gènes inflammatoires, la myogenèse et la régulation du cytosquelette.

III.2.1. Voies de l'homéostasie protéique (« protéostasis »)

Le réticulum endoplasmique (RE) est un site essentiel pour l'assemblage et le repliement des protéines sécrétées et membranaires. Dans de nombreux cas, lorsque les polypeptides entrent dans le RE, ils sont sujets à des problèmes de repliement et ceci entraîne, des agrégations et des mal repliements des protéines (8). Ainsi, afin de conserver

l'homéostasie du RE, l'organisme a recours à un mécanisme de contrôle dégradant les protéines associées avec le RE (ERAD) : système contrôlant l'ubiquitination des protéines mal repliées ou mal assemblées qui assure l'exportation de ces protéines dans le cytosol afin qu'elles soient ensuite dégradées par le système du protéasome-ubiquitine (87-92).

La protéine ataxine-3 est impliquée dans la voie de protéasome-ubiquitine, un des mécanismes principaux pour l'élimination des protéines mal repliées ou endommagées (89). ATX-3 interagit avec une chaperonne ATPase de transition du réticulum endoplasmique, VCP/p97, responsable du recrutement d'un grand nombre de protéines polyubiquitinées au protéasome (89,93,94). Cette chaperonne ATPase est un régulateur clé du système du protéasome-ubiquitine et, est essentiel pour la mobilisation et le ciblage des substrats ubiquitinés au protéasome 26S (95). L'ataxine-3 humaine lie des protéines polyubiquitinées étant associées avec le protéasome et, possède une activité de désubiquitination (DUB) contre les chaînes polyubiquitinées (principalement les chaînes polyubiquitinées de lysine (K-48)) lui suggérant ainsi un rôle dans la voie du protéasome-ubiquitine. Les enzymes DUB sont un groupe de protéines dont leur rôle est d'éliminer l'ubiquitine des substrats ubiquitinés et ainsi, régulariser de nombreux processus biologiques (88,89,96). L'interaction de la protéine ataxine-3 dans la voie de protéasome-ubiquitine est aussi observée dans différents modèles génétiques dont chez le nématode *C. elegans* (97,98).

III.2.2. Régulation de la transcription

D'après de nombreuses études, la protéine ATX-3 joue aussi un rôle important quant à la régulation du processus de la transcription. Elle parvient à contrôler la régulation de la transcription sous différentes façons : (i) dû à son activité de désubiquitination, elle module la dégradation des facteurs et répresseurs de transcription en contrôlant et en éliminant le signal de dégradation polyubiquitine (ii) à partir du complexe SCF (skp-1, Cdc53, F-box; une ligase à ubiquitine E3 dont le rôle est de cibler des protéines pour la dégradation protéosomique) et enfin (iii) ce contrôle et cette régulation peuvent être effectués à partir du signal de localisation nucléaire (SLN) situé entre le deuxième UIM et la région poly-Q de la protéine (1,98,99).

ATX-3 possède aussi une fonction dans la répression de la transcription. En effet, il a été démontré que cette protéine parvient à inhiber la transcription par sa liaison avec des co-activateurs spécifiques de la transcription, dont CBP (« *CREB-binding protein* »), p300 (« *protein p300* ») et PCAF (« *p300/CBP-associated factor* »). Dû à son domaine Joséphine, la protéine ATX-3 possède la capacité de lier des histones et par ceci, empêcher leur acétylation menant ainsi à une répression de la transcription (100).

III.2.3. Les autres rôles de la protéine ataxine-3

Plusieurs études proposent un rôle pour la protéine ATX-3 dans la réparation de l'ADN par son interaction avec l'enzyme kinase 3'-phosphatase polynucléotide (PNKP; phosphatase impliquée dans la réparation des coupures des brins) (101-103). Des études démontrent que lorsqu'il y a une mutation au niveau du gène *PNKP*, il est possible d'observer des symptômes neurologiques, dont une neurodégénérescence, une polyneuropathie progressive, une atrophie

cérébelleuse, un retard dans le développement et une déstabilisation intellectuelle (104,105). En conditions physiologiques, l'interaction de la protéine ATX-3 avec PNKP assure la réparation de l'ADN. Toutefois, lorsqu'il y a expansion des répétitions trinuécléotides au niveau de la protéine ataxine-3, ceci peut causer une mutation ou une agrégation du PNKP et par conséquent, empêcher son rôle réparateur de l'ADN et mener ainsi au développement possible de la maladie de Machado-Joseph (101-103). Des études démontrent que l'expression de la protéine ataxine-3 mutante *in vitro* et dans le cerveau des souris transgéniques mène à une diminution importante de l'activité de la phosphatase PNKP et donc, ceci renforce davantage la fonction de l'ataxine-3 dans le mécanisme de la réparation de l'ADN (103).

De plus, la protéine ataxine-3 possède un rôle dans la régulation des gènes inflammatoires. En effet, il a été rapporté une surexpression des ARNs messagers codant de nombreux gènes inflammatoires, dont MMP-2 (« *matrix metalloproteinase-2* »), AAP (« *accumulation-associated protein* »), et SDF1 α (« *stromal cell-derived factor 1 alpha* ») dans des cellules exprimant une expansion de ATX-3. Il a aussi été démontré une augmentation significative de MMP-2, SDF1, A β (« *amyloid beta* »), IL-1ra (« *interleukin 1 receptor antagonist* ») et IL-1 β (« *interleukin 1 beta* ») dans le pont des patients atteints de la MMJ (106). Cette surexpression des gènes inflammatoires dans la lignée cellulaire et les cerveaux des patients atteints de MMJ suggèrent une possible implication de la protéine ATX-3 quant à la régulation des gènes inflammatoires.

Cette protéine est aussi impliquée dans le maintien du cytosquelette et dans la myogenèse par ses interactions avec les protéines tubuline, dynéine, MAP2 (« *microtubule-*

associated protein 2 ») et certaines intégrines (1). En effet, des études ont démontré une fonction possible de la protéine ATX-3 dans le maintien du cytosquelette, car, entre autres, son absence produit des altérations morphologiques dans les lignées cellulaires dont une désorganisation de plusieurs composantes du cytosquelette (microtubules, microfilaments et filaments intermédiaires), une perte dans les adhésions cellulaires et une augmentation de la mort cellulaire (107). Dans une autre expérience, où la protéine ATX-3 a été inhibée dans les myoblastes des souris, les résultats ont démontré la formation d'un cytosquelette immature, mais aussi une transition des myoblastes en des fibres musculaires suggérant ainsi un rôle potentiel pour ATX-3 dans la myogenèse (108).

IV. Le modèle génétique à l'étude, *C. elegans*

IV.1. *C. elegans*

IV.1.1. Origine et caractéristiques

L'espèce *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) a été décrit pour la première fois en 1900 par Émile Maupas, un botaniste s'intéressant au mode de reproduction hermaphrodite de cette espèce (109). Ce n'est qu'au début des années 1960 que cette espèce est devenue un modèle à l'étude, lorsque sélectionné pour la recherche génétique par Sydney Brenner, un généticien ayant travaillé sur les phages et les bactéries. Ce dernier voulait une espèce facile à maintenir, une génétique traçable afin de pouvoir isoler les mutants et d'effectuer des

croisements et une espèce facile à visualiser ; les traits d'un organisme multicellulaire possible à utiliser pour une approche génétique du développement et du système nerveux (109).

Le ver *C. elegans* est un nématode d'environ un millimètre de longueur, facile à maintenir, et qui possède une durée de vie d'environ quatre semaines (**Figure 1.5**). Il s'agit d'un modèle génétique simple particulièrement bien adapté pour les études neurologiques dues à sa lignée neuronale globale détaillée et l'interconnectivité des synapses ressemblant fortement à celle du système nerveux des vertébrés. De plus, les molécules et leurs interactions restent conservées dans cet animal. Le système nerveux de cet organisme est bien développé et possède 302 neurones au stade adulte, dont 26 sont des motoneurones GABAergiques (**Figure 1.6**). Le neurotransmetteur GABA (acide gamma-aminobutyrique) est l'inhibiteur neuronal principal dans le nématode *C. elegans*. Une dysfonction au niveau des neurones GABAergiques entraîne des troubles moteurs, dont un défaut de motilité (phénotype de paralysie possible) (110).

Ce nématode possède un temps de génération assez rapide variant entre deux à trois jours. La plupart des *C. elegans* sont des hermaphrodites (la fréquence d'obtention d'un mâle est d'environ 1/1000). Chaque hermaphrodite est capable de produire environ 200 à 300 progénitures dépendamment des conditions. Ce trait permet aux chercheurs des analyses statistiques considérablement rapides. De plus, due à sa transparence, la visualisation de sa morphologie est facilitée (111).

Ces caractéristiques renforcent davantage l'utilisation de cet animal multicellulaire pour des études génétiques et spécialement pour des maladies humaines, lorsqu'un gène homologue et/ou orthologue y existe. Due à toutes ces particularités, dans cette étude, le ver *C. elegans* est considéré le modèle de choix pour étudier et caractériser la maladie de Machado-Joseph (112).

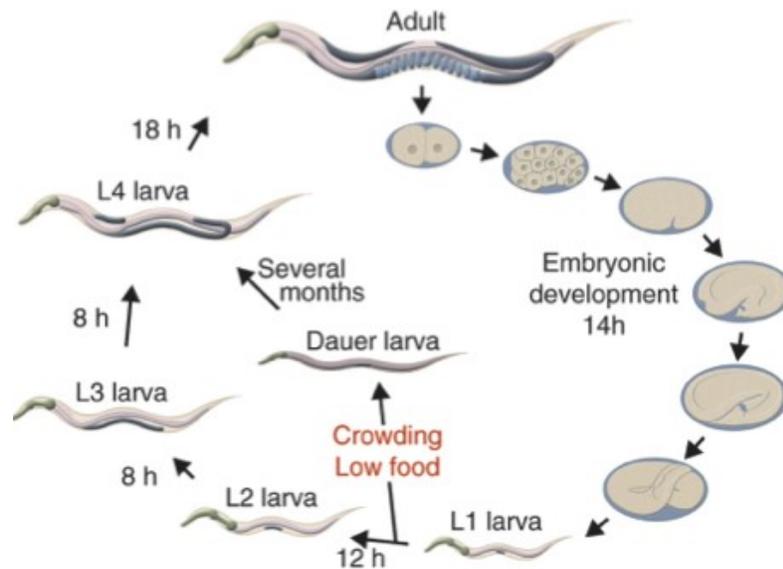


Figure 1.5 : Le cycle de vie de *C. elegans* (113).

Sous des conditions favorables, la durée séparant le développement embryonnaire du stade adulte jour un est entre trois à quatre jours. Toutefois, si les conditions du milieu sont défavorables, par exemple, manque de nourriture, températures élevées et/ou une surpopulation, les vers entrent en stade *dauer*.

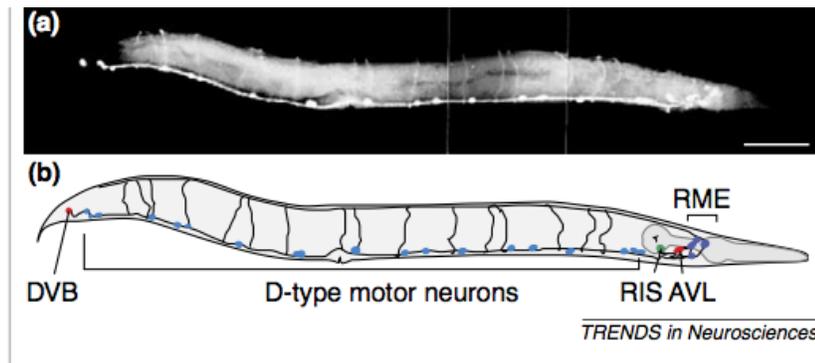


Figure 1.6 : Les neurones GABAergiques (110).

(a) L'image fluorescente d'un ver *C. elegans* hermaphrodite adulte en noir et blanc. La coloration est effectuée avec un antisérum contre les neurones GABA. Il y a présence de 26 neurones GABAergiques. La barre d'échelle est de 0,1mm. (b) Schématisation du positionnement des 26 neurones GABAergiques (110).

IV.1.2. *ATXN3* et *C. elegans*

Le gène *atx-3* est l'orthologue du gène *ATXN3* humain chez le nématode *C. elegans*. Ils représentent 38% d'identité et 56% de similarité (98). Le poids moléculaire suggéré pour *ATX-3* chez le ver est d'environ 42 kDa, un poids moléculaire équivalent à celui suggéré pour la protéine humaine. D'après les expériences de micropuce à ADN qui compare des souches sauvages et *atx-3* mutantes, une perte d'activité de *atx-3* résultent une dysfonction et un défaut au niveau du système du protéasome-ubiquitine, signal de la transduction, structure cellulaire et la motilité (98).

IV.1.3. Études précédentes sur *ATXN3* utilisant *C. elegans* comme modèle

Plusieurs chercheurs ont élaboré leurs recherches pour l'étude de la MMJ et *ATXN3* à partir de l'organisme modèle *C. elegans*. Par exemple, Maciel et ses collaborateurs ont démontré que la protéine ATX-3 possède une activité déubiquitinante *in vitro* contre les chaînes polyubiquitinées et une dérégulation des gènes impliqués dans la voie de protéasome-ubiquitine, le signal de la transduction, la structure cellulaire et la motilité lorsqu'il y a une désactivation ou expansion de l'ataxine-3 (107). Le même groupe a démontré à partir de leur modèle transgénique qu'une expression pan-neuronale de l'*ATXN3* mutante mène à une agrégation et une dysfonction neuronale et que, la protéotoxicité neuronale et les phénotypes neurodégénératifs produits par le mutant ATX-3 dans le nématode peut être restauré et supprimé par la régulation négative de la voie DAF-16 (orthologue des facteurs de transcription de la famille FOXO («*forkhead box protein*») chez le nématode *C. elegans*) et l'activation de HSF-1 («*heat shock factor-1*») (57). Enfin, ils ont aussi démontré une association entre la réponse au stress du RE et *ATXN3*. En effet, ils ont observé qu'une absence de la protéine ATX-3 mène à une augmentation du stress du RE chez le modèle *C. elegans* lorsqu'exposé à un stimulus nocif de choc thermique (2). Il existe encore de nombreuses autres recherches se basant sur cet organisme modèle pour étudier les éléments, dont l'agrégation, la protéotoxicité et la neurotoxicité, associés avec la maladie de Machado-Joseph.

IV.1.4. Description de nos modèles transgéniques *C. elegans* utilisés

Afin de pouvoir étudier la maladie de Machado-Joseph et de caractériser *ATXN3*, le gène causatif de cette maladie, deux souches transgéniques *C. elegans* ont été générées : *unc-47p::ATXN3-CAG14* (sauvage/ non pathogénique; comporte 14 répétitions de CAG) et *unc-47p::ATXN3-CAG89* (mutante/ pathogénique; comporte 89 répétitions de CAG). Le gène *ATXN3* est exprimé sous le promoteur *unc-47*. Le gène *unc-47* code une protéine présente aux vésicules transmembranaires de transport de GABA et est requis dans les neurones GABAergiques pour les neurotransmissions GABA. Comme la maladie de Machado-Joseph est identifiée comme étant associée en partie associée avec la dégénération des neurones moteurs, nous avons exprimé *ATXN3* dans les 26 neurones GABAergiques du nématode (les motoneurones du modèle) (55,112,114,115). Les vers ont été injectés avec des vecteurs d'expression contenant l'ADN complémentaire humain sauvage ou mutant *ATXN3*. Plusieurs lignées ont été développées pour chaque transgène et ceux démontrant des niveaux d'expression du transgène et des profils moléculaires similaires ont été isolés pour des analyses futures. L'expression de la protéine a été confirmée par immunobuvardage pour toutes les lignées et le nombre de répétitions des trinuécléotides par séquençage. La souche transgénique mutante *unc-47p::ATXN3-CAG89* a démontré un défaut de motilité, de neurodégénérescence, du stress oxydatif et une activation de la réponse au stress du RE remarquablement plus élevés et importants lorsque comparée avec la souche non-pathogénique *unc-47p::ATXN3-CAG14*. Les résultats obtenus suivent bien le sens de la littérature : une augmentation quant au nombre des répétitions des trinuécléotides au-delà d'un seuil déterminé (plus que 50 répétitions) produit un état pathologique et neurodégénératif.

IV.2. Autres organismes modèles associés avec *ATXN3* et MMJ

À part les modèles *C. elegans*, il est possible de remarquer qu'il existe de nombreuses recherches se portant sur la MMJ et le gène causatif, *ATXN3*, dans d'autres organismes modèles dont la souris, le rat et la drosophile.

De nombreux chercheurs se basent sur des modèles de souris pour avancer leur recherche. En effet, les chercheurs Ikeda et ses collaborateurs ont été les premiers, en 1996, à développer des souris transgéniques exprimant une expansion poly-Q de 79Q dans les cellules de Purkinje, des cellules légèrement affectées lors de la MMJ. Ces animaux avaient un comportement ataxique, attestant la pertinence de l'expansion de poly-Q dans *ATXN3* quant au développement de la MMJ (116). Ensuite, il y a eu les recherches de Cemal et ses collaborateurs générant des souris transgéniques mutées où ils introduisaient des allèles pathologiques d'*ATXN3* avec différentes longueurs de poly-Q (64, 67, 72, 76 et 84 répétitions de trinuécléotides), ou sauvages, par induction des allèles du gène avec une longueur poly-Q de 15 répétitions dans les cellules de Purkinje. Les souris exprimant des allèles expansées ont démontré, au cours de leur quatrième semaine, un léger déficit cérébelleux. Avec la progression de la maladie, plusieurs symptômes ont été notés : élévation du bassin nettement aplati, hypotonie, pertes sensorielle et motrice, formation des inclusions intranucléaires neuronales, perte cellulaire dans d'autres régions du cervelet, démyélinisation périphérique des nerfs et perte axonale chez les souris symptomatiques de 26 semaines d'âge. En revanche, les souris exprimant des allèles non-pathogéniques démontrent un profil de type sauvage à 20 mois d'âge. Ces résultats suggèrent que la sévérité de la maladie augmente avec le niveau d'expression de la protéine expansée et la taille des répétitions de trinuécléotides (117). Il y a

eu aussi les recherches de Boy et ses collaborateurs qui ont généré un modèle conditionnel de souris MMJ en utilisant le système Tet-off. Ce système permet une désactivation réversible de la transcription du gène induit en présence de l'antibiotique tétracycline ou de ces dérivés. Leur but était de connaître si une expansion des répétitions trinuécléotides dans ataxine-3 était réversible *in vivo*. Comme résultats, ils ont observé que les souris transgéniques modèles de la MMJ développaient un phénotype neurologique progressif caractérisé par une dysfonction neurologique dans le cervelet, une réduction d'anxiété, une hyperactivité et un faible gain de poids corporel. Une fois l'expression d'ataxine-3 mutante a été désactivée chez les souris symptomatiques à l'état précoce de la maladie, les chercheurs ont noté que ces souris étaient indiscernables des contrôles négatifs après cinq mois de traitement. Par ceci, ils ont conclu qu'une réduction de la production pathogénique d'ataxine-3 pourrait être une approche thérapeutique efficace pour la MMJ étant donné qu'il s'agit d'un traitement appliqué à un état précoce avant qu'il ne se produise des dommages irréversibles (46). Ensuite, il y a eu les recherches de Figiel et ses collaborateurs qui ont généré des souris transgéniques dépourvus d'ataxine-3. Comme résultats, ces souris étaient fonctionnelles avec un profil similaire aux souris sauvages (avec ataxine-3): elles étaient viables et fertiles avec une durée de vie non-réduite (118). Pour l'instant, la souris est le modèle le plus utilisé pour effectuer des études pour la caractérisation de la MMJ et du gène *ATXN3*. Les résultats obtenus suivent une conclusion similaire d'une recherche à une autre.

Il y a eu aussi des recherches sur un autre organisme modèle, le rat. En effet, les chercheurs Alves et ses collaborateurs ont démontré dans leur modèle de la MMJ chez le rat, qu'une surexpression ou une désactivation du gène *ATXN-3* ne produisent pas un effet

significatif sur l'état pathogénique de la MMJ. Ils ont cependant noté un léger déficit moteur dans les animaux transgéniques ayant reçu une transduction virale dans la substance noire (50,119). À date, c'est tout ce qu'il y a avec ce modèle animal sur qui les chercheurs ont mené des expériences en lien avec le gène *ATXN-3*.

Un autre organisme modèle que les chercheurs utilisent pour l'étude de la MMJ est la *Drosophile*. Le premier groupe à développer des mouches à fruit transgéniques exprimant la protéine humaine associée avec la MMJ a été Warrick et ses collaborateurs en 1998. Ces derniers ont exprimé la protéine humaine expandue ATX-3 au complet ou le fragment C-terminal seulement, dans différentes parties du corps et n'ont observé une mort cellulaire que lorsque la protéine était exprimée dans l'œil ou le système nerveux. Ces observations les ont menés à conclure que la neurodégénérescence causée par l'expansion de ATX-3 est conservée dans ces organismes (120). De plus, des inclusions nucléaires contenant ATX-3 ont été observées dans toutes les cellules du transgène. Par ceci, ces chercheurs ont conclu que ce n'est pas toutes les cellules avec des inclusions nucléaires qui possèdent un profil dégénératif (120). Aussi, les chercheurs Stochmanski et ses collaborateurs ont pu démontrer, à partir des modèles de neurones de mammifères et de *Drosophile*, que des changements de cadre de lecture par l'expansion de *ATXN3* sont considérés comme étant toxiques et présentent des effets délétères sur ces modèles (121). Les modèles de *Drosophile* exprimant la protéine ataxine-3 humaine dans l'œil ont été démontrés comme étant très utiles pour des recherches associées à la mort cellulaire causée par l'expansion de la protéine (122-124). À partir de ce modèle, les chercheurs ont aussi été capables de démontrer l'instabilité et la toxicité causée par l'expansion des protéines poly-Q (39,125).

Ces différents organismes modèles sont tous des outils permettant aux chercheurs de décortiquer et de comprendre davantage la maladie de Machado-Joseph afin de pouvoir trouver un traitement pharmacologique. Dans chacun des organismes modèles, les chercheurs effectuent une régulation du niveau d'expression de la protéine ATX-3 mutante. Son expression est régulée par une surexpression, une sous-expression ou encore, une désactivation totale de la forme pathogénique de la protéine, menant ensuite à des conséquences spécifiques associées avec les phénotypes normalement observés chez des patients ayant la MMJ. Dans certains cas, les chercheurs ont aussi réussi à trouver des voies en lien avec la MMJ dont le contrôle permet un effet positif et une diminution de la toxicité causée par ATX-3 mutante (**Figure 1.3**). Ces modèles permettent donc de comprendre davantage la toxicité, l'instabilité, la mort cellulaire et la dysfonction neuronale causées par la forme pathogénique de ATX-3.

IV.3. C. elegans, ATX-3 et stress du réticulum endoplasmique

IV.3.1. Réticulum endoplasmique et la réponse UPR (« unfolded protein response »)

Le réticulum endoplasmique (RE) est un organite intracellulaire de structure complexe formant un réseau membraneux s'étendant du noyau à la membrane cellulaire. Il s'agit d'un organite où se produit la maturation et l'assemblage des protéines natives. Afin de synthétiser des protéines avec une bonne conformation, des contrôles de qualité surviennent au niveau transcriptionnel, traductionnel et conformationnel. Une fois synthétisées, ces protéines sont transportées vers l'appareil de Golgi afin d'être par la suite transportées à leur destination

finale. Toutefois, s'il y a une dysfonction au niveau des processus de maturation et de conformation, les protéines seront envoyées vers le protéasome afin d'être dégradées. Par contre, lorsqu'il y a une production en excès, ce n'est pas toutes les protéines mal conformées qui seront sujettes à une dégradation et donc, à une accumulation dans la lumière du RE.

La lumière du RE possède une haute concentration d'ions calcium associé avec l'activité des pompes à calcium ATP-dépendantes. Ses propriétés redox assurent l'obtention d'une conformation correcte des protéines destinées à la sécrétion ou à l'expression à la membrane cellulaire (126-128). De nombreuses protéines chaperonnes dépendantes du calcium dont GRP78/BiP (« *immunoglobulin binding protein* » ; homologue de HSP-4 dans le ver *C. elegans*), GRP94 (protéine à choc thermique aussi connu sous le nom HSP90B1 (« *heat shock protein 90kDa beta member 1* »)) et la calréticuline stabilisent les intermédiaires incomplètement matures détectant les protéines malformées et les envoient pour la dégradation (129). Lorsqu'il y a une perturbation dans le repliement de protéines, il y a accumulation des protéines mal conformées dans la lumière de RE et ceci produit alors une situation de stress connu sous le nom du stress du RE.

Le stress du réticulum endoplasmique est une situation cellulaire généralement provoquée par l'accumulation excessive des protéines natives mal conformées au sein de la lumière du RE. Ceci est provoqué par différents phénomènes, dont l'ischémie, le stress oxydatif et/ou les infections virales (126,130). Cette situation cellulaire pathologique est le résultat d'un désordre au niveau de l'homéostasie de RE, ce dernier n'étant plus apte à assurer ses fonctions, dont la maturation post-traductionnelle des protéines nouvellement synthétisées.

Les protéines mal conformées au lieu d'être dirigées vers l'appareil de Golgi, elles vont s'accumuler dans le RE et par ceci, entrainer une situation de stress conduisant la cellule à activer une réponse adaptative particulière nommée UPR (« *unfolded protein response* »). Cette situation est observée lorsque les chaperonnes sont dans l'incapacité à envoyer la totalité de ces protéines mal repliées pour la dégradation. La réponse UPR a comme but de diminuer l'accumulation des protéines mal repliées et de rétablir e la fonction normale du RE. Ce but est achevé par différents phénomènes : réduction globale de la synthèse protéique par blocage traductionnel, augmentation de la dégradation des protéines par le protéasome et augmentation des capacités enzymatiques de maturation protéique (131,132). Toutefois, si ce processus ne parvient pas à bien compléter son rôle et que le stress se prolonge, c'est alors que les voies induisant la mort cellulaire programmée seront activées (126).

Il existe trois principaux médiateurs de la signalisation UPR : l'IRE1 (« *inositol-requiring enzyme 1* »), l'ATF6 (« *activating transcription factor 6* ») et le PERK (« *PRKR-like ER kinase* ») (**Figure 1.7**). Ces transducteurs sont responsables de l'activation de voies régulant les activités transcriptionnelles et traductionnelles associées à la réponse UPR.

L'IRE1 est activé par l'autophosphorylation et l'oligomérisation. Cette activation lui attribue une activité ARNase permettant l'épissage de l'ARNm (ARN messenger) du facteur transcriptionnel XBP-1 (« *X box binding protein 1* »). XBP-1 peut ensuite activer la transcription des gènes ayant un rôle important dans la réponse UPR comme les chaperonnes BiP, GRP94, calréticuline et plusieurs enzymes impliquées dans la maturation et la dégradation des protéines. Pour ce qui est du facteur transcriptionnel l'ATF6, celui-ci, lors d'un stress du RE, quitte le RE et migre vers l'appareil de Golgi où il est ensuite clivé par des

protéases. Ce clivage entraîne une portion cytosolique de l'ATF6 étant capable de se lier à l'ADN et ainsi, activer la transcription des chaperonnes (BiP, GRP94 et calréticuline) et des enzymes impliquées dans les voies de maturation et dégradation protéique tout comme IRE1.

Lors d'un stress du RE, PERK est activée et entraîne la phosphorylation du facteur de transcription eIF2 α (« *Eukaryotic translation initiation factor 2 alpha* »). Ce dernier bloque la traduction des ARNm et ainsi, limite la synthèse protéique globale (133,134).

Il est à noter que la chaperonne GRP78/BiP joue un rôle primordial dans la régulation de la réponse UPR en activant les trois principaux médiateurs. En effet, en temps normal, cette chaperonne se lie aux domaines luminaux des trois médiateurs et les maintient dans la lumière du RE. En revanche, en cas de stress, BiP se lie aux protéines mal repliées accumulées dans la lumière du RE et par conséquent, libère ATF6, IRE1 et PERK permettant ainsi leur activation par autophosphorylation ou homodimérisation (135,136).

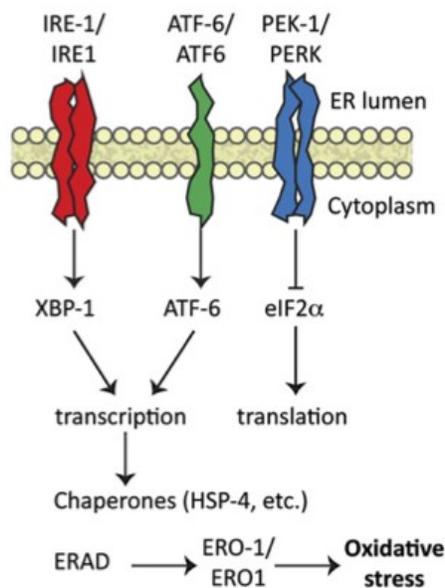


Figure 1.7 : Les mécanismes des médiateurs principaux de la réponse UPR (134).

Une accumulation des protéines mal repliées entraîne la production d'un stress au niveau du RE. Le système tend à contrôler la situation en activant les voies UPR. L'activation de la réponse UPR entraîne une régulation à la hausse des chaperonnes et ERAD. Ce dernier mène à la production d'un stress oxydatif.

IV.3.2. Lien entre C. elegans, ATX-3 et stress du réticulum endoplasmique

De nombreuses recherches suggèrent une association entre la fonction biologique de ATX-3 et les systèmes cellulaires reliés à la réponse au stress. Dû au fait que ATX-3 se déplace vers le noyau en réponse au stress protéotoxique et que certains types de stress cellulaire augmentent l'ubiquitination et l'activité de ATX-3, suggèrent que sa fonction est importante dans la réponse cellulaire à ce type de stimulus (3,137,138). Comme la protéine ATX-3 possède une activité DUB dans les voies de l'homéostasie protéique et qu'elle participe au repliement protéique, il a été suggéré que cette protéine augmente le stress cellulaire.

Des chercheurs ont démontré, chez le modèle *C. elegans*, que les orthologues de ATX-3 et VCP/P97 (CDC-48) pouvaient médier les réponses au stress et la longévité dans un mécanisme impliquant l'activité DUB de la protéine ATX-3 et la voie de IGF-1 (« insulin/insulin-like growth factor ») (6). Dans une autre étude, les chercheurs ont démontré que la forme pathogénique de la protéine ataxine-3 causait des symptômes neurologiques avec des inclusions, stress du réticulum endoplasmique et une délocalisation ribosomale dans leur modèle à l'étude (7). Aussi, par l'analyse d'une PCR (« polymerase chain reaction ») quantitative, il a été possible d'affirmer l'association de la protéine ataxine-3 avec le stress du

RE. Enfin, d'autres chercheurs ont conclu qu'afin d'obtenir une élimination efficace des protéines mal conformées du RE, l'implication de plusieurs protéines, dont ATX-3, est nécessaire (8). Toutes ces recherches renforcent et appuient davantage le lien existant entre la protéine ataxine-3 et le stress du RE.

Tel que mentionné dans la section IV.1.2, le gène *atx-3* est l'orthologue du gène *ATXN3* chez le nématode *C. elegans*. Ils représentent 38% d'identité et 56% de similarité (98). Par conséquent, comme les recherches précédentes ont déjà démontré une association entre ATX-3 et le stress du RE et que, le gène *ATXN3* possède une orthologue dans notre modèle à l'étude, *C. elegans*, ceci nous a encouragés davantage à élaborer une recherche reliant tous ces éléments ensembles. De plus, dans des recherches précédentes effectuées dans notre laboratoire, il a été possible d'identifier des composés, le Bleu de Méthylène, le guanabenz et le Salubrinal, ayant la capacité de prévenir la réponse au stress du RE et de protéger contre la protéotoxicité dans d'autres maladies neurodégénératives, dont la sclérose latérale amyotrophique (SLA) et la maladie neurologique héréditaire de la paraplégie spastique (134,139,140). Puisqu'un effet bénéfique a été observé suite à l'utilisation de ces composés dans les études précédentes, ceci nous a menés à aussi les utiliser sur une autre maladie neurodégénérative, la maladie de Machado-Joseph.

V. But de cette étude

À ce jour, il n'existe encore aucun traitement pour la maladie de Machado-Joseph. La raison expliquant ceci est entre autres due au fait qu'il y a des lacunes de caractérisation et d'informations sur les mécanismes de protéotoxicité associée à *ATXN3*, le gène responsable de cette maladie. Dans cette étude, nous avons voulu connaître le rôle du gène *ATXN3* dans le vieillissement, la réponse au stress et la neurodégénérescence.

Plusieurs facteurs expliquent la direction de cette étude: (i) le génome de *C. elegans* possède un orthologue de *ATXN3*, appelé *atx-3*, (ii) d'après les recherches précédentes, la protéine ataxine-3 est impliquée dans le réseau du réticulum endoplasmique (RE) et, (iii) des composés neuroprotecteurs et modulateurs du stress du RE, ultérieurement identifiés dans notre laboratoire, ont été capables de cibler la réponse du stress du RE et protéger contre la protéotoxicité dans la sclérose latérale amyotrophique (SLA) et le désordre neurologique héréditaire paraplégie spastique, d'autres types de maladies neurodégénératives.

En se basant sur les études précédentes effectuées dans notre laboratoire sur d'autres maladies neurodégénératives, les hypothèses suivantes sont émises pour le présent projet: (i) il existe une différence significative quant aux phénotypes de la motilité et de la neurodégénérescence entre les souches transgéniques *ATXN3* sauvages et mutantes; (ii) les composés chimiques à l'étude, Bleu de Méthylène, Salubrinal et Guanabenz, protègent les vers *C. elegans* contre la protéotoxicité produite par l'expansion du gène *ATXN3* dû à leur rôle

neuroprotecteur et enfin, (iii) ces mêmes composés chimiques, modulateurs du stress du RE, possèdent une capacité à prévenir le stress oxydatif et le stress du RE.

Ceci dit, les objectifs de cette étude sont : (i) définir s'il existe une différence significative quant au phénotype de motilité, la longévité et le profil de neurodégénérescence entre les souches transgéniques *ATXN3* sauvages et mutantes tel qu'observés chez des patients avec MMJ; (ii) déterminer si les composés chimiques Bleu de Méthylène, Salubrinal et Guanabenz, utilisés pour les études précédentes, possèdent un rôle neuroprotecteur contre la protéotoxicité produite par l'expansion du gène *ATXN3* et enfin, (iii) déterminer s'il est possible de prévenir le stress oxydatif et le stress du RE par des voies pharmacologiques.

B. Matériels et Méthodes

Souches *C. elegans*

Les souches de Nématodes ont été reçues du Centre de Génétique *Caenorhabditis elegans* CGC (Université de Minnesota, Minneapolis), excepté si indiqué autrement comme les souches transgéniques développées dans notre laboratoire. Les souches ont été toutes maintenues selon les méthodes habituelles : sur des boîtes de Pétri agar NGM (« *Nematode Growth Media* »)ensemencées avec la bactérie *E. coli* OP50 et gardées à 20°C (141). Les souches utilisées pour cette étude sont : N2 et *atx-3(tm1689)* (obtenues de CGC), *unc-47p::ATXN3-CAG14*, *unc-47p::ATXN3-CAG89*, XQ350 *unc-119(ed3)*; ttTi5605mosII; *xqIs350(unc-47p::ATXN3-CAG14; unc-119(+))*, and XQ351 *unc-119(ed3)*; ttTi5605mosII; *xqIs351(unc-47p::ATXN3-CAG89; unc-119(+))*, *hsp-4::GFP*, *hsp-4::GFP; ATXN3-CAG14 et hsp-4::GFP; ATXN3-CAG89*.

Les souches transgéniques ATXN3 et les constructions de plasmide

Les souches *ATXN3* ont été déjà décrites précédemment par notre laboratoire (142). L'ADN complémentaire (ADNc) humain pour *ATXN3* mutant et sauvage a été obtenu du laboratoire du Dr Guy Rouleau (Institut Neurologique de Montréal, Université de McGill). Les ADNc ont été amplifiés par PCR et clonés dans le vecteur pDONR221 suivant le protocole du fabricant avec le système Gateway (Invitrogen). La recombinaison Gateway multisites a été performée avec les clones pDONR *ATXN3* ainsi que les clones contenant le promoteur *unc-47* (obtenu

par Dr Erik Jorgensen, Université de Utah), *unc-54* 3'UTR plasmide pCM5.37 (obtenu par Dr. Geraldine Seydoux, John Hopkins, plasmide Addgene 17253) et le vecteur de destination vecteur pCFJ150 afin de créer des vecteurs d'expression. Les lignées transgéniques ont été développées par micro-injection des vers *unc-119(ed3)* (utilisé en tant que marqueur de sélection positive) et ont été criblées pour MoSCi («*transposon-mediated single copy insertion*») pour le transgène désiré. Cette méthode permet, suite à la rupture du chromosome par l'excision d'un transposon Mos1, l'insertion d'une copie unique du transgène dans le génome du ver *C. elegans* à un endroit précis. Une fois la copie du transgène insérée, c'est alors que le processus de réparation des brins d'ADN est entrepris (143). Plusieurs lignées ont été isolées pour chaque transgène et celles démontrant une similarité quant au comportement, des niveaux d'expression du transgène et les profils moléculaires ont été décroisées pour un minimum de trois fois et gardées pour des analyses futures (Fardghassemi et al., *article inséré dans ce mémoire en état de préparation* et (140)).

Populations avec âge synchronisé

Afin d'obtenir des vers synchronisés, environ huit à dix vers hermaphrodites ont été mis sur des boîtes de pétri NGM pour trois à quatre jours et gardés à 20°C. Une fois que les pétris sont devenus confluents, ils ont été collectés avec du tampon M9 (1M KH₂PO₄, 1M Na₂HPO₄, 1M NaCl, 1mM MgSO₄) et centrifugés à 4000 rpm (Rotor A-4-81) pour quatre minutes à 4°C. Suite à la centrifugation, 3mL du surnageant a été pris et remplacé par 3mL d'une solution contenant 5M NaOH et eau de javel (1:2). 10min de vortex à une haute intensité a permis de dégrader les vers et laisser un culot contenant seulement des œufs. Le culot a été lavé quatre

fois avec le tampon M9 et centrifugé à 4000 rpm (Rotor A-4-81) pour 4 min à 4°C. Le culot a été transféré sur un pétri NGM sans bactérie et gardé pour la nuit à 20°C. Le jour suivant, les vers larvaires L1 ont été transférés sur des pétris NGMensemencés avec la bactérie *E. coli* OP50 et gardés à 20°C.

Test de paralysie en culture solide

Les vers exprimant AXN3-CAG14 ou ATXN3-CAG89 ont été comptés pour le test de paralysie du premier jour adulte jusqu'au douzième jour adulte. Environ 30 à 40 vers au stade larvaire L4 (obtenus *via* la synchronisation) ont été transférés sur des pétris NGM ou NMG + [composé] et comptés en tant que paralysés lorsqu'ils ont été incapables de bouger suite au stimulus tactile, du jour un au jour douze adulte. Les vers ont été transférés sur des pétris frais à chaque deux jours jusqu'à l'arrêt de la production de progéniture. Toutes les expériences ont été effectuées à 20°C et chaque condition a été accomplie en triplicata avec 30-40 vers/pétris. Trois expériences indépendantes ont été réalisées.

Test de longévité

Approximativement 40 vers larvaires L4 (obtenus *via* la synchronisation) ont été transférés sur des pétris NGM utilisant la solution tampon M9. Lors des tests de longévité, les vers ont été cultivés sur milieu NGM (contrôle) ou NMG + [composé]. Ils ont été comptés chaque jour du premier jour adulte jusqu'à leur mort. Les vers ont été transférés sur des pétris frais à chaque deux jours jusqu'à l'arrêt de la production de progéniture. Les vers ont été considérés en tant

que mort lorsqu'ils ont été dans l'incapacité de répondre au stimulus tactile et ne démontraient aucun mouvement spontané ou aucune réponse quand ils ont été touchés avec un pic. Les souches transgéniques ATXN3 ont été comparées avec les vers sauvages N2. Toutes les expériences ont été effectuées à 20°C et chaque condition a été accomplie en triplicata avec 40 vers/pétris. Trois expériences indépendantes ont été réalisées.

Microscopie à fluorescence

Les vers ont été immobilisés en utilisant la solution tampon M9 avec glycérol 60% et ont été montés sur lame avec agarose 2%. La fluorescence mCherry a été visualisée à 595 nm et GFP à 488 nm utilisant la microscopie Zeiss Axio Imager M2. L'expression de la fluorescence a été observée utilisant la microscopie DIC Zeiss AxioObserver A1. Le logiciel utilisé a été AxioVs40 4.8.2.0.

Les souches transgéniques *unc-47::mCherry*; ATXN3-CAG₁₄ et *unc-47::mCherry*; ATXN3-CAG₈₉ synchronisées ont été cultivées sur milieu NGM ou NGM + [composé]. Ils ont été récoltés au stade adulte jour cinq pour la visualisation des processus de motoneurones (test de neurodégénérescence) *in vivo*. Un minimum de 100 vers a été comptabilisé pour chaque traitement sur trois essais. Les images ont été inversées en noir et blanc à partir du logiciel Photoshop pour permettre de mieux visualiser l'expression et le contraste du signal.

Pour la visualisation de la réponse au stress du RE, les vers *hsp-4::GFP*, *hsp-4::GFP*; ATXN3-CAG₁₄ et *hsp-4::GFP*; ATXN3-CAG₈₉ ont été cultivés sur milieu NGM ou NGM + [composé]. Ils ont été collectés au stade adulte jour un. Dix-sept à vingt-cinq vers ont été comptabilisés pour chaque traitement sur trois essais. Afin de comparer la fluorescence, des changements

dans le ratio (grandeur du ver/intensité de la fluorescence) ont été calculés pour chacun des vers pour chaque traitement. Les processus d'image et la quantification ont été effectués avec Adobe Photoshop. Le test *t* de Student a été utilisé pour l'analyse statistique.

Pour la détection du stress oxydatif, les vers *unc-47::mCherry*; *ATXN3-CAG₁₄*, *unc-47::mCherry*; *ATXN3-CAG₈₉* et N2 sauvages synchronisés ont été cultivés sur milieu NGM ou NGM + [composé]. Ils ont été récoltés au stade adulte jour deux et incubés sur des lames contenant 5 µM de diacétate de 2',7'-dichlorofluorescéine (DCF-DA, Sigma-Aldrich; permet la détection des réactives de l'oxygène (ROS) en émettant des sondes mesurables en fluorescence) pendant 30 min à température de pièce. Les lames ont été lavées trois fois pendant 10 min avec du PBS 1X (10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM NaH₂PO₄; 140 mM NaCl, pH ajusté à 7.4; ajout de ddH₂O jusqu'à 1000 mL). Vingt-cinq à trente vers ont été comptabilisés pour chaque traitement sur trois essais. Pour comparer la fluorescence, des changements dans le ratio (grandeur du ver/intensité de la fluorescence) ont été calculés pour chacun des vers pour chaque traitement. Les processus d'image et la quantification ont été effectués avec Adobe Photoshop. Le test *t* de Student a été utilisé pour l'analyse statistique.

Primers utilisés pour PCR Semiquantitative

ATXN3 forward, GCCGGATCCATGGAGTCCATCTTC; *ATXN3* reverse,
CGCGGTACCATGAATTCCTGTCCT; *atx(tm1689)* forward,
CGAGACACTTCAGAGCCATCC; *atx(tm1689)* reverse, CAGCATGAGGAATATTATTG.

Test des composés chimiques sur agar

Les vers ont été exposés du stade larvaire L1 (obtenus par synchronisation) à 60 μ M Bleu de Méthylène, 50 μ M Salubrinal ou 50 μ M Guanabenz incorporés dans du milieu NGM, ou sans ajout pour les contrôles. Tous les pétris sontensemencés avec *E. coli* OP50. Les composés sont procurés par Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) et Tocris Bioscience (Ellisville, MO). Brièvement, 30 à 40 vers ont été placés sur les milieux NGM correspondants (30-40 vers/pétri pour chaque condition et chaque condition ont été effectués en triplicata) afin de compléter les tests de paralysie, longévité, criblage pharmacologique et neurodégénérescence (microscopie à fluorescence).

Test des composés en milieu liquide

Le mouvement en milieu liquide des vers a été mesuré par la machine WMicroTracker (Phylum Tech) (144). Brièvement, les vers ont été exposés jusqu'au stade adulte jour cinq (obtenus par synchronisation) sur le milieu NGM correspondant et ensuite, transférés dans une plaque de 96 puits pour le criblage pharmacologique liquide. Chaque puits contenait un volume final de 100 μ L du composé avec la concentration appropriée optimale (60 μ M Bleu de Méthylène, 50 μ M Salubrinal ou 50 μ M Guanabenz) ou de la solution tampon M9 utilisée en tant que contrôle et environ 30 vers au stade adulte jour cinq. Chaque traitement a été effectué en triplicata et les expériences ont été répétées pour au moins trois fois. Le mouvement des nématodes a été suivi pendant dix heures.

Lysats de nématodes

Les vers ont été collectés avec du tampon M9, lavés trois fois avec cette même solution et puis, les culots recueillis ont été placés à -80°C pour toute la nuit. Les culots ont été lysés dans le tampon RIPA (150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7.4, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 1% sodium deoxycholate) et 0.1% inhibiteurs de protéases (Leupeptine 10mg/mL, Pepstatine A 10 mg/mL, Chymostatine 10mg/mL :LPC; 1 :1000). Une fois lysée, les culots ont été passés dix fois à travers une seringue 27_{1/2}G, soniqués deux fois 5min et enfin, centrifugés à 16 000g pour 15min à 4°C. Les surnageants ont été collectés dans des tubes de 1.5mL et conservés à -80°C.

Lysats de cellules

Les cellules dérivées des patients sains et malades ont été obtenues de Dr Guy Rouleau (Hôpital et Institut Neurologique, Université de McGill). Les lignées cellulaires lymphoblastoïdes pour la MMJ (LCL) ont été obtenus par les échantillons sanguins périphériques des patients ayant la MMJ d'origine européenne. Les cellules ont été poussées dans du IMDM (Gibco) supplémenté avec du sérum fœtal bovin (10%), pénicilline, streptomycine (100 unités/ml) et L-glutamine (0.292 mg/ml). Les cellules collectées ont été centrifugées à 1000 rpm (Rotor FA-45-24-11) pendant 2min à 4°C. Les culots ont été transférés dans de nouveaux tubes eppendorfs avec 1 mL du PBS froid 1X (10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM NaH₂PO₄; 140 mM NaCl, ajustement du pH à 7.4; ajout de ddH₂O jusqu'à 1000 mL) et ont été centrifugés à 1000 rpm pour 5min à 4°C. Cette étape a été répétée trois fois. Les

surnageants ont été aspirés et les culots ont été suspendus dans un volume approprié du tampon RIPA (150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7.4, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 1% sodium deoxycholate) et 0.1% inhibiteurs de protéases (Leupeptine 10mg/mL, Pepstatine A 10 mg/mL, Chymostatine 10mg/mL :LPC; 1 :1000). Les échantillons ont été mis sur la glace pendant 10min puis ils ont été placés à la température de la pièce pendant 10min. Ces échantillons ont été centrifugés à 12000 rpm (Rotor FA-45-24-11) pendant 15 min à 4°C. Les culots ont été éliminés et les surnageants collectés dans des tubes de 1.5mL et gardés à -80°C (Fardghassemi et al., *article inséré dans ce mémoire en état de préparation*).

Quantification protéique

Les surnageants récoltés ont été tous quantifiés par le kit BCA Protein Assay (Thermo Scientific), selon les instructions et le protocole du fabricant.

Immunobuvardage de type Western

Trente-cinq microgrammes de protéines par puits ont été déposés dans un gel polyacrylamide 10% pour 80min, transférées sur membrane de nitrocellulose (BioRad) et immunobuvardés. Les anticorps utilisés : anti-ATXN3 lapin (1:1000, Proteintech) et anti-Actin souris (1:5000, MP Biomedical). La révélation a été réalisée en utilisant des anticorps secondaires peroxydases conjuguées et le kit de révélation ECL (Thermo Scientific). Les souches N2 sauvages et *atx-3(tm1689)* ont été utilisées en tant que contrôles. Poids moléculaire utilisé: Precision Plus Protein Kaleidoscope (BioRad). La quantification des films a été réalisée avec le logiciel Adobe Photoshop.

Statistiques

Pour les expériences de paralysie et longévité, les courbes de survie ont été générées et comparées en utilisant le test de Log-rank (Mantel-Cox). Pour les tests de neurodégénérescence, criblage pharmacologique et fluorescence (stress oxydatif et réponse au stress du RE), le test t de Student's a été réalisé. Pour comparer la fluorescence, des changements dans le ratio (grandeur du ver/intensité de la fluorescence) ont été calculés pour chacun de vers pour chaque traitement. Toutes les expériences sont effectuées pour un minimum de trois fois de façon indépendante. Le logiciel Prism 6 (GraphPad Software) a été utilisé pour toutes les analyses statistiques.

C. Manuscrit

Rescue of ATXN3 neuronal toxicity in *C. elegans* by chemical modification of ER stress

Yasmin Fardghassemi¹, Arnaud Tauffenberger², Sarah Gosselin³, and J. Alex Parker^{1,2,3*}

¹ CRCHUM and Department of Biochemistry, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada

² CRCHUM and Department of Pathology and Cell Biology, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada

³ CRCHUM and Department of Neuroscience, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada

*Corresponding author at:

900 rue Saint-Denis, Tour Viger, CRCHUM, R09.440

Montréal, Québec, Canada, H2X 0A9. Tel.: +1 514-890-8000 ext. 28826. Fax: +1 514 412-7602

Abstract

Background: Polyglutamine expansion diseases are a group of hereditary neurodegenerative disorders that develop when a CAG repeat in the causative genes is unstably expanded above a certain threshold. The expansion of trinucleotide CAG repeats cause hereditary adult-onset neurodegenerative disorders such as Huntington's disease, dentatorubral-pallidoluysian atrophy, spinobulbar muscular atrophy and multiple forms of spinocerebellar ataxia (SCA). The most common dominantly inherited spinocerebellar ataxia is the type 3 (SCA3) also known as Machado-Joseph disease (MJD), an autosomal dominant, progressive neurological disorder. The gene causatively associated with MJD is *ATXN3*. Recent studies have shown that this gene modulates endoplasmic reticulum (ER) stress.

Results: In this study, we generated transgenic *C. elegans* strains expressing wild type or mutant human *ATXN3* genes and tested them for recovery of locomotor phenotype, lifespan and neurodegeneration phenotypes upon treatment with compounds known to modulate ER stress and having neuroprotective roles. We observed differences between both transgenic lines and found that the motility defects, the reduced lifespan and the neurodegeneration can be rescued by methylene blue, guanabenz and salubrinal. These compounds were also able to prevent the oxidative stress and the ER stress response induced by mutant transgenic worms.

Conclusions: We introduce novel *C. elegans* models for MJD based on the expression of full-length *ATXN3* in a limited number of neurons. Using these models we discovered that chemical modulation of the ER unfolded protein response reduced neurodegeneration and could be a new therapeutic approach for the treatment of MJD.

Background

Polyglutamine (poly-Q) expansion diseases are a class of dominantly inherited neurodegenerative disorders that develop when there is an abnormal expansion, and subsequent translation, of trinucleotide CAG repeats (1-4). These diseases are characterized by a selective loss of neurons along with physical and psychological complications (2). Indeed, the abnormal expansion of polyglutamine induces numerous pathological changes in patients including: modifications of the proteome leading to functional alterations, generation of toxic poly-Q protein species, protein aggregation, transcriptional dysregulation, proteotoxic stress, and mitochondrial dysfunction (3). However the exact mechanism of disease pathogenesis is still not well understood. The poly-Q expansion diseases include several neurodegenerative disorders including Huntington's disease, dentatorubral-pallidoluysian atrophy, spinobulbar muscular atrophy and six forms of spinocerebellar ataxia (SCA) (2,5). SCA3 (spinocerebellar ataxia type 3) is the most common dominantly inherited spinocerebellar ataxia, also known as Machado-Joseph disease (MJD) (6).

MJD is an autosomal dominant progressive neurologic disorder characterized principally by ataxia, spasticity, peripheral neuropathy and ocular movement abnormalities (7). This disease is accompanied by neurodegeneration in selective regions, mainly in the cerebellum, basal ganglia, brainstem and spinal cord (2,5,8). Regarding brain function, it was shown that metabolism is decreased in several regions of the nervous system such as the cerebellum, brainstem and cerebral cortex along with negative perturbations in both dopaminergic and cholinergic neurotransmission (9-13). The gene causatively associated with MJD is *ATXN3*

(*Ataxin-3*) and is located on chromosome 14 (14q24.3-14q32.45) (14,15). This gene encodes a poly-Q containing protein named ataxin-3 (*atx3*) (14).

Ataxin-3 has 339 amino acid residues with an estimated molecular weight of 42 kDa for normal individuals (14). In healthy individuals, the CAG repeat lies between 10 and 51 and is expanded between 55 and 87 repeats in the disease state (16,17). This gene is composed of different functional domains: the N-terminus of the catalytic Josephin domain that presents a globular and a very conserved structure, followed by two ubiquitin interacting motifs (UIM) that are also considered as conserved regions, the poly-Q domain and finally, depending of the types of protein isoform, a third atypical ubiquitin interacting motif (UIM) in the C-terminus tail (18,19).

To aid the study of Machado-Joseph disease we turned to the model organism *Caenorhabditis elegans*. This nematode is 1 mm long, easy to maintain in laboratory settings, highly amenable to genetic manipulation, and is especially well-suited for neuroscience research due to its comprehensively detailed neuronal lineage and interconnectivity of synapses that resembles aspects of the vertebrate nervous system (20). Additionally, the *C. elegans* genome contains an orthologue of *ATXN3*, named *atx-3*. Ataxin-3 has been identified as participating in the endoplasmic reticulum network (2,21,22). We previously showed that several compounds, including methylene blue, salubrinal and guanabenz target the ER stress response and protect against proteotoxicity in simple models of amyotrophic lateral sclerosis (23,24) and, have beneficial effects in models of the neurological disorder hereditary spastic paraplegia (25). In this study, using our transgenic *C. elegans ATXN3* models we explored whether small molecules that regulate ER stress response activity were able to rescue the locomotor

phenotype, the neuronal loss, the oxidative stress and the ER stress response observed in mutant transgenic animals as an early effort for MJD therapy development.

Results

Expression of full-length human *ATXN3* in *C. elegans*

We aimed to create strains to model MJD by expressing full-length, human *ATXN3* in *C. elegans*. It has been shown previously that expressing ataxin-3 with 89 CAG repeats (CAG89) results in neurodegeneration, as well as protein misfolding phenotypes in cell culture and *Drosophila* models (26). Based on our previous neurodegeneration models, we expressed human *ATXN3*, either wild-type ATXN3-CAG14 (**Figure 1A**) or mutant ATXN3-CAG89 (**Figure 1B**) in the worm's 26 GABAergic motor neurons with the vesicular GABA transporter (*unc-47*) promoter. Transgenics were created by MoSCi transposon-mediated single-copy insertion (27). Several lines were isolated for each transgene and those showing similar behavioural profiles were kept for further analysis.

We confirmed the expression of full-length human *ATXN3* in these transgenic *C. elegans* strains by western blotting with a human specific anti-ATXN3 antibody. A band corresponding to wild type ATXN3-CAG₁₄, as well as a larger band for the MJD-associated mutant ATXN3-CAG₈₉ were detected by western blotting of worm protein extracts. However, the anti-ATXN3 also detected a band in non-transgenic wild type N2 animals (**Figure 1C**). *atx-3* encodes a deubiquitylating enzyme that is the highly conserved *C. elegans* orthologue of human *ATXN3* (14,21), thus can be detected by western blotting with a human specific ATXN3 antibody. To confirm this, we carried a western blot using the anti-ATXN3 antibody and protein extracts from *atx-3(tm1689)* worms. *atx-3(tm1689)* is a loss of function mutation consisting of a 660 base pair deletion along with a 6 base pair insertion (28,29), and no signal was observed. These data suggest that the anti-ATXN3 antibody recognizes *C. elegans* ATX-3

in N2 wild-type worms and partially obscures the signal for ATXN3-CAG14 transgenics, but a specific, higher molecular weight signal is visible in extracts from ATXN3-CAG89 animals (**Figure 1C**). Finally, we confirmed the specificity of the anti-ATXN3 antibody by western blotting using protein extracts from cells originating from healthy controls or MJD patients (**Figure 1D**).

Mutant ATXN3 transgenics have decreased lifespan, impaired motor phenotypes and neuronal dysfunction

We first investigated whether lifespan was altered in our *ATXN3* transgenics. Using age-synchronized animals we observed that both ATXN3-CAG14 and ATXN3-CAG89 transgenics showed significantly decreased lifespan compared to non-transgenic wild-type N2 worms (**Figure 2A**). These data demonstrate that increased expression of *ATXN3* transgenes have negative consequences on lifespan, but the mutant ATXN3-CAG89 transgene has a more severe phenotype compared to ATXN3-CAG14.

Decreased lifespan can indicate poor health of the animals and one sign of aging in *C. elegans* is decreased motility that can be quantified using assays for progressive, age-dependent paralysis (30,31). We observed that the age-synchronized ATXN3-CAG89 transgenics displayed progressive motor defects compared to wild type ATXN3-CAG14 transgenics. Starting during adulthood, ATXN3-CAG89 transgenics displayed uncoordinated motility phenotypes progressing to paralysis over a period of 12 days, and occurred at higher rate compared to ATXN3-CAG14 controls (**Figure 2B**).

Furthermore, we tracked N2 wild type and both transgenics worm's movement for ten minutes. We observed that ATXN3-CAG89 worms have definitely considerable motility

defects when compared to wild-type N2 and ATXN3-CAG14 worms (**Figure 2C**). Thus, with these data, we can observe that mutant ATXN3-CAG89 transgenic worms cause neuronal dysfunction in GABA neurons leading to progressive motility defects resulting into paralysis phenotype.

Mutant ATXN3-CAG89 causes progressive motor neuron degeneration

Many neurodegenerative diseases are characterized by neuronal dysfunction prior to degeneration (32). To determine if the progressive paralysis phenotype observed in ATXN3-CAG89 worms was accompanied by neurodegeneration, we crossed the transgenic lines with an integrated reporter, *unc-47p::mCherry*, expressing the red fluorescent protein mCherry in GABAergic motor neurons (33). We observed a significant increase of gaps or breaks in motor neurons of ATXN3-CAG89 worms when compared to the wild-type *unc-47p::mCherry* and ATXN3-CAG14 transgenics at day five of adulthood (**Figure 2D-G**). These observations suggest a gradual decline of neuronal function that correlates with age dependent neurodegeneration as observed in diseases like MJD.

Methylene blue, salubrinal and guanabenz suppress paralysis and, extend the lifespan in ATXN3-CAG89 transgenics

Our group previously identified several small molecules including methylene blue, salubrinal and guanabenz that target the ER stress response and were shown to have beneficial effects against human mutant TDP-43 neuronal toxicity in models for amyotrophic lateral sclerosis (23,24) and also, to have protective effects in models for hereditary spastic paraplegia (25). Thus we wondered if these compounds had neuroprotective activity against mutant ATXN3-

CAG89. We tested these compounds and found that all three molecules suppressed the paralysis phenotype caused by mutant ATXN3-CAG89 (**Figure 3A-C**), and extended the lifespan of these transgenic worms (**Figure 3D**).

We wanted to confirm the neuroprotective activity of these molecules with a separate approach so we turned to an automated assay that measures the movement of *C. elegans* grown in liquid culture over several hours instead of days (24,34,35). We observed that ATXN3-CAG89 animals treated with methylene blue, salubrinal or guanabenz had increased motility compared to untreated controls (**Figure 4**). These data suggest that molecules regulating the ER stress response can attenuate neuronal dysfunction caused by mutant ATXN3-CAG89.

Small molecules rescue neurodegeneration in ATXN3-CAG89 transgenics

After observing that methylene blue, salubrinal or guanabenz suppressed mutant ATXN3-CAG89 induced paralysis, we examined if these compounds had protective effects against motor neuron degeneration. Using the *unc-47p::mCherry*; ATXN3-CAG89 strain, we visualized the GABAergic motor neurons *in vivo* in day-5 adults and observed a significant decrease of neurodegeneration for worms when treated with any of the three compounds (**Figure 5**). These data demonstrate that chemical manipulation of ER stress mechanisms protects neurons against mutant ATXN3 toxicity.

Methylene blue, guanabenz and salubrinal prevent the oxidative stress induced by ATXN3- CAG89 transgenics

We wondered if a mechanism associated with mutant ATXN3-CAG89 toxicity involved elevated levels of oxidative stress as we have previously observed in other models of neuronal proteotoxicity (23,24). Global oxidative stress can be detected by staining worms with the fluorescent dye 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) and we observed increased fluorescence in ATXN3-CAG89 transgenics compared to wild-type N2 and ATXN3-CAG14 transgenic worms (**Figure 6A-C**). Our previous work suggests that oxidative stress is associated with activation of the unfolded protein response in the ER (23,25). Furthermore, small molecule mediated reduction of the ER stress response was likewise correlated with decreased oxidative stress levels in *C. elegans* proteotoxicity models. We observed that treatment of ATXN3-CAG89 transgenics with methylene blue, guanabenz or salubrinal reduced the fluorescence from DCF-DA staining (**Figure 6D-G**). These data suggest that the ER stress response may be involved in neuronal toxicity caused by mutant ATXN3-CAG89.

Rescue of ER stress response by methylene blue, guanabenz and salubrinal in ATXN3-CAG89 transgenic worms

After observing a high level of oxidative stress in ATXN3-CAG89 transgenics, we wanted to directly test for the involvement of the ER stress response. *hsp-4* encodes a protective Hsp70/BiP protein induced by ER-stress that can be monitored with a transgenic *hsp-4::GFP* reporter strain (36). We crossed the ATXN3 transgenics with the *hsp-4::GFP* reporter and we observed increased fluorescence in ATXN3-CAG89; *hsp-4::GFP* animals compared to ATXN3-CAG14; *hsp-4::GFP* or *hsp-4::GFP* controls (**Figure 7A**, top panels). We recently

showed that methylene blue, guanabenz and salubrinal rescue the ER stress response in multiple models for hereditary spastic paraplegias, another neurological disorder (25). Basing on this finding, we examined whether any of these compounds were able to prevent the ER stress response caused by ATXN3-CAG89 transgenics. We found that all three compounds highly reduced the ER stress response in mutant ATXN3-CAG89 transgenics (**Figure 7**). A significant reduction of the ER stress is also observed in the ATXN3-CAG14 transgenic worms when treated with the compounds. This reduction might be due to the insertion of the CAG trinucleotide repeat expansion. Indeed, even though the insertion of 14 CAG trinucleotide repeat expansion is considered as non-pathogenic, it can produce an instability in the system of the worm resulting into an ER stress response. Also, we noticed an important induction of the GFP signal in *hsp-4*::GFP worms when treated with MB and Sal, showing an increase of the expression of this chaperone which is implicated in the ER stress response. These data suggest that small molecule interventions centered on the ER stress response may protect against mutant ATXN3 toxicity.

Discussion

In this study we introduced a novel *C. elegans* model for investigating mechanisms of motor neuron toxicity caused by a polyglutamine expansion in ATXN3. To model human disease we expressed full-length human *ATXN3* without additional tags, since the inclusions of tags can mask or enhance the phenotypes of wild type and mutant proteins (40,41). We engineered strains expressing *ATXN3* in the animal's 26 GABAergic neurons since MJD disease is in part associated with degeneration of motor neurons (7,32,42-45). Furthermore we have previously constructed neurodegeneration models based on the expression of human disease proteins in these same GABAergic motor neurons and found that the transgenic models provide robust phenotypes for experimentation (24). ATXN3-CAG89 transgenic worms showed a progressive age-dependent paralysis, and reduced lifespan phenotypes compared to wild-type ATXN3-CAG14 transgenics. Consistent with the reduced motility observed in ATXN3-CAG89 transgenics, we also observed significant neurodegeneration in ATXN3-CAG89 transgenics compared to ATXN3-CAG14 controls. These data demonstrate that the ATXN3-CAG89 transgenics produce phenotypes distinct from wild type ATXN3-CAG14 and that these mutant animals may be suitable for modifier screening.

To explore the potential of chemical modifier screens, we tested whether we could suppress mutant ATXN3-CAG89 phenotypes with known neuroprotective compounds. Considering the evidence linking *ATXN3* containing an expanded CAG repeat to ER stress (2,21,22,46,47), and our previous findings linking ER stress to other neurodegenerative diseases (23-25), we investigated if pharmacological interventions centred on ER stress could protect against

mutant ATXN3-CAG89 toxicity. We focused on three compounds, guanabenz, salubrinal and methylene blue for their known neuroprotective activity and their roles as ER stress modulators (2,21,23,24). Encouragingly, we observed that the three compounds rescued motility defects, reduced lifespan and neurodegeneration in animals expressing mutant ATXN3-CAG89. Moreover, these three compounds were also able to prevent the oxidative stress and the ER stress response induced by ATXN3-CAG89 transgenics. Additional studies are required to extend these findings to mammalian models of MJD. However, from a practical perspective, these compounds have been extensively characterized, and since guanabenz has FDA approval, it could be rapidly translated into clinical settings for MJD.

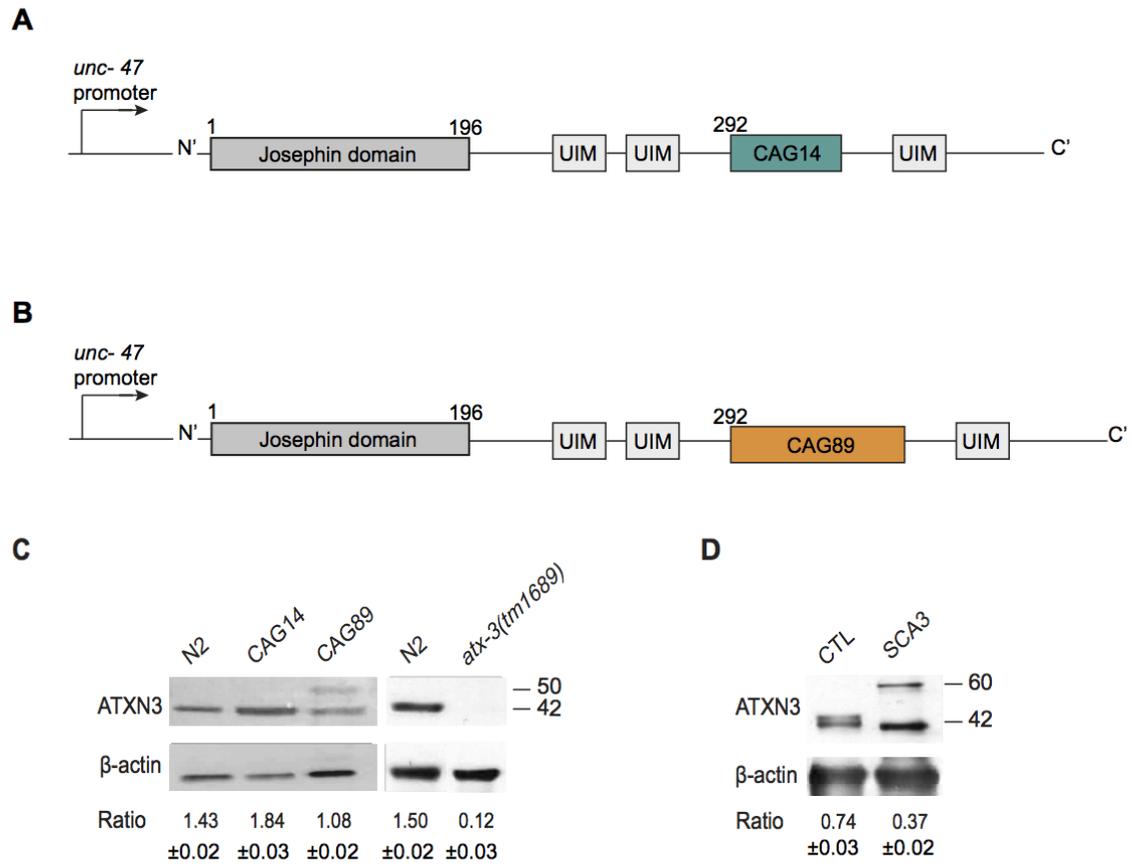


Figure 1

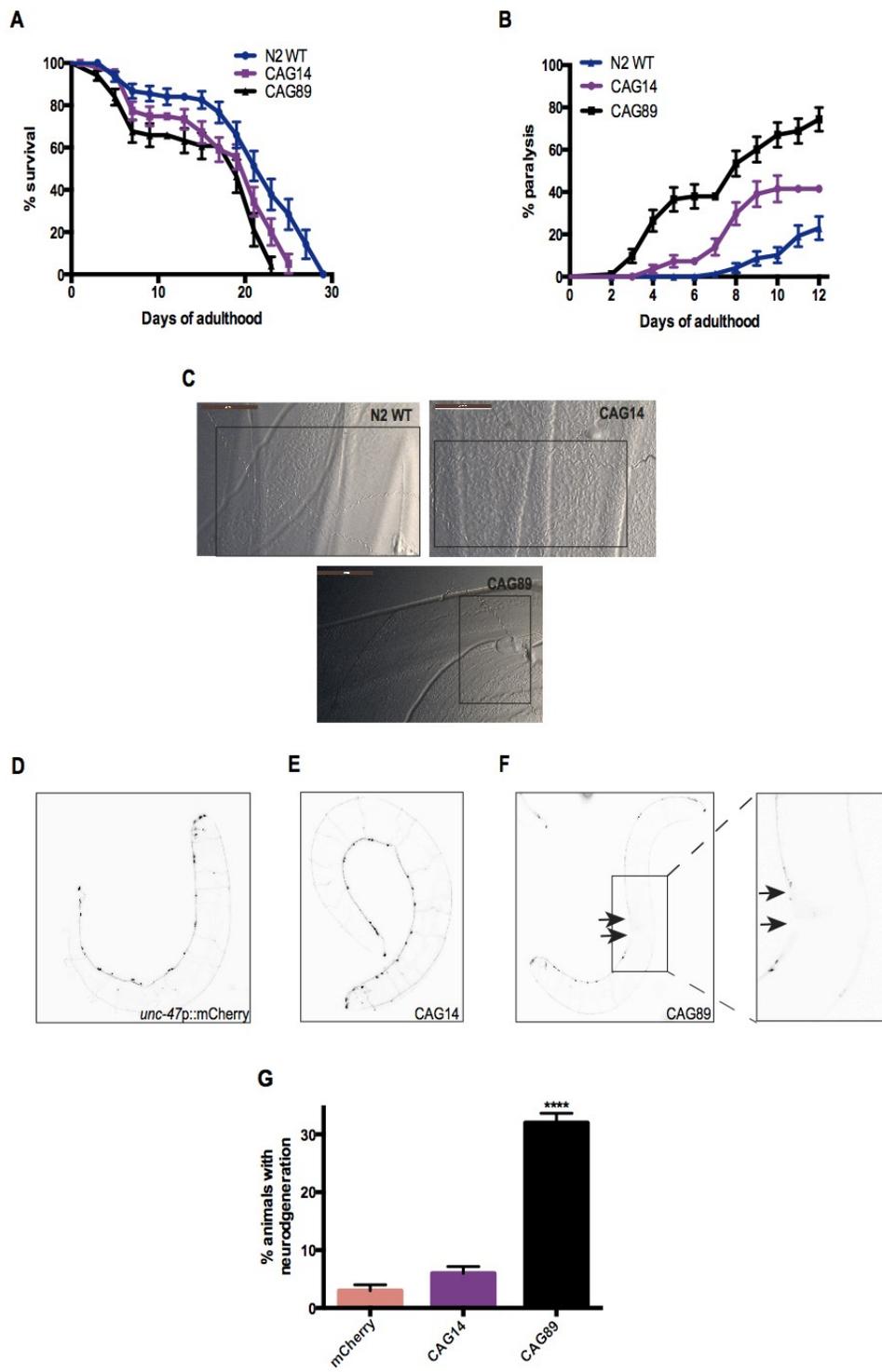


Figure 2

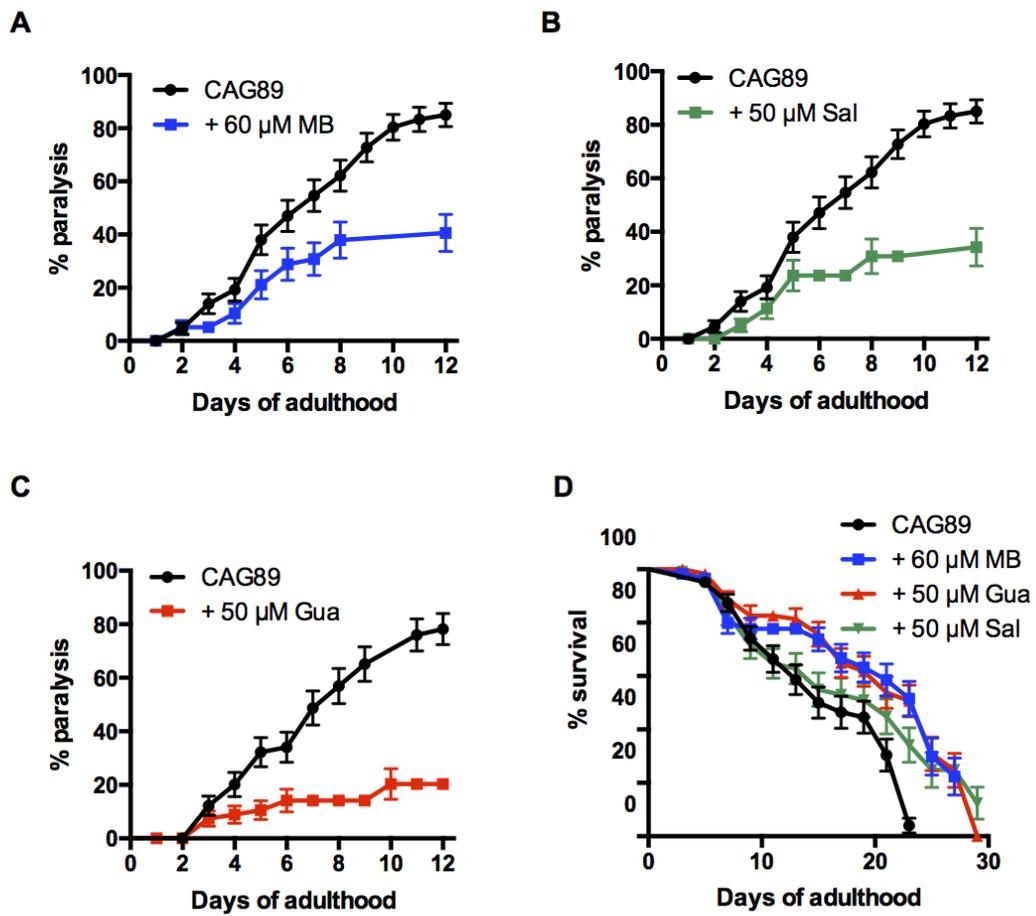


Figure 3

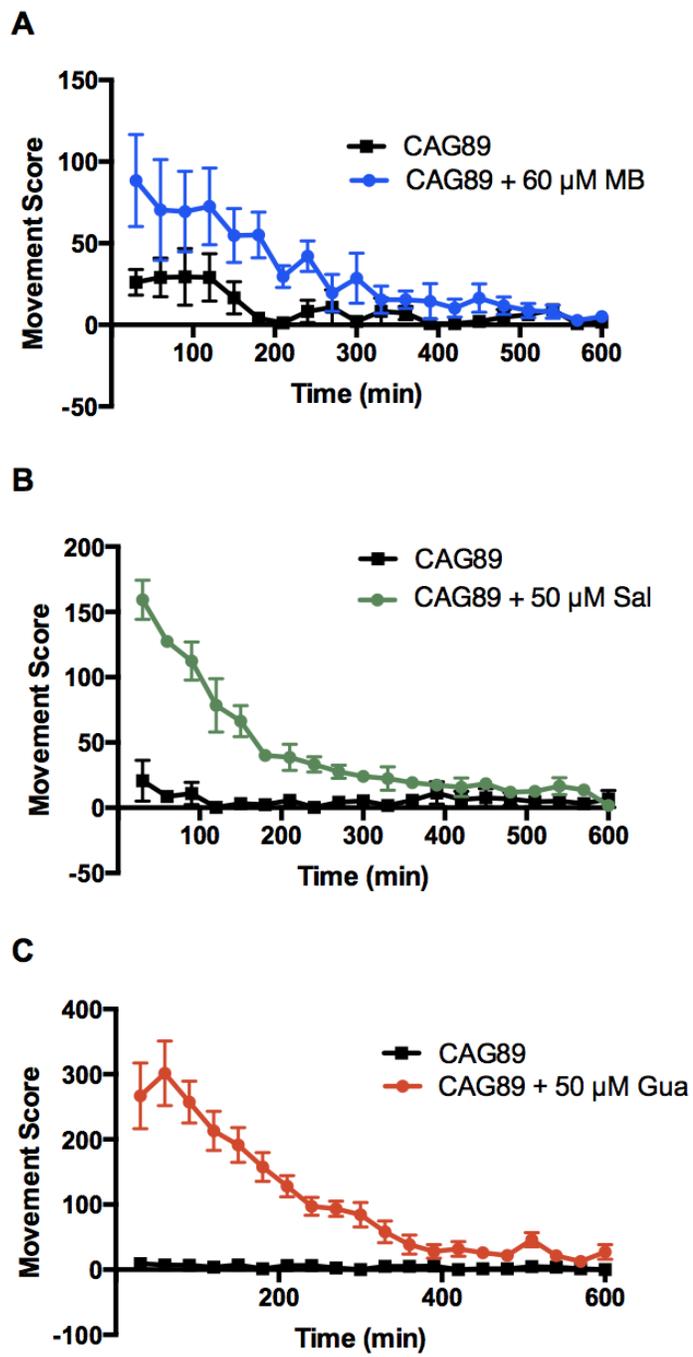


Figure 4

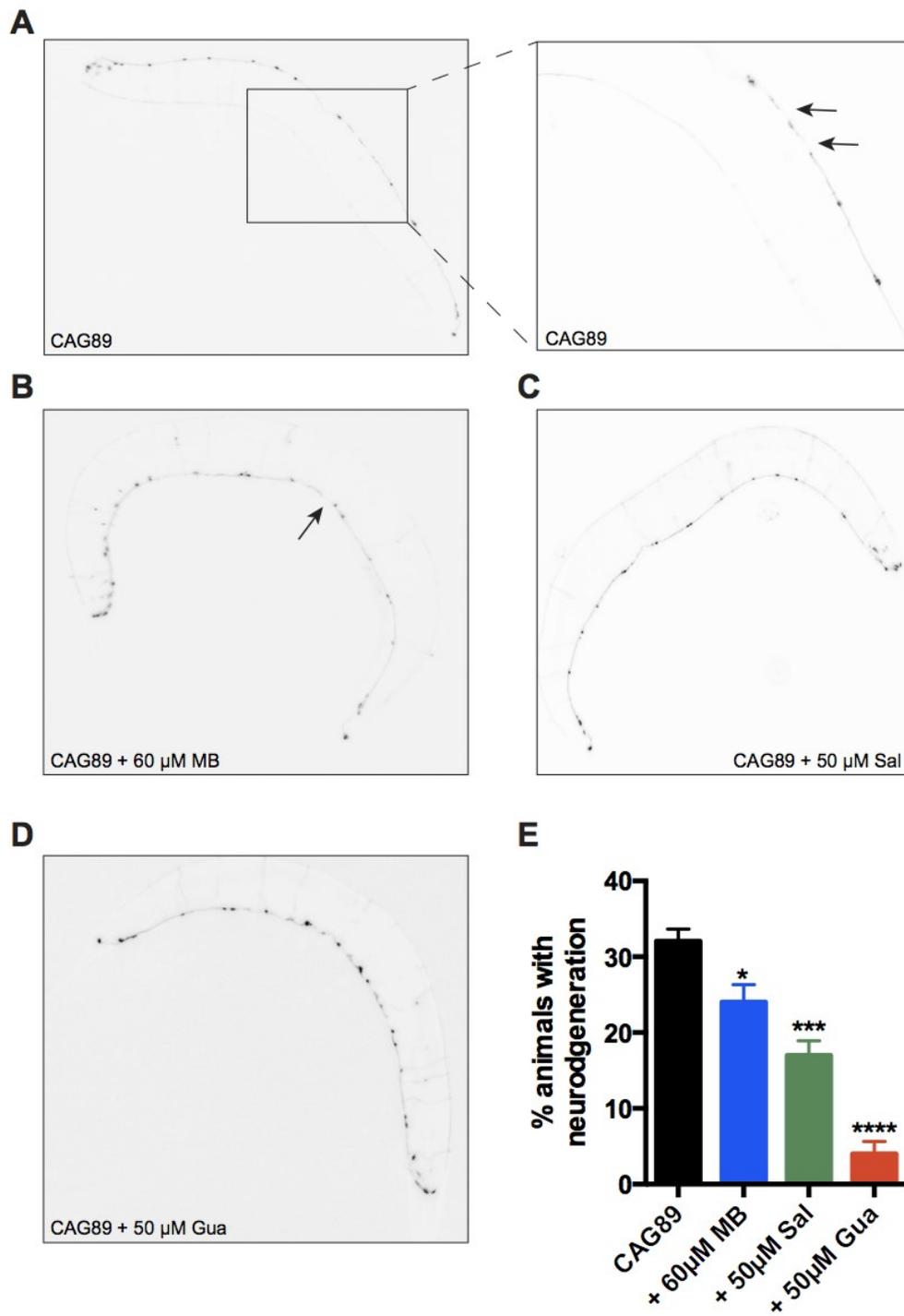


Figure 5

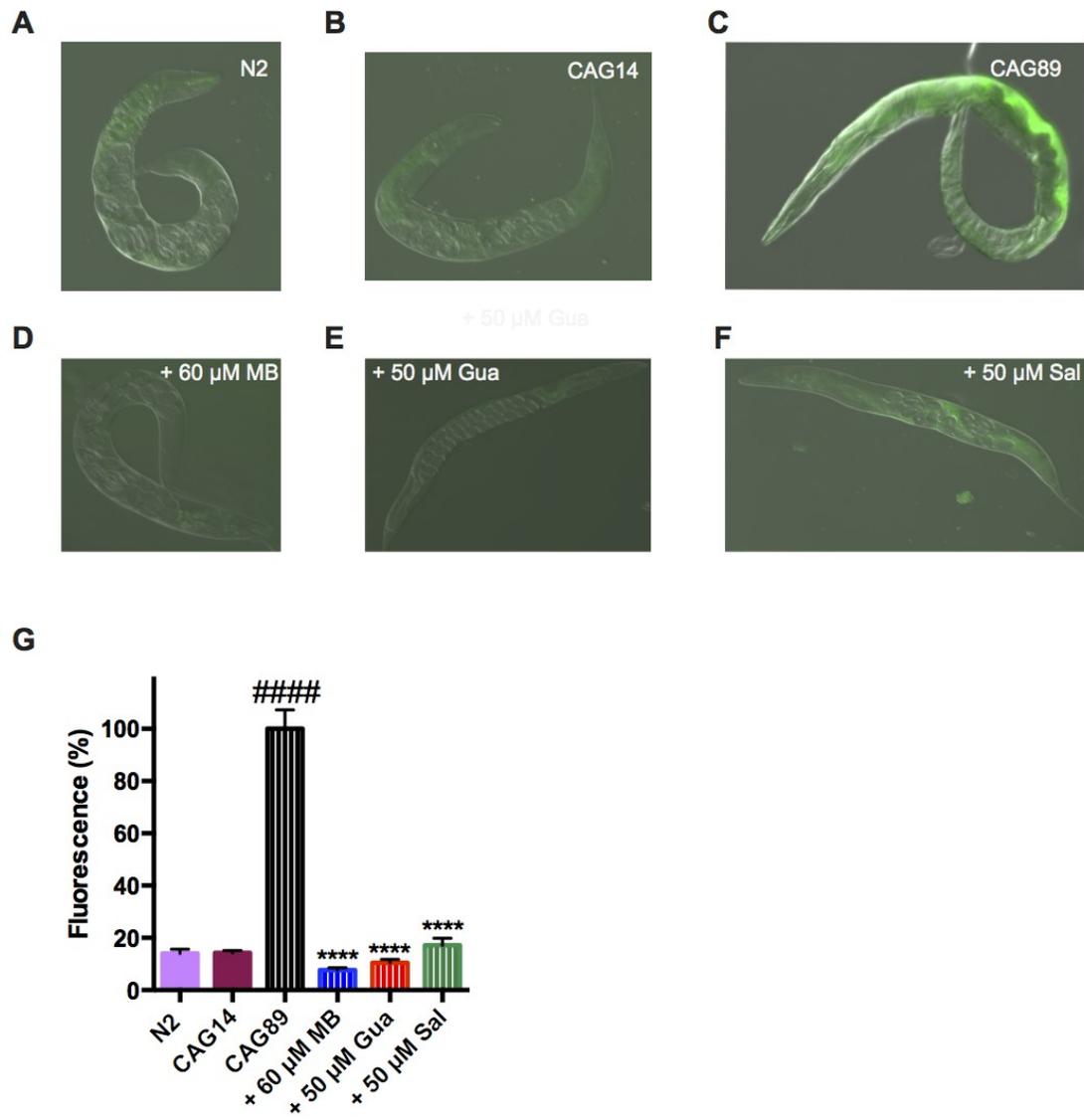


Figure 6

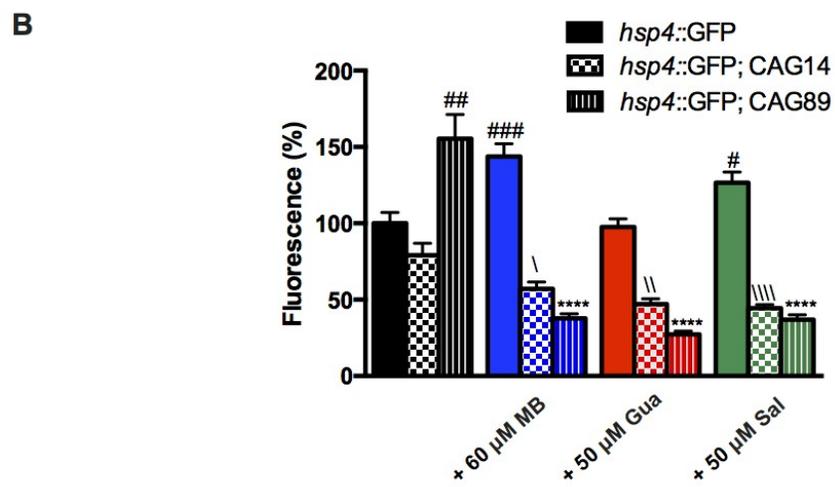
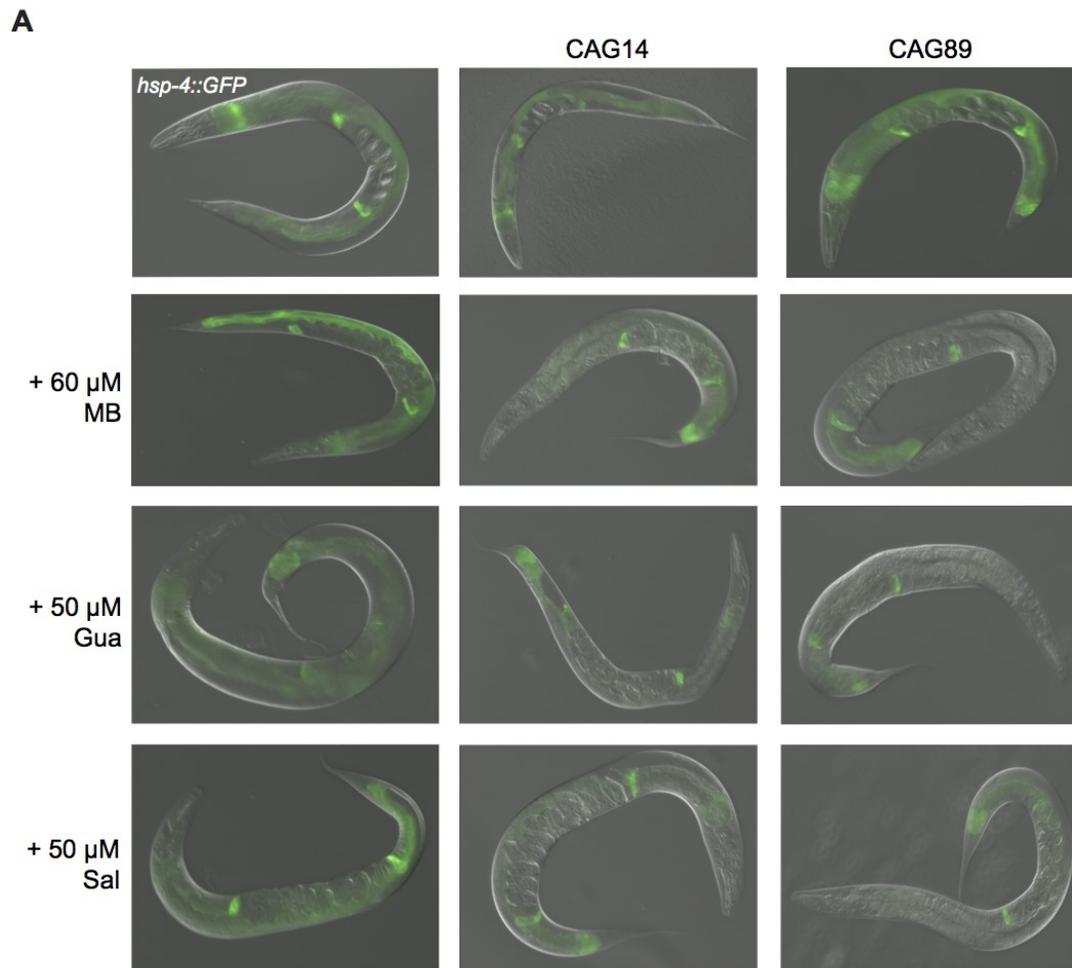


Figure 7

Materials and Methods

Nematode strains

Standard methods of culturing and handling worms were used (20). Worms were maintained on standard nematode growth media (NGM) plates streaked with OP50 *E. coli*. All strains were scored at 20°C. Strains used for this study were: N2 and *atx-3(tm1689)*, both obtained from the *C. elegans* Genetics Center (University of Minnesota, Minneapolis).

Transgenic ATXN3 worms and plasmid constructs

The *ATXN3* strains were described previously (37). Human cDNAs for wild type and mutant *ATXN3* were obtained from Dr. Guy Rouleau (Montreal Neurological Institute and Hospital, McGill University). The cDNAs were amplified by PCR and cloned into the Gateway vector pDONR221 following the manufacturer's protocol (Invitrogen). Multisite Gateway recombination was performed with the pDONR *ATXN3* clones along with clones containing the *unc-47* promoter (obtained from Dr Erik Jorgensen, University of Utah), the *unc-54* 3'UTR plasmid pCM5.37 (obtained from Dr. Geraldine Seydoux, John Hopkins, Addgene plasmid 17253) and the destination vector pCFJ150 to create *unc-47p::mCherry*; *ATXN3-CAG₁₄* and *unc-47p::mCherry*; *ATXN3-CAG₈₉* expression vectors. Transgenic lines were created by microinjection of *unc-119(ed3)* worms and screened for MoSCi transposon-mediated single copy insertion of the desired transgene. Several lines were isolated for each transgene of interest and those showing similar behavioural, transgene expression levels and molecular profiles were outcrossed and kept for further analysis. The strains used in this study include: XQ350 *unc-119(ed3)*; ttTi5605mosII; *xqIs350(unc-47p::ATXN3-CAG₁₄*; *unc-*

119(+)), and XQ351 *unc-119(ed3)*; *ttTi5605mosII*; *xqIs351(unc-47p::ATXN3-CAG89*; *unc-119(+)*).

Age-synchronized populations

To obtain age synchronized population of worms, ~8-10 adult hermaphrodites were placed on ten NGM plates for 3-4 days and kept at 20°C. Then, once the plates contained a large number of adult worms they were collected with M9 buffer (1M KH₂PO₄, 1M Na₂HPO₄, 1M NaCl, 1M MgSO₄) and centrifuged at 4000 rpm (A-4-81 Rotor) for 4min at 4°C. After centrifugation, 3 mL of the supernatant was taken and replaced with 3 mL of a mix solution containing NaOH 5M and bleach (1:2). 10min vortex followed with a high intensity to degrade the worms leaving a pellet containing only eggs. The pellet was washed 4 times with M9 buffer and centrifuged at 4000 rpm (A-4-81 Rotor) for 4 min at 4°C. The pellet was transferred onto NGM plates without bacteria and kept overnight at 20°C. The following day, L1 worms were transferred using M9 buffer onto plates streaked with OP50 *E. coli* and are kept at 20°C.

Paralysis assays on solid media

Worms expressing ATXN3-CAG14 or ATXN3-CAG89 were scored for paralysis from adult day one to adult day twelve. Briefly, 30-40 L4 worms (obtained via synchronization) were transferred onto NGM plates and from adult day one to adult day twelve, were scored as paralysed if they failed to move after being prodded with a worm pick. Worms were scored as dead if they were unable to respond to tactile head stimulus. They were transferred to fresh

plates every 2 days until the cessation of progeny production. All experiments were conducted at 20°C and, each condition was done in triplicates with 30-40 worms/plate.

Lifespan assays

Approximately 40 L4 worms (obtained via synchronization) were transferred using M9 buffer on new NGM plates and tested daily from adult day one until death. Worms were transferred to fresh plates every 2 days until the cessation of progeny production. Worms were scored as dead if they failed to respond to tactile stimulus and showed no spontaneous movement or response when prodded. Dead worms displaying internally hatched progeny, extruded gonads, or that crawled off the plate were excluded. The transgenic ATXN3 strains were compared with wild-type worms (N2). All experiments were conducted at 20°C and, each condition was done in triplicates with 40 worms/plate.

Fluorescence microscopy (neurodegeneration, ER stress response and oxidative stress assays)

For scoring of neuronal processes for gaps or breakages, *unc-47::mCherry*; ATXN3-CAG₈₉ and *unc-47::mCherry*; ATXN3-CAG₁₄ were collected at adult day five for visualization of motor neurons processes *in vivo*. For visualization of ER stress response, *hsp-4::GFP*, *hsp-4::GFP*; ATXN3-CAG₁₄ and *hsp-4::GFP*; ATXN3-CAG₈₉ worms were collected at adult day one and, for DCF-DA experiments, wild-type N2 worms and ATXN3 transgenic lines were collected at adult day two. The nematodes were immobilized using M9 buffer with 60% glycerol and mounted on slides with 2% agarose pads. mCherry was visualized at 595 nm and GFP was visualised at 488 nm using a Zeiss Axio Imager M2 microscope. Fluorescent

expression was visualized with a DIC microscope Zeiss AxioObserver A1. The software used was AxioVs40 4.8.2.0. Hundred worms were scored per condition for the neurodegeneration assays. Seventeen to twenty-five worms were visualized per condition for the ER stress response and the oxidative stress experiments. Image processing and quantification were done with Adobe Photoshop. To compare fluorescence in ER stress response and oxidative stress assays, we calculated the changes in the ratio (size of worm/intensity of fluorescence of the worm). Student's *t*-test was used for statistical analysis.

Tracking the movement on solid media

Synchronized adult day one worms were placed on NGM plates for 10 min. Their movement tracking have been photographed using a DCF-420 Camera with the Leica Application Suit (LAS) Core 4.7 Software.

Compound testing on solid media

Worms were exposed from hatching (by synchronization) to 60 μ M methylene blue, 50 μ M salubrinal or 50 μ M guanabenz incorporated into NGM solid medium, or NGM solid medium only as a control. All the plates were streaked with OP50 *E. coli*. Compounds were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) and Tocris Bioscience (Ellisville, MO). Briefly, 30-40 worms were picked and plated on the corresponding NGM medium (30-40 worms/plate for each condition and each condition was done in triplicates) in order to complete the paralysis and lifespan assays, the neurodegeneration observations (fluorescence microscopy) and the drug screens.

Compound testing in liquid culture

The swimming activity of the nematodes was measured by WMicroTracker machine (Phylum Tech) (48). Briefly, worms were exposed until day five of adulthood on the corresponding NGM medium plates (drug exposure on solid media) and then were transferred into a 96-well plate. Each well contained a final volume of 100 μ L of the drug with the appropriate concentration or M9 buffer used as control, and ~30 worms adult day five (obtained via synchronization). Each condition was done in triplicates and the experiments were repeated for at least three times. The nematodes swimming movements were tracked for ten hours.

Reactive oxygen species measurements

The *in vivo* detection of reactive oxygen (ROS) species in *C. elegans* is previously described (23,24). Briefly, age-synchronized worms at adult day two were incubated on a slide with 5 μ M 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA, Sigma-Aldrich) for 30 min at room temperature and washed three times for 5-10 min with PBS 1X (10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM NaH₂PO₄; 140 mM NaCl, adjust pH to 7.4; adding ddH₂O to 1000 mL). Worms were visualized by fluorescence microscopy under a 488 nm wavelength excitation.

Cell lysis

Cells derived from healthy and MJD patients were obtained from Dr. Guy Rouleau (Montreal Neurological Institute and Hospital, McGill University). MJD Lymphoblastoid cell lines (LCL) were established from peripheral blood samples of MJD patients of European origins. Cells were grown in IMDM (Gibco) supplemented with foetal bovine serum (10%), penicillin & streptomycin (100 units/ml) and L-glutamine (0.292 mg/ml). Collected cells were

centrifuged at 1000 rpm (FA-45-24-11 Rotor) for 2 min at 4°C. The supernatants were discarded and the pellets were transferred into new eppendorf tubes with 1mL cold PBS 1X (10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM NaH₂PO₄; 140 mM NaCl, adjust pH to 7.4; adding ddH₂O to 1000 mL) and centrifuged at 1000 rpm for 5min at 4°C. This step was repeated for 3 times. The media was aspirated and the pellets were resuspended in an appropriate volume of RIPA buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7.4, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 1% sodium deoxycholate) and 0.1% protease inhibitors (10mg/mL leupeptin, 10 mg/mL pepstatin A, 10 mg/mL chymostatin LPC; 1/1000) depending on pellet size. The samples were put on ice for 10min, and then placed at room temperature for 10 min . The samples were then centrifuged at 12000 rpm (FA-45-24-11 Rotor) for 15 min at 4°C. The pellets were discarded and, the supernatants were collected in 1.5mL tubes and stored at -80°C.

Western blotting

Fifteen plates of worms for each strain was collected with M9, centrifuged at 4000 rpm (A-4-81 Rotor) for 4 min at 4°C and washed twice with M9 buffer with the same centrifugation conditions. Worm pellets were placed at -80°C overnight. Pellets were lysed in RIPA buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7.4, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 1% sodium deoxycholate) and 0.1% protease inhibitors (10mg/mL leupeptin, 10 mg/mL pepstatin A, 10 mg/mL chymostatin LPC; 1/1000). Pellets were passed through a 27_{1/2} G syringe 7 times, sonicated for 5 minutes and, centrifuged at 16,000g for 15min at 4°C. Supernatants were collected in 1.5mL tubes. The supernatants were quantified using the BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific) following the manufacturer protocol and instructions.

Thirty-five micrograms per well of protein were loaded in a 10% polyacrylamide gel for 80 min, transferred to nitrocellulose membranes (BioRad) and immunoblotted. Antibodies used were: rabbit anti-ATXN3 (1:1000, Proteintech) and mouse anti-Actin (1:5000, MP Biomedical). Blots were visualized using peroxidase-conjugated secondary antibodies and ECL western blotting substrate (Thermo Scientific). N2 wild-type worms and *atx-3(tm1689)* were used as controls. Ladder used: Precision Plus Protein Kaleidoscope (BioRad). Densitometry was performed with Adobe Photoshop.

Statistics

Paralysis and lifespan curves were generated and compared using the Log-rank (Mantel-Cox) test. All experiments were repeated for at least three times. For neurodegeneration, the drug screening and the fluorescence tests (oxidative stress and ER stress response), Student's *t*-tests were realized. Prism 6 (GraphPad Software) was used for all statistical analyses.

Funding

This work was supported by Canadian Institutes of Health Research to J.A.P.

Acknowledgments

Some worm strains were provided by the CGC, which is funded by NIH Office of Research Infrastructure Programs (P40 OD010440). Special thanks to Dr Guy Rouleau (Montreal Neurological Institute and Hospital, McGill University) for providing human cDNAs ATXN3 and cell lines for healthy and MJD patients, Dr Erik Jorgensen (University of Utah) for providing clones containing the *unc-47* promoter and, Dr Geraldine Seydoux (John Hopkins, Addgene plasmid 17253) for the *unc-54* 3'UTR plasmid pCM5.37. A very special thanks to my lab members J. Vérièpe for being always present and helpful and, S. Peyrard for technical assistance.

Conflict of Interest Statement

Disclosure statement: The authors declare no potential conflicts of interest.

References

1. Gatchel, J.R. and Zoghbi, H.Y. (2005) Diseases of unstable repeat expansion: mechanisms and common principles. *Nature reviews. Genetics*, **6**, 743-755.
2. Matos, C.A., de Macedo-Ribeiro, S. and Carvalho, A.L. (2011) Polyglutamine diseases: the special case of ataxin-3 and Machado-Joseph disease. *Progress in neurobiology*, **95**, 26-48.
3. Shao, J. and Diamond, M.I. (2007) Polyglutamine diseases: emerging concepts in pathogenesis and therapy. *Human molecular genetics*, **16 Spec No. 2**, R115-123.
4. Xu, Z., Joel Tito, A., Rui, Y.N. and Zhang, S. (2015) Studying polyglutamine diseases in Drosophila. *Experimental neurology*, **274**, 25-41.
5. Teixeira-Castro, A., Jalles, A., Esteves, S., Kang, S., da Silva Santos, L., Silva-Fernandes, A., Neto, M.F., Briellmann, R.M., Bessa, C., Duarte-Silva, S. *et al.* (2015) Serotonergic signalling suppresses ataxin 3 aggregation and neurotoxicity in animal models of Machado-Joseph disease. *Brain : a journal of neurology*, **138**, 3221-3237.
6. Schols, L., Bauer, P., Schmidt, T., Schulte, T. and Riess, O. (2004) Autosomal dominant cerebellar ataxias: clinical features, genetics, and pathogenesis. *The Lancet. Neurology*, **3**, 291-304.
7. Franca, M.C., Jr., D'Abreu, A., Nucci, A. and Lopes-Cendes, I. (2008) Muscle excitability abnormalities in Machado-Joseph disease. *Archives of neurology*, **65**, 525-529.
8. Teixeira-Castro, A., Ailion, M., Jalles, A., Brignull, H.R., Vilaca, J.L., Dias, N., Rodrigues, P., Oliveira, J.F., Neves-Carvalho, A., Morimoto, R.I. *et al.* (2011) Neuron-specific proteotoxicity of mutant ataxin-3 in *C. elegans*: rescue by the DAF-16 and HSF-1 pathways. *Human molecular genetics*, **20**, 2996-3009.
9. Soong, B., Cheng, C., Liu, R. and Shan, D. (1997) Machado-Joseph disease: clinical, molecular, and metabolic characterization in Chinese kindreds. *Annals of neurology*, **41**, 446-452.
10. Wullner, U., Reimold, M., Abele, M., Burk, K., Minnerop, M., Dohmen, B.M., Machulla, H.J., Bares, R. and Klockgether, T. (2005) Dopamine transporter positron emission tomography in spinocerebellar ataxias type 1, 2, 3, and 6. *Archives of neurology*, **62**, 1280-1285.
11. Yen, T.C., Lu, C.S., Tzen, K.Y., Wey, S.P., Chou, Y.H., Weng, Y.H., Kao, P.F. and Ting, G. (2000) Decreased dopamine transporter binding in Machado-Joseph disease. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*, **41**, 994-998.
12. Riess, O., Rub, U., Pastore, A., Bauer, P. and Schols, L. (2008) SCA3: neurological features, pathogenesis and animal models. *Cerebellum*, **7**, 125-137.
13. Rub, U., Brunt, E.R. and Deller, T. (2008) New insights into the pathoanatomy of spinocerebellar ataxia type 3 (Machado-Joseph disease). *Current opinion in neurology*, **21**, 111-116.
14. Kawaguchi, Y., Okamoto, T., Taniwaki, M., Aizawa, M., Inoue, M., Katayama, S., Kawakami, H., Nakamura, S., Nishimura, M., Akiguchi, I. *et al.* (1994) CAG

- expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nature genetics*, **8**, 221-228.
15. Takiyama, Y., Oyanagi, S., Kawashima, S., Sakamoto, H., Saito, K., Yoshida, M., Tsuji, S., Mizuno, Y. and Nishizawa, M. (1994) A clinical and pathologic study of a large Japanese family with Machado-Joseph disease tightly linked to the DNA markers on chromosome 14q. *Neurology*, **44**, 1302-1308.
 16. Maciel, P., Costa, M.C., Ferro, A., Rousseau, M., Santos, C.S., Gaspar, C., Barros, J., Rouleau, G.A., Coutinho, P. and Sequeiros, J. (2001) Improvement in the molecular diagnosis of Machado-Joseph disease. *Archives of neurology*, **58**, 1821-1827.
 17. Cummings, C.J. and Zoghbi, H.Y. (2000) Fourteen and counting: unraveling trinucleotide repeat diseases. *Human molecular genetics*, **9**, 909-916.
 18. Goto, J., Watanabe, M., Ichikawa, Y., Yee, S.B., Ihara, N., Endo, K., Igarashi, S., Takiyama, Y., Gaspar, C., Maciel, P. *et al.* (1997) Machado-Joseph disease gene products carrying different carboxyl termini. *Neuroscience research*, **28**, 373-377.
 19. Li, X., Liu, H., Fischhaber, P.L. and Tang, T.S. (2015) Toward therapeutic targets for SCA3: Insight into the role of Machado-Joseph disease protein ataxin-3 in misfolded proteins clearance. *Progress in neurobiology*, **132**, 34-58.
 20. Stiernagle, T. (2006) Maintenance of *C. elegans*. *WormBook : the online review of C. elegans biology*, 1-11.
 21. Rodrigues, A.J., Neves-Carvalho, A., Teixeira-Castro, A., Rokka, A., Corthals, G., Logarinho, E. and Maciel, P. (2011) Absence of ataxin-3 leads to enhanced stress response in *C. elegans*. *PloS one*, **6**, e18512.
 22. Reina, C.P., Zhong, X. and Pittman, R.N. (2010) Proteotoxic stress increases nuclear localization of ataxin-3. *Human molecular genetics*, **19**, 235-249.
 23. Vaccaro, A., Patten, S.A., Aggad, D., Julien, C., Maios, C., Kabashi, E., Drapeau, P. and Parker, J.A. (2013) Pharmacological reduction of ER stress protects against TDP-43 neuronal toxicity in vivo. *Neurobiology of disease*, **55**, 64-75.
 24. Vaccaro, A., Patten, S.A., Ciura, S., Maios, C., Therrien, M., Drapeau, P., Kabashi, E. and Parker, J.A. (2012) Methylene blue protects against TDP-43 and FUS neuronal toxicity in *C. elegans* and *D. rerio*. *PloS one*, **7**, e42117.
 25. Julien, C., Lissouba, A., Madabattula, S., Fardghassemi, Y., Rosenfelt, C., Androschuk, A., Strautman, J., Wong, C., Bysice, A., O'Sullivan, J. *et al.* (2016) Conserved pharmacological rescue of hereditary spastic paraplegia-related phenotypes across model organisms. *Human molecular genetics*.
 26. Stochmanski, S.J., Therrien, M., Laganriere, J., Rochefort, D., Laurent, S., Karemera, L., Gaudet, R., Vyboh, K., Van Meyel, D.J., Di Cristo, G. *et al.* (2012) Expanded ATXN3 frameshifting events are toxic in *Drosophila* and mammalian neuron models. *Human molecular genetics*, **21**, 2211-2218.
 27. Frokjaer-Jensen, C., Davis, M.W., Sarov, M., Taylor, J., Flibotte, S., LaBella, M., Pozniakovsky, A., Moerman, D.G. and Jorgensen, E.M. (2014) Random and targeted transgene insertion in *Caenorhabditis elegans* using a modified Mos1 transposon. *Nature methods*, **11**, 529-534.
 28. Consortium, C.e.D.M. (2012) large-scale screening for targeted knockouts in the *Caenorhabditis elegans* genome. *G3*, **2**, 1415-1425.
 29. Rodrigues, A.J., Coppola, G., Santos, C., Costa Mdo, C., Ailion, M., Sequeiros, J., Geschwind, D.H. and Maciel, P. (2007) Functional genomics and biochemical

- characterization of the *C. elegans* orthologue of the Machado-Joseph disease protein ataxin-3. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **21**, 1126-1136.
30. Collins, J.J., Huang, C., Hughes, S. and Kornfeld, K. (2008) The measurement and analysis of age-related changes in *Caenorhabditis elegans*. *WormBook : the online review of C. elegans biology*, 1-21.
 31. Herndon, L.A., Schmeissner, P.J., Dudaronek, J.M., Brown, P.A., Listner, K.M., Sakano, Y., Paupard, M.C., Hall, D.H. and Driscoll, M. (2002) Stochastic and genetic factors influence tissue-specific decline in ageing *C. elegans*. *Nature*, **419**, 808-814.
 32. Saxena, S. and Caroni, P. (2011) Selective neuronal vulnerability in neurodegenerative diseases: from stressor thresholds to degeneration. *Neuron*, **71**, 35-48.
 33. Petrash, H.A., Philbrook, A., Haburcak, M., Barbagallo, B. and Francis, M.M. (2013) ACR-12 ionotropic acetylcholine receptor complexes regulate inhibitory motor neuron activity in *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **33**, 5524-5532.
 34. Veriepe, J., Fossouo, L. and Parker, J.A. (2015) Neurodegeneration in *C. elegans* models of ALS requires TIR-1/Sarm1 immune pathway activation in neurons. *Nature communications*, **6**, 7319.
 35. Therrien, M. and Parker, J.A. (2014) Worming forward: amyotrophic lateral sclerosis toxicity mechanisms and genetic interactions in *Caenorhabditis elegans*. *Frontiers in genetics*, **5**, 85.
 36. Urano, F., Calfon, M., Yoneda, T., Yun, C., Kiraly, M., Clark, S.G. and Ron, D. (2002) A survival pathway for *Caenorhabditis elegans* with a blocked unfolded protein response. *The Journal of cell biology*, **158**, 639-646.
 37. Catoire, H., Pasco, M.Y., Abu-Baker, A., Holbert, S., Tourette, C., Brais, B., Rouleau, G.A., Parker, J.A. and Neri, C. (2008) Sirtuin inhibition protects from the polyalanine muscular dystrophy protein PABPN1. *Human molecular genetics*, **17**, 2108-2117.
 38. Wang, J., Farr, G.W., Hall, D.H., Li, F., Furtak, K., Dreier, L. and Horwich, A.L. (2009) An ALS-linked mutant SOD1 produces a locomotor defect associated with aggregation and synaptic dysfunction when expressed in neurons of *Caenorhabditis elegans*. *PLoS genetics*, **5**, e1000350.
 39. McIntire, S.L., Jorgensen, E., Kaplan, J. and Horvitz, H.R. (1993) The GABAergic nervous system of *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, **364**, 337-341.
 40. McIntire, S.L., Reimer, R.J., Schuske, K., Edwards, R.H. and Jorgensen, E.M. (1997) Identification and characterization of the vesicular GABA transporter. *Nature*, **389**, 870-876.
 41. Pinto, S. and De Carvalho, M. (2008) Machado-Joseph disease presenting as motor neuron disease. *Amyotrophic lateral sclerosis : official publication of the World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases*, **9**, 188-191.
 42. Kanai, K. and Kuwabara, S. (2009) Motor nerve hyperexcitability and muscle cramps in Machado-Joseph disease. *Archives of neurology*, **66**, 139; author reply 139-140.
 43. Rub, U., de Vos, R.A., Schultz, C., Brunt, E.R., Paulson, H. and Braak, H. (2002) Spinocerebellar ataxia type 3 (Machado-Joseph disease): severe destruction of the lateral reticular nucleus. *Brain : a journal of neurology*, **125**, 2115-2124.

44. Evers, M.M., Toonen, L.J. and van Roon-Mom, W.M. (2014) Ataxin-3 protein and RNA toxicity in spinocerebellar ataxia type 3: current insights and emerging therapeutic strategies. *Molecular neurobiology*, **49**, 1513-1531.
45. Costa Mdo, C. and Paulson, H.L. (2012) Toward understanding Machado-Joseph disease. *Progress in neurobiology*, **97**, 239-257.
46. Simonetta, S.H. and Golombek, D.A. (2007) An automated tracking system for *Caenorhabditis elegans* locomotor behavior and circadian studies application. *Journal of neuroscience methods*, **161**, 273-280.

Figure legends

Figure 1. Transgenic *C. elegans* ATXN3 model.

(A) Full length wild-type human *ATXN3* containing 14 CAG trinucleotide repeat expansion or (B) full length human *ATXN3* with a polyglutamine expansion (CAG89) were expressed under the control of a *unc-47* promoter. UIM (interaction domains with ubiquitin), CAG14/CAG89 (polyglutamine sequences).

(C) Total protein levels for N2, *atx-3(tm1689)* and transgenic worms expressing ATXN3-CAG14 or mutant ATXN3-CAG89. Antibody detection revealed signals for transgenic and N2 wild-type worms but no corresponding signal was detected in *atx-3(tm1689)* samples. Bands observed at ~42 kDa in size corresponding to full-length ATXN3 were observed in extracts from transgenic ATXN3-CAG14 worms, and a slightly larger band at ~50 kDa in size was observed for ATXN3-CAG89 samples. A band was observed in non-transgenic N2 worms likely representing the endogenous Atx-3 protein. No band was observed in the *atx-3(tm1689)* deletion mutant. The *atx-3(tm1689)* western blots were done independently from the transgenic ATXN3 experiments.

(D) Total protein levels from cells derived from healthy (control; CTL) and MJD (SCA3) patients. Staining showed signals for both healthy and MJD patients, having an estimated molecular weight of 42 kDa and 60 kDa respectively. For all experiments, actin staining was used as a loading control and expression ratios \pm SEM of ATXN3 to actin was determined from 3 independent experiments. Representative western blots are shown.

Figure 2. Lifespan and neuronal phenotypes in ATXN3 transgenics.

(A) ATXN3-CAG89 worms had reduced lifespan compared to wild type ATXN3-CAG14 or N2 worms ($*P < 0.05$ and $****P < 0.0001$ respectively, by log-rank (Mantel-Cox) test) (N=300-360). ATXN3-CAG14 animals showed reduced lifespan compared to N2 wild-type worms ($*P < 0.05$, by log-rank (Mantel-Cox) test) (N=300-360).

(B) CAG89 transgenics had a significantly higher paralysis phenotype compared to wild-type ATXN3-CAG14 transgenics ($****P < 0.0001$, by log-rank (Mantel-Cox) test) (N=270-300).

(C) Synchronised adult day one worms placed on NGM plates and photographed after 10min for their movement tracking. ATXN3-CAG89 mutant worms showed defects in motility when compared to wild type N2 and ATXN3-CAG14 transgenic worms.

(D-G) show representative photos of living, adult expressing wild-type *unc-47p::mCherry*, *unc-47p::mCherry*;ATXN3-CAG14 and *unc-47p::mCherry*; ATXN3-CAG89 transgenic worms at day five of adulthood.

(D) Image of the GABAergic motor neurons from an entire *unc-47p::mCherry* worm. (E) Image of an entire *unc-47p::mCherry*; ATXN3-CAG14 transgenic worm. (F) An *unc-47p::mCherry*; ATXN3-CAG89 transgenic worm, the panel on the right is a magnification of the area indicated. Increased incidences of gaps or breakages were observed in mutant *unc-47p::mCherry*; ATXN3-CAG89 transgenics compared to wild-type *unc-47p::mCherry* and *unc-47p::mCherry*; ATXN3-CAG14 controls.

(G) Quantification of neurodegeneration in transgenic worms at day five of adulthood. ATXN3-CAG89 transgenics showed a significant increase of neurodegeneration compared to *unc-47p::mCherry* and ATXN3-CAG14 controls ($****P < 0.0001$, by Student's *t*-test) (N=100 for each condition).

show representative photos of living, adult expressing *unc-47p::mCherry*;ATXN3-CAG14 and *unc-47p::mCherry*; ATXN3-CAG89 transgenic worms at day five of adulthood.

Figure 3. Methylene blue, salubrinal or guanabenz suppress paralysis during aging and, extend lifespan in ATXN3-CAG89 worms.

(A-C) The motor defect phenotype observed in ATXN3-CAG89 worms was significantly decreased in presence of 60 μ M methylene blue (MB) (**** $P < 0.0001$), 50 μ M salubrinal (Sal)(**** $P < 0.0001$) or 50 μ M guanabenz (Gua) (**** $P < 0.0001$) (by log-rank (Mantel-Cox) test, N=270-300).

(D) ATXN3-CAG89 worms showed an increase lifespan in presence of 60 μ M methylene blue (MB) (**** $P < 0.0001$), 50 μ M salubrinal (Sal) ($*P < 0.05$) or 50 μ M guanabenz (Gua) (**** $P < 0.0001$) (by log-rank (Mantel-Cox) test, N=300-360).

Figure 4. Methylene blue, salubrinal or guanabenz suppress acute paralysis in ATXN3-CAG89 transgenics.

The swimming activity of ATXN3-CAG89 worms was scored for a period of ten hours and treatment with (A) 60 μ M methylene blue (MB) (** $P < 0.01$), (B) 50 μ M salubrinal (Sal) (*** $P < 0.001$) or (C) 50 μ M guanabenz (Gua) (**** $P < 0.0001$) (by Student's *t*-test) significantly rescued the impaired movement phenotype of ATXN3-CAG89 worms.

Figure 5. Rescue of motor neuron degeneration by small molecules in ATXN3-CAG89 transgenics.

Shown are representative photos of living, adult *unc-47p::mCherry*; ATXN3-CAG89 transgenics at day five of adulthood with or without compounds. Images are black and white, photo-reversed to aid visualization of neurons.

(A) Image of degenerating GABAergic motor neurons from an entire ATXN3-CAG89 transgenic. The panel on the right is a magnification of the area indicated by the rectangle.

Rescue of neurodegeneration was observed in ATXN3-CAG89 worms in the presence of (B) 60 μ M methylene blue (MB), (C) 50 μ M salubrinal (Sal) or (D) 50 μ M guanabenz (Gua).

(E) Quantification of neurodegeneration in transgenic ATXN3-CAG89 worms at day five of adulthood. Significant rescue of the neurodegeneration morphology was observed in ATXN3-CAG89 transgenics when treated with 60 μ M methylene blue ($*P < 0.05$), 50 μ M salubrinal ($***P < 0.001$) or 50 μ M guanabenz ($****P < 0.0001$) (by Student's *t*-test, N=100 for each condition).

Figure 6. Reduction of oxidative stress in ATXN3-CAG89 transgenics by methylene blue, guanabenz and salubrinal.

Shown are representative photos of living, adult (A) wild-type N2 worms, as well as (B) wild-type ATXN3-CAG14 and (C) mutant ATXN3-CAG89 transgenics at day two of adulthood in the presence of the oxidative stress marker, 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA). Increased fluorescence is observed in the (C) ATXN3-CAG89 transgenic worms. (D-F) ATXN3-CAG89 transgenics stained with DCF-DA showed decreased fluorescence after treatment with (D) 60 μ M methylene blue (MB), (E) 50 μ M salubrinal (Sal) or (F) 50 μ M guanabenz (Gua).

(G) Quantification of fluorescence in N2 controls, ATXN3-CAG14, or ATXN3-CAG89 transgenics stained with DCF-DA. ATXN3-CAG89 transgenics showed increased fluorescence compared to N2 or ATXN3-CAG14 worms (##### $P < 0.0001$). ATXN3-CAG89 transgenics had less fluorescence when treated with 60 μ M methylene blue, 50 μ M salubrinal or 50 μ M guanabenz in presence of DCF-DA compared to untreated CAG89 controls (**** $P < 0.0001$) (Student's t -tests, N=17-25 for each condition).

Figure 7. Methylene blue, guanabenz and salubrinal rescue the ER stress response in ATXN3-CAG89 transgenic worms.

(A) Shown are representative photos of living, adult *hsp-4::GFP*, *hsp-4::GFP*; ATXN3-CAG14 and *hsp-4::GFP*; ATXN3-CAG89 transgenics at day one of adulthood. *hsp-4::GFP*; ATXN3-CAG89 transgenics show increased GFP expression compared to *hsp-4::GFP*, or *hsp-4::GFP*; ATXN3-CAG14 controls (top panels). Treatment with 60 μ M methylene blue (MB), 50 μ M salubrinal (Sal) or 50 μ M guanabenz (Gua) reduces the fluorescence of *hsp-4::GFP*; ATXN3-CAG89 to control levels.

(B) Quantification of fluorescence of transgenics with or without treatment with compounds. An increased fluorescent signal was observed in *hsp-4::GFP*; ATXN3-CAG89 worms compared to *hsp-4::GFP* transgenic controls ($##P < 0.01$). Fluorescence was decreased in *hsp-4::GFP*; ATXN3-CAG89 transgenics treated with 60 μ M methylene blue, 50 μ M salubrinal or 50 μ M guanabenz ($****P < 0.0001$) (Student's *t*-tests, N=17-25 for each condition).

D. Discussion

Développement de nouvelles souches transgéniques MMJ chez *C. elegans*

Pour réaliser le travail dédié pour cette étude, nous avons commencé par développer nos propres modèles *C. elegans* transgéniques MMJ exprimant le gène *ATXN3* humain en entier. Aucune balise (« tag ») de plus n'a été ajoutée afin de diminuer tout risque accentuant ou atténuant les phénotypes observés dans les souches sauvages et mutantes, un possible effet pouvant être produit par l'inclusion des balises (145,146). Comme la maladie de Machado-Joseph est en partie associée à la dégénérescence des neurones moteurs, *ATXN3* a été introduit dans les 26 neurones GABAergiques du nématode (les motoneurones du modèle) (55,112,114,115). Des modèles transgéniques de neurodégénérescence pour d'autres maladies humaines exprimant le gène d'intérêt dans les neurones GABAergiques ont été générés précédemment dans le laboratoire et, entre autres, des phénotypes intéressants ont été obtenus : défaut de motilité, réduction de la longévité et neurodégénérescence progressive (140). Ces observations nous ont poussés davantage à élaborer des modèles transgéniques pour une autre maladie neurodégénérative comme la MMJ. Ceci dit, deux souches transgéniques, *unc-47p:: ATXN3-CAG14* (sauvage) et *unc-47p:: ATXN3-CAG89* (mutante/pathologique) ont été développées. Les raisons expliquant pourquoi des souches transgéniques avec un tel nombre de répétitions trinuécléotides ont été développées sont les suivantes : (i) chez les individus sains, la répétition de trinuécléotides CAG se situe entre 10 à 51 et en cas de mutation, cette répétition est expandue entre 55 à 87 répétitions pour les individus atteints de la maladie de Machado-Joseph et, (ii) dans une étude effectuée

précédemment, l'expression de la protéine ataxine-3 avec 89 répétitions CAG dans des modèles cellulaires et chez la *Drosophila* démontre des phénotypes significatifs de la neurodégénérescence et mal repliement des protéines (26,85,121).

Défaut de motilité, une réduction de la longévité et une neurodégénérescence chez la souche *C. elegans* mutante

ATXN3-CAG89, la souche mutante, démontre un état pathogénique important lorsqu'elle est comparée avec les souches sauvages (ATXN3-CAG14 et N2) : phénotype de paralysie, réduction de la longévité et une neurodégénérescence progressive. Ces phénotypes sont fort probablement dus au développement de la toxicité et de l'agrégation produite par l'expansion de la protéine ATX3. En effet, tel qu'observé chez les patients avec MMJ, une expansion de la protéine dans le modèle *C. elegans* peut entraîner des perturbations dans l'organisme de ce dernier et par conséquent, si les systèmes responsables d'homéostasie et d'équilibre sont dans l'incapacité à éliminer ces perturbations, c'est alors qu'il y a développement de différentes dysfonctions menant à l'évolution de la maladie.

Pour ce qui est de la dysfonction notée au niveau de la motilité, un phénotype de paralysie progressif est observé: le pourcentage de vers paralysés devient de plus en plus important avec l'âge. Entre autre, le test de paralysie est un des tests permettant la détection des maladies étant reliées avec le vieillissement (147,148). Des études précédentes aussi ont démontré une association entre la MMJ et l'âge : l'état pathogénique produit par la MMJ corrèle avec l'âge (59). Il a été démontré qu'un mécanisme impliqué dans la dysfonction des

motoneurones et le défaut de la motilité est les récepteurs de sérotonine. En effet, il est possible de corriger ces éléments par le contrôle de ces récepteurs. Une étude effectuée sur *C. elegans* a démontré qu'une ablation génétique de MOD-5 (« *modulation of locomotion defective* »); orthologue du transporteur de sérotonine SERT (« *serotonin reuptake transporter* ») a pu restaurer la dysfonction des motoneurones et le phénotype de paralysie causée par l'expansion de la protéine ATX-3, par la modulation de l'activité des récepteurs de sérotonine (22).

Comme ce défaut de paralysie est dû à la production de la toxicité et d'agrégation causée par l'expansion de la protéine ATX-3, d'autres mécanismes possibles seraient les voies de IIS (« *insulin/insulin-like growth factor signaling* ») et HSF-1 (« *heat shock factor 1*»), des voies démontrées comme étant une source possible de détoxification. Dans une étude, ils ont démontré que le vieillissement et la longévité sont deux facteurs grandement affectés par la toxicité neuronale. DAF-16 (orthologue de FOXO (« *forkhead box O subclass* ») et HSF-1 ont démontré une capacité quant à la suppression du développement d'agrégation et de la dysfonction neuronale chez le ver *C. elegans*. En effet, ils ont pu démontrer qu'une absence de ces facteurs accélère la production d'agrégation et des déficits moteurs chez les vers (57). L'absence de DAF-16 entraîne une augmentation d'expression de la protéine mutante et par conséquent, avec l'âge, mène au développement d'une toxicité cellulaire, déficit moteur, neurodégénérescence et une réduction de la longévité (57,149). Par conséquent, DAF-16 et HSF-1 sont deux facteurs nécessaires quant au bon fonctionnement cellulaire : ils empêchent la formation d'agrégation et le développement d'une dysfonction neuronale chez le modèle à l'étude. Ces conclusions ont été aussi observées pour la maladie d'Alzheimer et la SLA

(149,150). Les mécanismes proposés peuvent donc être la cause du défaut de la motilité significative observée dans les souches transgéniques mutantes.

Une réduction de la longévité est observée dans les deux souches transgéniques comparativement aux vers sauvages N2. Cette observation propose qu'une augmentation dans le nombre de répétitions de trinuécléotides perturbe la durée de vie. Une corrélation négative est notée entre le nombre de répétitions de trinuécléotides et la durée de vie : plus le nombre de répétitions est grand, plus la durée de vie des vers est réduite. Cette observation corrèle avec les individus atteints de MMJ. En effet, plus la longueur des répétitions est longue, un plus fort développement de la toxicité et de l'instabilité est observé chez l'organisme et par conséquent, l'apparition des symptômes devient plus précoce, et l'individu atteint un stade critique plus rapidement avec un mort plus précoce. Cette réduction de la durée de vie pourrait être expliquée par l'implication du facteur DAF-16. En effet, une expansion de la protéine ATX-3 entraîne une inhibition de DAF-16 et par conséquent, une toxicité cellulaire et une réduction de la longévité (2,57,149). D'autres phénomènes jouent un rôle crucial sur cette réduction de longévité : développement du stress du RE, augmentation du niveau du stress oxydatif, accumulation des protéines mal conformées, dysfonctions mitochondriales et la mort cellulaire.

Pour la neurodégénérescence causée par la souche transgénique mutante, il s'agit du phénotype le plus redondant observé dans la majorité des recherches, quel que soit le modèle transgénique (voir section IV de l'introduction). En effet, cette neurodégénérescence corrèle avec le déclin graduel des fonctions neuronales dans la maladie de Machado-Joseph (46,117). Leurs résultats et ceux des autres chercheurs proposent que la sévérité de la maladie corrèle

avec le niveau d'expression de la protéine expandue et la taille des répétitions des trinuéotides.

Dans cette étude, dans les modèles transgéniques *C. elegans*, afin d'éviter tout phénomène associé avec létalité, le gène *ATXN3* est exprimé seulement dans les neurones GABAergiques. Ceci n'est pas dénué de sens étant donné que les neurones GABAergiques sont touchés par la maladie de Machado-Joseph et un désordre est observé au niveau de ces neurones en cas de pathologie (112,151,152). Pour l'analyse de la dégénérescence, plusieurs tests sont effectués : test de paralysie en culture solide, test automatisé évaluant le mouvement des vers par minute pendant un laps de temps défini par la machine WMicroTracker et aussi, afin de vérifier que cette paralysie est due à une dégénérescence des motoneurones et non à une autre cause intrinsèque, le test de neurodégénérescence basé sur la fluorescence GFP dans les neurones GABAergiques est effectué. Pour ce dernier test, il est à noter que la possibilité d'une absence de fluorescence attribuée à une lésion axonale peut entre autres relever d'une absence de protéine fluorescente et non d'une cassure de neurone à cet endroit. Ce type de phénomène est considéré comme une limitation de ce test. Comme la maladie de Machado-Joseph est une maladie liée avec l'âge, l'observation d'une neurodégénérescence au niveau des neurones GABAergiques n'est pas surprenante : la production d'une toxicité au niveau cellulaire et neuronale et la formation d'agrégation entraînent avec le vieillissement une dégénérescence des neurones dans différentes parties du système nerveux. Les observations obtenues dans nos souches transgéniques corrént avec celles notées chez les patients avec MMJ (117-125).

Une restauration partielle des fonctions chez la souche mutante *C. elegans* par l'utilisation des composés chimiques neuroprotecteurs

La prochaine étape, suite à l'observation des phénotypes obtenus (défaut de motilité, réduction de longévité, neurodégénérescence), était de déterminer si des composés neuroprotecteurs connus étaient capables d'améliorer ou de supprimer les phénotypes notés. Considérant l'association du gène *ATXN3* avec le stress du RE (1-5) et les recherches précédentes reliant le stress du RE à d'autres maladies neurodégénératives (134,139,140), nous avons décidé d'évaluer si des interventions pharmacologiques centrées sur le stress du RE pouvaient avoir un effet protecteur contre la toxicité causée par la souche transgénique mutante *ATXN3-CAG89*. Pour y pouvoir répondre, trois composés, le Guanabenz (Gua), le Salubrinal (Sal) et le Bleu de Méthylène (BM), ont été sélectionnés pour deux raisons principales : (i) ils possèdent des rôles neuroprotecteurs et (ii) ils sont considérés à être des modulateurs du stress du RE (1,134,139,140).

Ces trois molécules sont tous des composés bien connus dans le milieu de la recherche axée sur les neurosciences et le système nerveux. Par exemple, le Bleu de Méthylène a démontré des propriétés thérapeutiques sur des modèles de maladies de Parkinson et d'Alzheimer (153,154). Il interagit avec l'oxyde nitrique synthase et possède un caractère antioxydant en diminuant la génération des dérivés réactifs de l'oxygène (155). Il s'avère à être un composé neuroprotecteur contre plusieurs formes de neurodégénérescence, dont la forme mutante de la polyglutamine (156). Des recherches sur d'autres maladies neurodégénératives, dont la SLA et la maladie de la paraplégie spastique héréditaire, ont

démontré que ce composé induit spécifiquement l'expression de la chaperone du RE, *hsp-4* (orthologue de GRP78/Bip dans le *C. elegans*), et qu'un traitement avec du BM cause une diminution de l'induction des protéines mutantes (134,139). Ensuite, concernant le composé Sal, son rôle est d'inhiber les phosphatases eIF2 α (« *Eukaryotic translation initiation factor 2A*») dans la voie de UPR et empêche le complexe PP1 (protéine phosphatase 1) de phosphoryler le facteur eIF2 α (157,158). Il a démontré des propriétés thérapeutiques sur des modèles de maladies de l'amyotrophie spinale (159). Ce composé est connu pour sa capacité d'activation des voies de signalisation de réponse au stress normalement activée par le stress oxydatif ou par l'accumulation des protéines mal repliées dans le RE. De plus, encore une fois, des recherches sur d'autres maladies neurodégénératives ont démontré une capacité pour le Sal à diminuer significativement les déficits moteurs et la neurodégénérescence causés par les souches mutantes ainsi qu'une augmentation de l'expression du gène *hsp-4*, chaperone impliquée dans la réponse au stress du RE, lorsque traitées avec le Salubrinal (134,139). Enfin, pour ce qui est du Guanabenz, ce composé est un récepteur agoniste α_2 adrénergique se liant sélectivement à GADD34, menant sa dissociation avec le complexe PP1 (160). De plus, ce composé protège le système des protéines mal repliées en interférant avec la déphosphorylation de eIF2 α (161). Tout comme le Salubrinal, des propriétés thérapeutiques sur des modèles de maladies de l'amyotrophie spinale ont été suggérées pour le Guanabenz (159).

Le traitement de la souche mutante transgénique ATXN3-CAG89 avec ces composés neuroprotecteurs résulte en une restauration du défaut de la motilité, une augmentation de longévité et une diminution significative de la neurodégénérescence. Ces composés sont

considérés comme étant des supresseurs efficaces de la protéotoxicité causée par l'expansion des répétitions de trinuécléotides. Afin de confirmer l'activité neuroprotective de ces molécules, plusieurs tests sont effectués : test de paralysie en culture solide, test automatisé évaluant le mouvement des vers par la machine WMicroTracker et test de neurodégénérescence. Pour ce qui est du test automatisé avec la machine, contrairement au test de paralysie dépendant de l'âge, il s'agit d'un test ne faisant que mesurer le mouvement des vers pour quelques heures. Les deux tests (paralysie et mouvement) concluent des résultats semblables : les vers mutants traités avec les composés possèdent une restauration remarquable de la motilité comparativement aux vers non traités démontrant un défaut de motilité caractéristique de l'état pathogénique. Ces résultats suggèrent que ces molécules considérées comme étant des modulateurs de la réponse au stress du RE ont aussi la capacité à atténuer la dysfonction neuronale et la toxicité causée par l'expansion de la protéine. Des résultats similaires sont observés dans d'autres maladies neurodégénératives, dont la SLA et la paraplégie spastique héréditaire, quant à la restauration du dysfonction des motoneurones par l'utilisation de ces composés (134,139,140). Ces trois composés diminuent la toxicité cellulaire et neuronale, l'agrégation protéique, l'accumulation des protéines mal repliées, la neurodégénérescence et, augmente la longévité.

Prévention du stress oxydatif et du stress du RE causés par l'expansion des répétitions de trinuécléotides à partir des molécules modulatrices du RE

La génération des espèces réactives d'oxygène et des espèces nitrogènes est connue pour être impliquée dans l'apparition et la progression de plusieurs maladies, dont les maladies

neurodégénératives (162). Dans cette étude, la dichlorofluorescéine diacétate (DCFH-DA), une sonde sensible utilisée pour détecter le peroxyde intracellulaire et le stress oxydatif a été utilisée. Il s'agit d'une sonde à perméabilité cellulaire qui est hydrolysée en un anion carboxylate DCFH étant retenu dans les cellules. L'oxydation de deux électrons du DCFH conduit à la formation du produit fluorescent, DCF, détectable par des techniques à base de fluorescence (162,163). Ainsi, afin de détecter la présence possible du stress oxydatif produit par l'expansion de la protéine ATX-3, ce colorant fluorescent est utilisé. Une augmentation importante du stress oxydatif au niveau de la souche mutante ATXN3-CAG89 comparativement aux souches sauvages N2 et ATXN3-CAG14 est observée; ceci suggère qu'une expansion de la protéine ATX-3 génère du stress oxydatif dans le modèle à l'étude. D'après les recherches précédentes, les composés BM, Sal et Gua ont la capacité de diminuer le stress du RE et le stress oxydatif (134,139). En effet, le traitement avec ces composés a diminué drastiquement le stress oxydatif, détecté par une baisse significative de la fluorescence causée par le colorant DCF-DA, au niveau de la souche transgénique mutante. Le développement du stress oxydatif au niveau de la souche transgénique mutante renforce l'idée de l'implication de DAF-16 dans la voie IIS. Un autre mécanisme possible à être la cause de ce stress oxydatif serait le stress du RE produite en cas de la toxicité neuronale causée par la souche transgénique mutante ATXN3.

La forme mutante de ATXN3 est reconnue pour ses propriétés d'agrégation et une augmentation des protéines non/mal repliées entraînant ainsi une augmentation de l'instabilité et de la toxicité, mais aussi, de la production du stress au niveau du RE. Nous avons croisé les souches transgéniques mutante et sauvage avec la souche transgénique rapporteur *hsp-4::GFP*. Le gène *hsp-4* encode Hsp70/BiP une protéine protectrice introduite par le stress du

RE pouvant être surveillée avec une souche transgénique rapporteur *hsp-4*::GFP (164). Les résultats obtenus démontrent que les trois composés fonctionnent à travers la voie de signalisation de la chaperonne du RE, *hsp-4*. Le traitement des vers *hsp-4*::GFP avec le BM et le Sal démontrent une induction significative du signal GFP témoignant de l'augmentation de l'expression de cette chaperonne étant impliquée dans la réponse au stress du RE. Pour ce qui est du Gua, on remarque aussi une induction du signal GFP, mais moins importante que les deux autres composés.

Les trois composés possèdent la capacité de diminuer remarquablement le stress du RE dans les deux souches transgéniques et limite l'effet néfaste et la toxicité produite par l'expansion du gène *ATXN3*. Contrairement aux attentes, une diminution du stress du RE au niveau de la souche transgénique sauvage (*ATXN3-CAG14*) est aussi observée. Cette diminution est considérée moins importante que dans la souche mutante, mais tout de même significative. Ceci peut être due à l'insertion d'un nombre de répétitions de trinuécléotides. En effet, même si l'insertion de 14 répétitions de CAG est considérée comme étant non-pathologique, elle produit un effet d'instabilité dans le système et donc, mène au développement d'un stress au niveau du RE. Il est à noter que ces composés possèdent un rôle préventif et non correctif : ces composés ne font que prévenir le stress du RE pour une courte durée; à long terme, l'effet préventif de ces composés est éliminé et si, ils n'ont pas réussi à éliminer le stress, d'autres voies comme celles de la mort cellulaire seront alors activées afin de mener l'homéostasie dans le système.

Le lien entre cette étude et des expériences futures

Comme mentionné précédemment (Introduction, section *IV.2 Autres organismes modèles associés avec ATXN3 et MMJ*), plusieurs recherches sont effectuées sur la MMJ et le gène causatif, *ATXN3*, dans différents organismes modèles dont la souris, le rat et la *Drosophile*. D'après les résultats prometteurs obtenus pour cette étude, il serait intéressant et pertinent d'aller plus loin dans les recherches. En effet, il serait possible à tester les composés chimiques utilisés pour cette étude, le Bleu de Méthylène, le Guanabenz et le Salubrinal, dans des modèles de *Drosophile*, les poissons zèbres et les souris.

Ces composés chimiques ont déjà été testés sur d'autres maladies neurodégénératives, dont la SLA et la maladie neurologique héréditaire de la paraplégie spastique (134,139,140,149).

Dans une étude effectuée sur la SLA, suite à l'obtention des résultats prometteurs chez le modèle *C. elegans*, les chercheurs ont démontré une réduction du défaut de la motilité, ainsi qu'une diminution de la dysfonction neuronale dans les poissons zèbres par l'utilisation des composées Guanabenz et Salubrinal (134).

Pour ce qui est de la maladie neurologique héréditaire de la paraplégie spastique, une expansion des recherches a été effectuée suite aux conclusions tirées encore une fois des expériences effectuées sur le ver. Les chercheurs ont eu recours à deux autres organismes modèles : *Drosophile* et poissons zèbres. Leurs expériences sur la *Drosophile* les ont permis à démontrer une correction du défaut de la motilité et une prévention du stress oxydative par l'utilisation du Bleu de Méthylène. Concernant leurs expériences sur les poissons zèbres, ils ont pu conclure une restauration partielle du défaut de la morphologie ainsi qu'une réduction

des défauts notés au niveau des microtubules chez la souche mutante par l'utilisation des trois composés optées pour cette même étude (139).

Ces recherches nous poussent davantage à tester nos composés sur d'autres modèles. Il serait d'une grande pertinence à étudier les mêmes procédures sur les poissons zèbres et les souris. Comme expériences, sur ces organismes modèles, il serait possible d'étudier la motilité, la morphologie neuronale et aussi, le niveau du stress du RE et le stress oxydatif causé par une expansion des répétitions trinuéotides dans le gène *ATXN3*. Si les résultats restent prometteurs dans tous ces organismes modèles, l'étape suivante serait les essais cliniques. En effet, les composés chimiques étant positifs sur les trois modèles seront ensuite testés en clinique sur des patients MMJ. La découverte de ces composés chimiques ne permet pas de guérir les individus atteints de cette maladie, mais définitivement à améliorer grandement leur niveau et qualité de vie.

E. Conclusion

Les mécanismes de toxicité causée par la protéine ATX-3 demandent une investigation plus approfondie et plus développée étant donné que des questions persistent encore quant aux voies exactes entreprises par cette protéine en état pathologique.

Les résultats présentés dans ce travail de maîtrise démontrent le développement d'une toxicité neuronale et cellulaire causée par l'expansion de la protéine ATX-3. Cette toxicité entraîne un ensemble de désordres importants dans le système du ver *C. elegans*: phénotype de paralysie, réduction de la longévité, neurodégénérescence, stress oxydatif et stress du RE.

En effet, les résultats de cette étude démontrent que le stress protéotoxique produit par l'expansion de la protéine ATX-3 entraîne une activation de voie de réponse au stress du RE. Cette proposition est affirmée par l'induction de l'expression de la chaperonne du RE HSP-4. Par conséquent, un stress du RE soutenu provoque une hausse quant à la production d'espèces réactives à l'oxygène. Cette affirmation est constatée chez la souche transgénique mutante par l'utilisation de diacétate de 2',7'-dichlorofluorescéine (DCF-DA; permet la détection des réactives de l'oxygène (ROS) en émettant des sondes mesurables en fluorescence). En effet, en présence de ce dernier, il y a une augmentation importante de la fluorescence, témoignant la présence de dommages oxydatifs.

Cette expansion de répétitions de trinuécléotides, dans la partie poly-Q du gène *ATXN3*, entraîne au cours du vieillissement, des effets néfastes sur l'organisme tels qu'un phénotype de paralysie, une réduction de la longévité et une neurodégénérescence accrue. Ces effets sont

aussi notés chez les patients avec MMJ ; les résultats observés dans le ver *C. elegans* corrélient avec ceux des patients avec MMJ.

Afin d'identifier un rôle neuroprotecteur et d'évaluer si des molécules considérées en tant que des modulateurs du stress du RE possède un effet bénéfique sur les désordres produits par l'état pathogénique de la protéine ATX-3, trois composés connus ont été sélectionnés : le Bleu de Méthylène, le Salubrinal et le Guanabenz. Ces trois composés s'avèrent comme étant des supprimeurs potentiels de toxicité associée à la protéine ATX-3. En effet, ils ont démontré des rôles neuroprotecteur et modulateur du stress du RE en restaurant le défaut de la motilité causée par une dysfonction des motoneurones, en diminuant remarquablement la neurodégénérescence chez la souche mutante, en augmentant la longévité et enfin, en prévenant les dommages oxydatifs et le stress du RE dans la souche avec une expansion de la protéine ATX-3. Comme prochaines étapes, il faudrait évaluer l'implication du facteur DAF-16 et les trois principaux médiateurs (ATF6/ATF-6, IRE1/IRE-1, PERK/PEK-1) de la signalisation UPR pour MMJ. Aussi, définir le rôle de Bleu de Méthylène, Salubrinal et Guanabenz dans la réponse au stress UPR^{ER} et déterminer leur interaction avec les médiateurs de la signalisation UPR dans le contexte de la maladie de Machado-Joseph. Enfin, il serait aussi intéressant à élargir les recherches en testant des composés approuvés par FDA (« *Food and Drug Administration* ») et ensuite, les caractériser pour cette pathologie.

À partir de ces résultats, plusieurs stratégies peuvent être mises en place pour diminuer cette toxicité neuronale et cellulaire causée par l'expansion des répétitions de trinuécléotides dans la partie poly-Q du gène *ATXN3*. En effet, une stratégie possible serait à inhiber la voie de la

dégradation de protéines associées avec le RE (ERAD) résultant une diminution de l'activation des voies UPR^{ER} et par conséquent, une protection contre la toxicité produite par le stress du RE (165-167) . Cette approche permettrait une réduction d'agrégation et de la toxicité des protéines poly-Q, ainsi qu'au développement d'un effet d'homéostasie dans l'organisme.

Une autre stratégie possible serait de faciliter la déplétion des agrégats autophagiques. En effet, la voie de l'autophagie est considérée comme étant une voie importante quant à l'élimination des agrégations protéiques associées avec les maladies neurodégénératives (38). Une activation pharmacologique de cette voie (par exemple, par l'utilisation de rapamycine (inhibiteur de mTOR)), permettrait une suppression des accumulations des protéines poly-Q et une protection contre la toxicité produite par le stress du RE rétablissant ainsi l'homéostasie dans l'organisme (166,168-170). Ces approches ont déjà été utilisées dans différents modèles (*Drosophile*, souris, cellules) pour d'autres maladies neurodégénératives, dont les maladies de Huntington et Alzheimer (91,166-170).

Bibliographie

1. Matos, C.A., de Macedo-Ribeiro, S. and Carvalho, A.L. (2011) Polyglutamine diseases: the special case of ataxin-3 and Machado-Joseph disease. *Progress in neurobiology*, **95**, 26-48.
2. Rodrigues, A.J., Neves-Carvalho, A., Teixeira-Castro, A., Rokka, A., Corthals, G., Logarinho, E. and Maciel, P. (2011) Absence of ataxin-3 leads to enhanced stress response in *C. elegans*. *PLoS one*, **6**, e18512.
3. Reina, C.P., Zhong, X. and Pittman, R.N. (2010) Proteotoxic stress increases nuclear localization of ataxin-3. *Human molecular genetics*, **19**, 235-249.
4. Evers, M.M., Toonen, L.J. and van Roon-Mom, W.M. (2014) Ataxin-3 protein and RNA toxicity in spinocerebellar ataxia type 3: current insights and emerging therapeutic strategies. *Molecular neurobiology*, **49**, 1513-1531.
5. Costa Mdo, C. and Paulson, H.L. (2012) Toward understanding Machado-Joseph disease. *Progress in neurobiology*, **97**, 239-257.
6. Kuhlbrodt, K., Janiesch, P.C., Kevei, E., Segref, A., Barikbin, R. and Hoppe, T. (2011) The Machado-Joseph disease deubiquitylase ATX-3 couples longevity and proteostasis. *Nature cell biology*, **13**, 273-281.
7. Hubener, J., Vauti, F., Funke, C., Wolburg, H., Ye, Y., Schmidt, T., Wolburg-Buchholz, K., Schmitt, I., Gardyan, A., Driessen, S. *et al.* (2011) N-terminal ataxin-3 causes neurological symptoms with inclusions, endoplasmic reticulum stress and ribosomal dislocation. *Brain : a journal of neurology*, **134**, 1925-1942.
8. Wang, Q., Li, L. and Ye, Y. (2006) Regulation of retrotranslocation by p97-associated deubiquitinating enzyme ataxin-3. *The Journal of cell biology*, **174**, 963-971.
9. Verkerk, A.J., Pieretti, M., Sutcliffe, J.S., Fu, Y.H., Kuhl, D.P., Pizzuti, A., Reiner, O., Richards, S., Victoria, M.F., Zhang, F.P. *et al.* (1991) Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell*, **65**, 905-914.
10. Yu, S., Pritchard, M., Kremer, E., Lynch, M., Nancarrow, J., Baker, E., Holman, K., Mulley, J.C., Warren, S.T., Schlessinger, D. *et al.* (1991) Fragile X genotype characterized by an unstable region of DNA. *Science*, **252**, 1179-1181.
11. La Spada, A.R. and Taylor, J.P. (2010) Repeat expansion disease: progress and puzzles in disease pathogenesis. *Nature reviews. Genetics*, **11**, 247-258.
12. Usdin, K., House, N.C. and Freudenreich, C.H. (2015) Repeat instability during DNA repair: Insights from model systems. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, **50**, 142-167.
13. McMurray, C.T. (2010) Mechanisms of trinucleotide repeat instability during human development. *Nature reviews. Genetics*, **11**, 786-799.
14. Budworth, H. and McMurray, C.T. (2013) A brief history of triplet repeat diseases. *Methods in molecular biology*, **1010**, 3-17.
15. Gatchel, J.R. and Zoghbi, H.Y. (2005) Diseases of unstable repeat expansion: mechanisms and common principles. *Nature reviews. Genetics*, **6**, 743-755.

16. Shao, J. and Diamond, M.I. (2007) Polyglutamine diseases: emerging concepts in pathogenesis and therapy. *Human molecular genetics*, **16 Spec No. 2**, R115-123.
17. Xu, Z., Joel Tito, A., Rui, Y.N. and Zhang, S. (2015) Studying polyglutamine diseases in *Drosophila*. *Experimental neurology*, **274**, 25-41.
18. Fan, H.C., Ho, L.I., Chi, C.S., Chen, S.J., Peng, G.S., Chan, T.M., Lin, S.Z. and Harn, H.J. (2014) Polyglutamine (PolyQ) diseases: genetics to treatments. *Cell transplantation*, **23**, 441-458.
19. Bennett, E.J., Shaler, T.A., Woodman, B., Ryu, K.Y., Zaitseva, T.S., Becker, C.H., Bates, G.P., Schulman, H. and Kopito, R.R. (2007) Global changes to the ubiquitin system in Huntington's disease. *Nature*, **448**, 704-708.
20. Chafekar, S.M. and Duennwald, M.L. (2012) Impaired heat shock response in cells expressing full-length polyglutamine-expanded huntingtin. *PloS one*, **7**, e37929.
21. Solans, A., Zambrano, A., Rodriguez, M. and Barrientos, A. (2006) Cytotoxicity of a mutant huntingtin fragment in yeast involves early alterations in mitochondrial OXPHOS complexes II and III. *Human molecular genetics*, **15**, 3063-3081.
22. Teixeira-Castro, A., Jalles, A., Esteves, S., Kang, S., da Silva Santos, L., Silva-Fernandes, A., Neto, M.F., Briellmann, R.M., Bessa, C., Duarte-Silva, S. *et al.* (2015) Serotonergic signalling suppresses ataxin 3 aggregation and neurotoxicity in animal models of Machado-Joseph disease. *Brain : a journal of neurology*, **138**, 3221-3237.
23. Zoghbi, H.Y. and Orr, H.T. (1999) Polyglutamine diseases: protein cleavage and aggregation. *Current opinion in neurobiology*, **9**, 566-570.
24. La Spada, A.R., Paulson, H.L. and Fischbeck, K.H. (1994) Trinucleotide repeat expansion in neurological disease. *Annals of neurology*, **36**, 814-822.
25. Rolim, L., Leite, A., Ledo, S., Paneque, M., Sequeiros, J. and Fleming, M. (2006) Psychological aspects of pre-symptomatic testing for Machado-Joseph disease and familial amyloid polyneuropathy type I. *Clinical genetics*, **69**, 297-305.
26. Maciel, P., Costa, M.C., Ferro, A., Rousseau, M., Santos, C.S., Gaspar, C., Barros, J., Rouleau, G.A., Coutinho, P. and Sequeiros, J. (2001) Improvement in the molecular diagnosis of Machado-Joseph disease. *Archives of neurology*, **58**, 1821-1827.
27. Oda, M., Maruyama, H., Komure, O., Morino, H., Terasawa, H., Izumi, Y., Imamura, T., Yasuda, M., Ichikawa, K., Ogawa, M. *et al.* (2004) Possible reduced penetrance of expansion of 44 to 47 CAG/CAA repeats in the TATA-binding protein gene in spinocerebellar ataxia type 17. *Archives of neurology*, **61**, 209-212.
28. Bauer, P.O. and Nukina, N. (2009) The pathogenic mechanisms of polyglutamine diseases and current therapeutic strategies. *Journal of neurochemistry*, **110**, 1737-1765.
29. Schols, L., Bauer, P., Schmidt, T., Schulte, T. and Riess, O. (2004) Autosomal dominant cerebellar ataxias: clinical features, genetics, and pathogenesis. *The Lancet. Neurology*, **3**, 291-304.
30. Slattery, J.P., Murphy, W.J. and O'Brien, S.J. (2000) Patterns of diversity among SINE elements isolated from three Y-chromosome genes in carnivores. *Molecular biology and evolution*, **17**, 825-829.
31. Kovtun, I.V. and McMurray, C.T. (2008) Features of trinucleotide repeat instability in vivo. *Cell research*, **18**, 198-213.
32. Mirkin, S.M. (2007) Expandable DNA repeats and human disease. *Nature*, **447**, 932-940.

33. Maciel, P., Gaspar, C., DeStefano, A.L., Silveira, I., Coutinho, P., Radvany, J., Dawson, D.M., Sudarsky, L., Guimaraes, J., Loureiro, J.E. *et al.* (1995) Correlation between CAG repeat length and clinical features in Machado-Joseph disease. *American journal of human genetics*, **57**, 54-61.
34. Zoghbi, H.Y. and Orr, H.T. (2000) Glutamine repeats and neurodegeneration. *Annual review of neuroscience*, **23**, 217-247.
35. Arrasate, M., Mitra, S., Schweitzer, E.S., Segal, M.R. and Finkbeiner, S. (2004) Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death. *Nature*, **431**, 805-810.
36. Ross, C.A. and Poirier, M.A. (2004) Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nature medicine*, **10 Suppl**, S10-17.
37. Slow, E.J., Graham, R.K., Osmund, A.P., Devon, R.S., Lu, G., Deng, Y., Pearson, J., Vaid, K., Bissada, N., Wetzel, R. *et al.* (2005) Absence of behavioral abnormalities and neurodegeneration in vivo despite widespread neuronal huntingtin inclusions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 11402-11407.
38. Weber, J.J., Sowa, A.S., Binder, T. and Hubener, J. (2014) From pathways to targets: understanding the mechanisms behind polyglutamine disease. *BioMed research international*, **2014**, 701758.
39. Li, L.B., Yu, Z., Teng, X. and Bonini, N.M. (2008) RNA toxicity is a component of ataxin-3 degeneration in *Drosophila*. *Nature*, **453**, 1107-1111.
40. Ogawa, M. (2004) Pharmacological treatments of cerebellar ataxia. *Cerebellum*, **3**, 107-111.
41. Correia, M., Coutinho, P., Silva, M.C., Guimaraes, J., Amado, J. and Matos, E. (1995) Evaluation of the effect of sulphametoxazole and trimethoprim in patients with Machado-Joseph disease. *Revista de neurologia*, **23**, 632-634.
42. Tuite, P.J., Rogaeva, E.A., St George-Hyslop, P.H. and Lang, A.E. (1995) Dopa-responsive parkinsonism phenotype of Machado-Joseph disease: confirmation of 14q CAG expansion. *Annals of neurology*, **38**, 684-687.
43. Buhmann, C., Bussopulos, A. and Oechsner, M. (2003) Dopaminergic response in Parkinsonian phenotype of Machado-Joseph disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, **18**, 219-221.
44. Wilder-Smith, E., Tan, E.K., Law, H.Y., Zhao, Y., Ng, I. and Wong, M.C. (2003) Spinocerebellar ataxia type 3 presenting as an L-DOPA responsive dystonia phenotype in a Chinese family. *Journal of the neurological sciences*, **213**, 25-28.
45. Kanai, K., Kuwabara, S., Arai, K., Sung, J.Y., Ogawara, K. and Hattori, T. (2003) Muscle cramp in Machado-Joseph disease: altered motor axonal excitability properties and mexiletine treatment. *Brain : a journal of neurology*, **126**, 965-973.
46. Boy, J., Schmidt, T., Wolburg, H., Mack, A., Nuber, S., Bottcher, M., Schmitt, I., Holzmann, C., Zimmermann, F., Servadio, A. *et al.* (2009) Reversibility of symptoms in a conditional mouse model of spinocerebellar ataxia type 3. *Human molecular genetics*, **18**, 4282-4295.
47. Bonini, N.M. and La Spada, A.R. (2005) Silencing polyglutamine degeneration with RNAi. *Neuron*, **48**, 715-718.
48. Alves, S., Nascimento-Ferreira, I., Auregan, G., Hassig, R., Dufour, N., Brouillet, E., Pedroso de Lima, M.C., Hantraye, P., Pereira de Almeida, L. and Deglon, N. (2008)

- Allele-specific RNA silencing of mutant ataxin-3 mediates neuroprotection in a rat model of Machado-Joseph disease. *PloS one*, **3**, e3341.
49. Miller, V.M., Xia, H., Marrs, G.L., Gouvion, C.M., Lee, G., Davidson, B.L. and Paulson, H.L. (2003) Allele-specific silencing of dominant disease genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**, 7195-7200.
 50. Alves, S., Nascimento-Ferreira, I., Dufour, N., Hassig, R., Auregan, G., Nobrega, C., Brouillet, E., Hantraye, P., Pedroso de Lima, M.C., Deglon, N. *et al.* (2010) Silencing ataxin-3 mitigates degeneration in a rat model of Machado-Joseph disease: no role for wild-type ataxin-3? *Human molecular genetics*, **19**, 2380-2394.
 51. Riess, O., Rub, U., Pastore, A., Bauer, P. and Schols, L. (2008) SCA3: neurological features, pathogenesis and animal models. *Cerebellum*, **7**, 125-137.
 52. Ranum, G. (1995) Finding support for AIDS-related vision problems. *GMHC treatment issues : the Gay Men's Health Crisis newsletter of experimental AIDS therapies*, **9**, 8-9.
 53. Bettencourt, C. and Lima, M. (2011) Machado-Joseph Disease: from first descriptions to new perspectives. *Orphanet journal of rare diseases*, **6**, 35.
 54. Nakano, K.K., Dawson, D.M. and Spence, A. (1972) Machado disease. A hereditary ataxia in Portuguese emigrants to Massachusetts. *Neurology*, **22**, 49-55.
 55. Franca, M.C., Jr., D'Abreu, A., Nucci, A. and Lopes-Cendes, I. (2008) Muscle excitability abnormalities in Machado-Joseph disease. *Archives of neurology*, **65**, 525-529.
 56. Kawaguchi, Y., Okamoto, T., Taniwaki, M., Aizawa, M., Inoue, M., Katayama, S., Kawakami, H., Nakamura, S., Nishimura, M., Akiguchi, I. *et al.* (1994) CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nature genetics*, **8**, 221-228.
 57. Teixeira-Castro, A., Ailion, M., Jalles, A., Brignull, H.R., Vilaca, J.L., Dias, N., Rodrigues, P., Oliveira, J.F., Neves-Carvalho, A., Morimoto, R.I. *et al.* (2011) Neuron-specific proteotoxicity of mutant ataxin-3 in *C. elegans*: rescue by the DAF-16 and HSF-1 pathways. *Human molecular genetics*, **20**, 2996-3009.
 58. Carvalho, D.R., La Rocque-Ferreira, A., Rizzo, I.M., Imamura, E.U. and Speck-Martins, C.E. (2008) Homozygosity enhances severity in spinocerebellar ataxia type 3. *Pediatric neurology*, **38**, 296-299.
 59. Klockgether, T., Schols, L., Abele, M., Burk, K., Topka, H., Andres, F., Amoiridis, G., Ludtke, R., Riess, O., Laccone, F. *et al.* (1999) Age related axonal neuropathy in spinocerebellar ataxia type 3/Machado-Joseph disease (SCA3/MJD). *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, **66**, 222-224.
 60. van de Warrenburg, B.P., Notermans, N.C., Schelhaas, H.J., van Alfen, N., Sinke, R.J., Knoers, N.V., Zwarts, M.J. and Kremer, B.P. (2004) Peripheral nerve involvement in spinocerebellar ataxias. *Archives of neurology*, **61**, 257-261.
 61. Kinoshita, A., Hayashi, M., Oda, M. and Tanabe, H. (1995) Clinicopathological study of the peripheral nervous system in Machado-Joseph disease. *Journal of the neurological sciences*, **130**, 48-58.
 62. Iwabuchi, K., Tsuchiya, K., Uchihara, T. and Yagishita, S. (1999) Autosomal dominant spinocerebellar degenerations. Clinical, pathological, and genetic correlations. *Revue neurologique*, **155**, 255-270.

63. Rub, U., Brunt, E.R. and Deller, T. (2008) New insights into the pathoanatomy of spinocerebellar ataxia type 3 (Machado-Joseph disease). *Current opinion in neurology*, **21**, 111-116.
64. Yamada, M., Sato, T., Tsuji, S. and Takahashi, H. (2008) CAG repeat disorder models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta neuropathologica*, **115**, 71-86.
65. Horimoto, Y., Matsumoto, M., Akatsu, H., Kojima, A., Yoshida, M., Nokura, K., Yuasa, H., Katada, E., Yamamoto, T., Kosaka, K. *et al.* (2011) Longitudinal study on MRI intensity changes of Machado-Joseph disease: correlation between MRI findings and neuropathological changes. *Journal of neurology*, **258**, 1657-1664.
66. Rub, U., de Vos, R.A., Schultz, C., Brunt, E.R., Paulson, H. and Braak, H. (2002) Spinocerebellar ataxia type 3 (Machado-Joseph disease): severe destruction of the lateral reticular nucleus. *Brain : a journal of neurology*, **125**, 2115-2124.
67. Yamada, M., Tan, C.F., Inenaga, C., Tsuji, S. and Takahashi, H. (2004) Sharing of polyglutamine localization by the neuronal nucleus and cytoplasm in CAG-repeat diseases. *Neuropathology and applied neurobiology*, **30**, 665-675.
68. de Oliveira, M.S., D'Abreu, A., Franca, M.C., Jr., Lopes-Cendes, I., Cendes, F. and Castellano, G. (2012) MRI-texture analysis of corpus callosum, thalamus, putamen, and caudate in Machado-Joseph disease. *Journal of neuroimaging : official journal of the American Society of Neuroimaging*, **22**, 46-52.
69. Murata, Y., Yamaguchi, S., Kawakami, H., Imon, Y., Maruyama, H., Sakai, T., Kazuta, T., Ohtake, T., Nishimura, M., Saida, T. *et al.* (1998) Characteristic magnetic resonance imaging findings in Machado-Joseph disease. *Archives of neurology*, **55**, 33-37.
70. Bettencourt, C., Santos, C., Kay, T., Vasconcelos, J. and Lima, M. (2008) Analysis of segregation patterns in Machado-Joseph disease pedigrees. *Journal of human genetics*, **53**, 920-923.
71. Takiyama, Y., Nishizawa, M., Tanaka, H., Kawashima, S., Sakamoto, H., Karube, Y., Shimazaki, H., Soutome, M., Endo, K., Ohta, S. *et al.* (1993) The gene for Machado-Joseph disease maps to human chromosome 14q. *Nature genetics*, **4**, 300-304.
72. Haacke, A., Broadley, S.A., Boteva, R., Tzvetkov, N., Hartl, F.U. and Breuer, P. (2006) Proteolytic cleavage of polyglutamine-expanded ataxin-3 is critical for aggregation and sequestration of non-expanded ataxin-3. *Human molecular genetics*, **15**, 555-568.
73. Ichikawa, Y., Goto, J., Hattori, M., Toyoda, A., Ishii, K., Jeong, S.Y., Hashida, H., Masuda, N., Ogata, K., Kasai, F. *et al.* (2001) The genomic structure and expression of MJD, the Machado-Joseph disease gene. *Journal of human genetics*, **46**, 413-422.
74. Takiyama, Y., Sakoe, K., Nakano, I. and Nishizawa, M. (1997) Machado-Joseph disease: cerebellar ataxia and autonomic dysfunction in a patient with the shortest known expanded allele (56 CAG repeat units) of the MJD1 gene. *Neurology*, **49**, 604-606.
75. van Alfen, N., Sinke, R.J., Zwarts, M.J., Gabreels-Festen, A., Praamstra, P., Kremer, B.P. and Horstink, M.W. (2001) Intermediate CAG repeat lengths (53,54) for MJD/SCA3 are associated with an abnormal phenotype. *Annals of neurology*, **49**, 805-807.

76. Gu, W., Ma, H., Wang, K., Jin, M., Zhou, Y., Liu, X., Wang, G. and Shen, Y. (2004) The shortest expanded allele of the MJD1 gene in a Chinese MJD kindred with autonomic dysfunction. *European neurology*, **52**, 107-111.
77. Padiath, Q.S., Srivastava, A.K., Roy, S., Jain, S. and Brahmachari, S.K. (2005) Identification of a novel 45 repeat unstable allele associated with a disease phenotype at the MJD1/SCA3 locus. *American journal of medical genetics. Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics*, **133B**, 124-126.
78. Bettencourt, C., Santos, C., Montiel, R., Costa Mdo, C., Cruz-Morales, P., Santos, L.R., Simoes, N., Kay, T., Vasconcelos, J., Maciel, P. *et al.* (2010) Increased transcript diversity: novel splicing variants of Machado-Joseph disease gene (ATXN3). *Neurogenetics*, **11**, 193-202.
79. Goto, J., Watanabe, M., Ichikawa, Y., Yee, S.B., Ihara, N., Endo, K., Igarashi, S., Takiyama, Y., Gaspar, C., Maciel, P. *et al.* (1997) Machado-Joseph disease gene products carrying different carboxyl termini. *Neuroscience research*, **28**, 373-377.
80. Paulson, H.L., Das, S.S., Crino, P.B., Perez, M.K., Patel, S.C., Gotsdiner, D., Fischbeck, K.H. and Pittman, R.N. (1997) Machado-Joseph disease gene product is a cytoplasmic protein widely expressed in brain. *Annals of neurology*, **41**, 453-462.
81. Mao, Y., Senic-Matuglia, F., Di Fiore, P.P., Polo, S., Hodsdon, M.E. and De Camilli, P. (2005) Deubiquitinating function of ataxin-3: insights from the solution structure of the Josephin domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 12700-12705.
82. Nicastro, G., Menon, R.P., Masino, L., Knowles, P.P., McDonald, N.Q. and Pastore, A. (2005) The solution structure of the Josephin domain of ataxin-3: structural determinants for molecular recognition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 10493-10498.
83. Nicastro, G., Masino, L., Esposito, V., Menon, R.P., De Simone, A., Fraternali, F. and Pastore, A. (2009) Josephin domain of ataxin-3 contains two distinct ubiquitin-binding sites. *Biopolymers*, **91**, 1203-1214.
84. Wilkinson, K.D. (1997) Regulation of ubiquitin-dependent processes by deubiquitinating enzymes. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **11**, 1245-1256.
85. Cummings, C.J. and Zoghbi, H.Y. (2000) Fourteen and counting: unraveling trinucleotide repeat diseases. *Human molecular genetics*, **9**, 909-916.
86. Cokol, M., Nair, R. and Rost, B. (2000) Finding nuclear localization signals. *EMBO reports*, **1**, 411-415.
87. Albrecht, M., Golatta, M., Wullner, U. and Lengauer, T. (2004) Structural and functional analysis of ataxin-2 and ataxin-3. *European journal of biochemistry / FEBS*, **271**, 3155-3170.
88. Burnett, B., Li, F. and Pittman, R.N. (2003) The polyglutamine neurodegenerative protein ataxin-3 binds polyubiquitylated proteins and has ubiquitin protease activity. *Human molecular genetics*, **12**, 3195-3205.
89. Doss-Pepe, E.W., Stenroos, E.S., Johnson, W.G. and Madura, K. (2003) Ataxin-3 interactions with rad23 and valosin-containing protein and its associations with ubiquitin chains and the proteasome are consistent with a role in ubiquitin-mediated proteolysis. *Molecular and cellular biology*, **23**, 6469-6483.

90. Wang, G., Sawai, N., Kotliarova, S., Kanazawa, I. and Nukina, N. (2000) Ataxin-3, the MJD1 gene product, interacts with the two human homologs of yeast DNA repair protein RAD23, HHR23A and HHR23B. *Human molecular genetics*, **9**, 1795-1803.
91. Wang, Q., Song, C. and Li, C.C. (2004) Molecular perspectives on p97-VCP: progress in understanding its structure and diverse biological functions. *Journal of structural biology*, **146**, 44-57.
92. Meusser, B., Hirsch, C., Jarosch, E. and Sommer, T. (2005) ERAD: the long road to destruction. *Nature cell biology*, **7**, 766-772.
93. Boeddrich, A., Gaumer, S., Haacke, A., Tzvetkov, N., Albrecht, M., Evert, B.O., Muller, E.C., Lurz, R., Breuer, P., Schugardt, N. *et al.* (2006) An arginine/lysine-rich motif is crucial for VCP/p97-mediated modulation of ataxin-3 fibrillogenesis. *The EMBO journal*, **25**, 1547-1558.
94. Zhong, X. and Pittman, R.N. (2006) Ataxin-3 binds VCP/p97 and regulates retrotranslocation of ERAD substrates. *Human molecular genetics*, **15**, 2409-2420.
95. Jentsch, S. and Rumpf, S. (2007) Cdc48 (p97): a "molecular gearbox" in the ubiquitin pathway? *Trends in biochemical sciences*, **32**, 6-11.
96. Chai, Y., Berke, S.S., Cohen, R.E. and Paulson, H.L. (2004) Poly-ubiquitin binding by the polyglutamine disease protein ataxin-3 links its normal function to protein surveillance pathways. *The Journal of biological chemistry*, **279**, 3605-3611.
97. Papaevgeniou, N. and Chondrogianni, N. (2014) The ubiquitin proteasome system in *Caenorhabditis elegans* and its regulation. *Redox biology*, **2**, 333-347.
98. Rodrigues, A.J., Coppola, G., Santos, C., Costa Mdo, C., Ailion, M., Sequeiros, J., Geschwind, D.H. and Maciel, P. (2007) Functional genomics and biochemical characterization of the *C. elegans* orthologue of the Machado-Joseph disease protein ataxin-3. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **21**, 1126-1136.
99. Tait, D., Riccio, M., Sittler, A., Scherzinger, E., Santi, S., Ognibene, A., Maraldi, N.M., Lehrach, H. and Wanker, E.E. (1998) Ataxin-3 is transported into the nucleus and associates with the nuclear matrix. *Human molecular genetics*, **7**, 991-997.
100. Li, F., Macfarlan, T., Pittman, R.N. and Chakravarti, D. (2002) Ataxin-3 is a histone-binding protein with two independent transcriptional corepressor activities. *The Journal of biological chemistry*, **277**, 45004-45012.
101. Chatterjee, A., Saha, S., Chakraborty, A., Silva-Fernandes, A., Mandal, S.M., Neves-Carvalho, A., Liu, Y., Pandita, R.K., Hegde, M.L., Hegde, P.M. *et al.* (2015) The role of the mammalian DNA end-processing enzyme polynucleotide kinase 3'-phosphatase in spinocerebellar ataxia type 3 pathogenesis. *PLoS genetics*, **11**, e1004749.
102. Gao, R., Liu, Y., Silva-Fernandes, A., Fang, X., Paulucci-Holthausen, A., Chatterjee, A., Zhang, H.L., Matsuura, T., Choudhary, S., Ashizawa, T. *et al.* (2015) Inactivation of PNKP by mutant ATXN3 triggers apoptosis by activating the DNA damage-response pathway in SCA3. *PLoS genetics*, **11**, e1004834.
103. Ward, J.M. and La Spada, A.R. (2015) Ataxin-3, DNA damage repair, and SCA3 cerebellar degeneration: on the path to parsimony? *PLoS genetics*, **11**, e1004937.
104. Poulton, C., Oegema, R., Heijnsman, D., Hoogeboom, J., Schot, R., Stroink, H., Willemsen, M.A., Verheijen, F.W., van de Spek, P., Kremer, A. *et al.* (2013) Progressive cerebellar atrophy and polyneuropathy: expanding the spectrum of PNKP mutations. *Neurogenetics*, **14**, 43-51.

105. Shen, J., Gilmore, E.C., Marshall, C.A., Haddadin, M., Reynolds, J.J., Eyaid, W., Bodell, A., Barry, B., Gleason, D., Allen, K. *et al.* (2010) Mutations in PNKP cause microcephaly, seizures and defects in DNA repair. *Nature genetics*, **42**, 245-249.
106. Evert, B.O., Vogt, I.R., Kindermann, C., Ozimek, L., de Vos, R.A., Brunt, E.R., Schmitt, I., Klockgether, T. and Wullner, U. (2001) Inflammatory genes are upregulated in expanded ataxin-3-expressing cell lines and spinocerebellar ataxia type 3 brains. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **21**, 5389-5396.
107. Rodrigues, A.J., do Carmo Costa, M., Silva, T.L., Ferreira, D., Bajanca, F., Logarinho, E. and Maciel, P. (2010) Absence of ataxin-3 leads to cytoskeletal disorganization and increased cell death. *Biochimica et biophysica acta*, **1803**, 1154-1163.
108. do Carmo Costa, M., Bajanca, F., Rodrigues, A.J., Tome, R.J., Corthals, G., Macedo-Ribeiro, S., Paulson, H.L., Logarinho, E. and Maciel, P. (2010) Ataxin-3 plays a role in mouse myogenic differentiation through regulation of integrin subunit levels. *PloS one*, **5**, e11728.
109. Blaxter, M. (2011) Nematodes: the worm and its relatives. *PLoS biology*, **9**, e1001050.
110. Schuske, K., Beg, A.A. and Jorgensen, E.M. (2004) The GABA nervous system in *C. elegans*. *Trends in neurosciences*, **27**, 407-414.
111. Byerly, L., Cassada, R.C. and Russell, R.L. (1976) The life cycle of the nematode *Caenorhabditis elegans*. I. Wild-type growth and reproduction. *Developmental biology*, **51**, 23-33.
112. Pinto, S. and De Carvalho, M. (2008) Machado-Joseph disease presenting as motor neuron disease. *Amyotrophic lateral sclerosis : official publication of the World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases*, **9**, 188-191.
113. Murgatroyd, C. and Spengler, D. (2010) Histone tales: echoes from the past, prospects for the future. *Genome biology*, **11**, 105.
114. McIntire, S.L., Reimer, R.J., Schuske, K., Edwards, R.H. and Jorgensen, E.M. (1997) Identification and characterization of the vesicular GABA transporter. *Nature*, **389**, 870-876.
115. Kanai, K. and Kuwabara, S. (2009) Motor nerve hyperexcitability and muscle cramps in Machado-Joseph disease. *Archives of neurology*, **66**, 139; author reply 139-140.
116. Ikeda, H., Yamaguchi, M., Sugai, S., Aze, Y., Narumiya, S. and Kakizuka, A. (1996) Expanded polyglutamine in the Machado-Joseph disease protein induces cell death in vitro and in vivo. *Nature genetics*, **13**, 196-202.
117. Cemal, C.K., Carroll, C.J., Lawrence, L., Lowrie, M.B., Ruddle, P., Al-Mahdawi, S., King, R.H., Pook, M.A., Huxley, C. and Chamberlain, S. (2002) YAC transgenic mice carrying pathological alleles of the MJD1 locus exhibit a mild and slowly progressive cerebellar deficit. *Human molecular genetics*, **11**, 1075-1094.
118. Frokjaer-Jensen, C., Davis, M.W., Sarov, M., Taylor, J., Flibotte, S., LaBella, M., Pozniakovsky, A., Moerman, D.G. and Jorgensen, E.M. (2014) Random and targeted transgene insertion in *Caenorhabditis elegans* using a modified Mos1 transposon. *Nature methods*, **11**, 529-534.
119. Alves, S., Regulier, E., Nascimento-Ferreira, I., Hassig, R., Dufour, N., Koeppen, A., Carvalho, A.L., Simoes, S., de Lima, M.C., Brouillet, E. *et al.* (2008) Striatal and nigral pathology in a lentiviral rat model of Machado-Joseph disease. *Human molecular genetics*, **17**, 2071-2083.

120. Warrick, J.M., Paulson, H.L., Gray-Board, G.L., Bui, Q.T., Fischbeck, K.H., Pittman, R.N. and Bonini, N.M. (1998) Expanded polyglutamine protein forms nuclear inclusions and causes neural degeneration in *Drosophila*. *Cell*, **93**, 939-949.
121. Stochmanski, S.J., Therrien, M., Laganieri, J., Rochefort, D., Laurent, S., Karemera, L., Gaudet, R., Vyboh, K., Van Meyel, D.J., Di Cristo, G. *et al.* (2012) Expanded ATXN3 frameshifting events are toxic in *Drosophila* and mammalian neuron models. *Human molecular genetics*, **21**, 2211-2218.
122. Jung, J., Xu, K., Lessing, D. and Bonini, N.M. (2009) Preventing Ataxin-3 protein cleavage mitigates degeneration in a *Drosophila* model of SCA3. *Human molecular genetics*, **18**, 4843-4852.
123. Chan, H.Y., Warrick, J.M., Andriola, I., Merry, D. and Bonini, N.M. (2002) Genetic modulation of polyglutamine toxicity by protein conjugation pathways in *Drosophila*. *Human molecular genetics*, **11**, 2895-2904.
124. Warrick, J.M., Morabito, L.M., Bilen, J., Gordesky-Gold, B., Faust, L.Z., Paulson, H.L. and Bonini, N.M. (2005) Ataxin-3 suppresses polyglutamine neurodegeneration in *Drosophila* by a ubiquitin-associated mechanism. *Molecular cell*, **18**, 37-48.
125. Jung, J. and Bonini, N. (2007) CREB-binding protein modulates repeat instability in a *Drosophila* model for polyQ disease. *Science*, **315**, 1857-1859.
126. Xu, C., Bailly-Maitre, B. and Reed, J.C. (2005) Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *The Journal of clinical investigation*, **115**, 2656-2664.
127. Schiene, C. and Fischer, G. (2000) Enzymes that catalyse the restructuring of proteins. *Current opinion in structural biology*, **10**, 40-45.
128. Tu, B.P. and Weissman, J.S. (2004) Oxidative protein folding in eukaryotes: mechanisms and consequences. *The Journal of cell biology*, **164**, 341-346.
129. Ellgaard, L. and Helenius, A. (2003) Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nature reviews. Molecular cell biology*, **4**, 181-191.
130. Cribb, A.E., Peyrou, M., Muruganandan, S. and Schneider, L. (2005) The endoplasmic reticulum in xenobiotic toxicity. *Drug metabolism reviews*, **37**, 405-442.
131. Harding, H.P., Calton, M., Urano, F., Novoa, I. and Ron, D. (2002) Transcriptional and translational control in the Mammalian unfolded protein response. *Annual review of cell and developmental biology*, **18**, 575-599.
132. Mori, K. (2000) Tripartite management of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell*, **101**, 451-454.
133. Pallet, N., Bouvier, N., Beaune, P., Legendre, C., Thervet, E. and Anglicheau, D. (2009) [Endoplasmic reticulum stress in kidney diseases: a question of life and death?]. *Nephrologie & therapeutique*, **5**, 173-180.
134. Vaccaro, A., Patten, S.A., Aggad, D., Julien, C., Maios, C., Kabashi, E., Drapeau, P. and Parker, J.A. (2013) Pharmacological reduction of ER stress protects against TDP-43 neuronal toxicity in vivo. *Neurobiology of disease*, **55**, 64-75.
135. Shen, X., Zhang, K. and Kaufman, R.J. (2004) The unfolded protein response--a stress signaling pathway of the endoplasmic reticulum. *Journal of chemical neuroanatomy*, **28**, 79-92.
136. Zhang, K. and Kaufman, R.J. (2004) Signaling the unfolded protein response from the endoplasmic reticulum. *The Journal of biological chemistry*, **279**, 25935-25938.

137. Mueller, T., Breuer, P., Schmitt, I., Walter, J., Evert, B.O. and Wullner, U. (2009) CK2-dependent phosphorylation determines cellular localization and stability of ataxin-3. *Human molecular genetics*, **18**, 3334-3343.
138. Todi, S.V., Winborn, B.J., Scaglione, K.M., Blount, J.R., Travis, S.M. and Paulson, H.L. (2009) Ubiquitination directly enhances activity of the deubiquitinating enzyme ataxin-3. *The EMBO journal*, **28**, 372-382.
139. Julien, C., Lissouba, A., Madabattula, S., Fardghassemi, Y., Rosenfelt, C., Androschuk, A., Strautman, J., Wong, C., Bysice, A., O'Sullivan, J. *et al.* (2016) Conserved pharmacological rescue of hereditary spastic paraplegia-related phenotypes across model organisms. *Human molecular genetics*.
140. Vaccaro, A., Patten, S.A., Ciura, S., Maios, C., Therrien, M., Drapeau, P., Kabashi, E. and Parker, J.A. (2012) Methylene blue protects against TDP-43 and FUS neuronal toxicity in *C. elegans* and *D. rerio*. *PLoS one*, **7**, e42117.
141. Stiernagle, T. (2006) Maintenance of *C. elegans*. *WormBook : the online review of C. elegans biology*, 1-11.
142. Veriepe, J., Fossouo, L. and Parker, J.A. (2015) Neurodegeneration in *C. elegans* models of ALS requires TIR-1/Sarm1 immune pathway activation in neurons. *Nature communications*, **6**, 7319.
143. Switonski, P.M., Fiszer, A., Kazmierska, K., Kurpysz, M., Krzyzosiak, W.J. and Figiel, M. (2011) Mouse ataxin-3 functional knock-out model. *Neuromolecular Med*, **13**, 54-65.
144. Simonetta, S.H. and Golombek, D.A. (2007) An automated tracking system for *Caenorhabditis elegans* locomotor behavior and circadian studies application. *Journal of neuroscience methods*, **161**, 273-280.
145. Catoire, H., Pasco, M.Y., Abu-Baker, A., Holbert, S., Tourette, C., Brais, B., Rouleau, G.A., Parker, J.A. and Neri, C. (2008) Sirtuin inhibition protects from the polyalanine muscular dystrophy protein PABPN1. *Human molecular genetics*, **17**, 2108-2117.
146. Wang, J., Farr, G.W., Hall, D.H., Li, F., Furtak, K., Dreier, L. and Horwich, A.L. (2009) An ALS-linked mutant SOD1 produces a locomotor defect associated with aggregation and synaptic dysfunction when expressed in neurons of *Caenorhabditis elegans*. *PLoS genetics*, **5**, e1000350.
147. Collins, J.J., Huang, C., Hughes, S. and Kornfeld, K. (2008) The measurement and analysis of age-related changes in *Caenorhabditis elegans*. *WormBook : the online review of C. elegans biology*, 1-21.
148. Herndon, L.A., Schmeissner, P.J., Dudaronek, J.M., Brown, P.A., Listner, K.M., Sakano, Y., Paupard, M.C., Hall, D.H. and Driscoll, M. (2002) Stochastic and genetic factors influence tissue-specific decline in ageing *C. elegans*. *Nature*, **419**, 808-814.
149. Vaccaro, A., Tauffenberger, A., Ash, P.E., Carlomagno, Y., Petrucelli, L. and Parker, J.A. (2012) TDP-1/TDP-43 regulates stress signaling and age-dependent proteotoxicity in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS genetics*, **8**, e1002806.
150. Cohen, E., Du, D., Joyce, D., Kapernick, E.A., Volovik, Y., Kelly, J.W. and Dillin, A. (2010) Temporal requirements of insulin/IGF-1 signaling for proteotoxicity protection. *Aging cell*, **9**, 126-134.
151. Koch, P., Breuer, P., Peitz, M., Jungverdorben, J., Kesavan, J., Poppe, D., Doerr, J., Ladewig, J., Mertens, J., Tuting, T. *et al.* (2011) Excitation-induced ataxin-3

- aggregation in neurons from patients with Machado-Joseph disease. *Nature*, **480**, 543-546.
152. Mendonca, L.S., Nobrega, C., Hirai, H., Kaspar, B.K. and Pereira de Almeida, L. (2015) Transplantation of cerebellar neural stem cells improves motor coordination and neuropathology in Machado-Joseph disease mice. *Brain : a journal of neurology*, **138**, 320-335.
 153. Necula, M., Breydo, L., Milton, S., Kaye, R., van der Veer, W.E., Tone, P. and Glabe, C.G. (2007) Methylene blue inhibits amyloid Abeta oligomerization by promoting fibrillization. *Biochemistry*, **46**, 8850-8860.
 154. Wischik, C.M., Edwards, P.C., Lai, R.Y., Roth, M. and Harrington, C.R. (1996) Selective inhibition of Alzheimer disease-like tau aggregation by phenothiazines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93**, 11213-11218.
 155. Rojas, J.C., Bruchey, A.K. and Gonzalez-Lima, F. (2012) Neurometabolic mechanisms for memory enhancement and neuroprotection of methylene blue. *Progress in neurobiology*, **96**, 32-45.
 156. Sontag, A., Rosen, R.C., Litman, H.J., Ni, X. and Araujo, A.B. (2013) The role of initial success rates and other factors in determining reliability of outcomes of phosphodiesterase inhibitor therapy for erectile dysfunction: a pooled analysis of 17 placebo-controlled trials of tadalafil for use as needed. *The journal of sexual medicine*, **10**, 541-550.
 157. Boyce, M., Bryant, K.F., Jousse, C., Long, K., Harding, H.P., Scheuner, D., Kaufman, R.J., Ma, D., Coen, D.M., Ron, D. *et al.* (2005) A selective inhibitor of eIF2alpha dephosphorylation protects cells from ER stress. *Science*, **307**, 935-939.
 158. Jousse, C., Oyadomari, S., Novoa, I., Lu, P., Zhang, Y., Harding, H.P. and Ron, D. (2003) Inhibition of a constitutive translation initiation factor 2alpha phosphatase, CREP, promotes survival of stressed cells. *The Journal of cell biology*, **163**, 767-775.
 159. Avior, Y., Sagi, I. and Benvenisty, N. (2016) Pluripotent stem cells in disease modelling and drug discovery. *Nature reviews. Molecular cell biology*, **17**, 170-182.
 160. Holmes, B., Brogden, R.N., Heel, R.C., Speight, T.M. and Avery, G.S. (1983) Guanabenz. A review of its pharmacodynamic properties and therapeutic efficacy in hypertension. *Drugs*, **26**, 212-229.
 161. Tsaytler, P., Harding, H.P., Ron, D. and Bertolotti, A. (2011) Selective inhibition of a regulatory subunit of protein phosphatase 1 restores proteostasis. *Science*, **332**, 91-94.
 162. Evans, P. and Halliwell, B. (1999) Free radicals and hearing. Cause, consequence, and criteria. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **884**, 19-40.
 163. Kalyanaraman, B., Darley-Usmar, V., Davies, K.J., Dennery, P.A., Forman, H.J., Grisham, M.B., Mann, G.E., Moore, K., Roberts, L.J., 2nd and Ischiropoulos, H. (2012) Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. *Free radical biology & medicine*, **52**, 1-6.
 164. Urano, F., Calton, M., Yoneda, T., Yun, C., Kiraly, M., Clark, S.G. and Ron, D. (2002) A survival pathway for *Caenorhabditis elegans* with a blocked unfolded protein response. *The Journal of cell biology*, **158**, 639-646.
 165. Wang, F., Song, W., Brancati, G. and Segatori, L. (2011) Inhibition of endoplasmic reticulum-associated degradation rescues native folding in loss of function protein misfolding diseases. *The Journal of biological chemistry*, **286**, 43454-43464.

166. Senft, D. and Ronai, Z.A. (2015) UPR, autophagy, and mitochondria crosstalk underlies the ER stress response. *Trends in biochemical sciences*, **40**, 141-148.
167. Chen, X., Shen, J. and Prywes, R. (2002) The luminal domain of ATF6 senses endoplasmic reticulum (ER) stress and causes translocation of ATF6 from the ER to the Golgi. *The Journal of biological chemistry*, **277**, 13045-13052.
168. Jia, K. and Levine, B. (2007) Autophagy is required for dietary restriction-mediated life span extension in *C. elegans*. *Autophagy*, **3**, 597-599.
169. Florez-McClure, M.L., Hohsfield, L.A., Fonte, G., Bealor, M.T. and Link, C.D. (2007) Decreased insulin-receptor signaling promotes the autophagic degradation of beta-amyloid peptide in *C. elegans*. *Autophagy*, **3**, 569-580.
170. Askanas, V. and Engel, W.K. (2006) Inclusion-body myositis: a myodegenerative conformational disorder associated with Abeta, protein misfolding, and proteasome inhibition. *Neurology*, **66**, S39-48.

