



Université de Montréal

**Identification de molécules neuroprotectrices, facteurs de transcription et voies de signalisation en jeu pour la maladie de Machado-Joseph par un modèle transgénique**  
*C. elegans*

*Par*

Yasmin Fard Ghassemi

Département de Biochimie

Faculté de Médecine

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de PhD

En Biochimie

Juin 2021

© Yasmin Fard Ghassemi, 2021

Université de Montréal  
Département de Biochimie, Faculté de médecine

---

*Cette thèse intitulée*

Identification de molécules neuroprotectrices, facteurs de transcription et voies de signalisation  
en jeu pour la maladie de Machado-Joseph par un modèle transgénique *C. elegans*

*Présenté par*

**Yasmin Fard Ghassemi**

*A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes*

**Dr Luis A. Rokeach**

Président-rapporteur

**Dr Jodey Alexander Parker**

Directeur de recherche

**Dre Zoha Kibar**

Membre du jury

**Dre Claire Bénard**

Examinatrice externe

**Dr Daniel Sinnett**

Représentant du doyen

## Résumé

L'ataxie spinocérébelleuse de type 3, aussi connue en tant que la maladie de Machado-Joseph (MMJ), est une maladie qui se développe lorsqu'il y a une expansion des trinuécléotides CAG dans la région codante du gène *ATXN3*. Ce dernier code pour la protéine ATXN3, une enzyme désubiquitinante avec des fonctions essentielles dans le maintien et la stabilisation de l'homéostasie protéique, la résistance au stress, la régulation de la transcription, la réparation de l'ADN, l'organisation du cytosquelette et la régulation de la myogenèse. Les principaux symptômes associés à cette maladie sont l'ataxie (le symptôme clé), une détérioration motrice progressive, la dystonie, la spasticité et la rigidité. Du fait de l'absence de thérapie spécifique et efficace pour traiter les individus atteints de la MMJ, l'approfondissement des connaissances liées à cette maladie est nécessaire.

Le but de cette thèse est de comprendre davantage les mécanismes et voies de signalisations impliqués dans la pathologie de la MMJ. Pour atteindre cet objectif, à partir de notre modèle transgénique *C. elegans* MMJ, deux différents criblages ont été effectués : un criblage non biaisé de 3942 composés, et un criblage de modificateurs génétiques à base d'ARN interférent (ARNi) de 387 clones de facteurs de transcription. Le premier criblage nous a permis d'identifier cinq molécules prometteuses : l'alfacalcidol, le chenodiol, le cyclophosphamide, le fenbufen et le sulfaphénazole. Elles ont permis la restauration du défaut de la motilité, la protection contre la neurodégénérescence, et une augmentation de la durée de vie réduite chez les vers mutants. Trois parmi ces molécules, le chenodiol, le fenbufen et le sulfaphénazole ont démontré une nécessité de la présence de HLH-30/TFEB, un régulateur clé de l'autophagie et de la biogenèse lysosomale, pour leurs propriétés neuroprotectrices. Concernant le deuxième criblage, il nous a permis d'identifier un nouveau gène candidat impliqué dans la MMJ, *fkh-2/FOXG1*. L'inactivation de ce gène a entraîné une aggravation du défaut de la motilité, de la neurodégénérescence, et de la longévité réduite. À l'inverse, sa surexpression a restauré tous ces phénotypes, suggérant ainsi un rôle neuroprotecteur pour FKH-2/FOXG1 dans la MMJ.

Le modèle *C. elegans* de MMJ et les criblages sont des outils puissants permettant un approfondissement des connaissances quant à la pathologie de la MMJ. Pour cette thèse, par l'identification des molécules neuroprotectrices et les facteurs de transcription HLH-30/TFEB et FKH-2/FOXG1, ayant des activités neuroprotectrices dans notre modèle lorsqu'ils sont



surexprimés, il a été possible à mieux comprendre la pathologie de la MMJ, ainsi que les mécanismes et les voies de signalisation qui y sont impliqués. Ces découvertes sont prometteuses à investiguer dans des organismes modèles plus avancés, des applications précliniques et également, pour le développement de nouvelles interventions thérapeutiques pour la MMJ.

**Mots-clés:** Maladie de Machado-Joseph, maladies neurodégénératives, *C. elegans*, ATXN3, criblage pharmacologique, composé neuroprotectif, HLH-30/TFEB, criblage de modificateurs génétiques à base d'ARNi, gène neuroprotectif, FKH-2/FOXG1.

## Abstract

Spinocerebellar ataxia type 3, also known as Machado-Joseph disease (MJD), is a polyglutamine expansion disease arising from a trinucleotide CAG repeat expansion in the coding region of *ATXN3*. This gene encodes ATXN3 protein, a deubiquitinating enzyme, which is involved in protein homeostasis maintenance and stabilization, stress resistance, transcription regulation, DNA repair, cytoskeleton organisation and myogenesis regulation. The main symptoms associated with this disease are ataxia (the key symptom), progressive motor deterioration, dystonia, spasticity and stiffness. Due to our incomplete understanding of mechanisms and molecular pathways related to this disease, there are no therapies that successfully treat core MJD patients. Therefore, the identification of new candidate targets related to this disease is needed.

The aim of this thesis is to gain insights into the pathways and mechanisms leading to MJD. In order to achieve this goal, we performed two different screens, a blind drug screen of 3942 compounds to identify protective small molecules, and a large-scale RNA interference (RNAi) screen of 387 transcription factor genes leading to identification of modifiers involved in our transgenic *C. elegans* MJD model. The first screen allowed us to identify five lead compounds restoring motility, protecting against neurodegeneration, and increasing the lifespan in mutant worms. These compounds were alfalcidol, chenodiol, cyclophosphamide, fenbufen and sulfaphenazole. We then found that three of these compounds, chenodiol, fenbufen and sulfaphenazole required HLH-30/TFEB, a key transcriptional regulator of the autophagy and the lysosomal biogenesis, to complete their neuroprotective activities. The second screen brought us to identify a new hit gene candidate involved in MJD, *fkx-2/FOXG1*. We showed that inactivation of this gene enhanced the motility defect, neurodegeneration and reduced longevity in our MJD model. However, in opposite, its overexpression rescued all these phenotypes, suggesting a neuroprotective role for FKH-2/FOXG1 in MJD when overexpressed.

*C. elegans* models for MJD and the screenings are promising tools to understand the mechanisms and pathways causing neurodegeneration, leading to MJD. In this study, we identified positively acting compounds that may be promising candidates for investigation in mammalian models of MJD and preclinical applications in the treatment of this disease. Also, we

gained insights into the pathways of MJD and found that HLH-30/TFEB and FKH-2/FOXG1 are both implicated in MJD and have neuroprotective activities when they are overexpressed. These promising findings may aid the development of novel therapeutic interventions for MJD.

**Keywords:** Machado-Joseph disease, Neurodegenerative diseases, *C. elegans*, ATXN3, Drug screening, Neuroprotective compounds, HLH-30/TFEB, RNAi screening, Neuroprotective gene, FKH-2/FOXG1.

# Table des Matières

<b>Résumé</b> -----	<b>i</b>
<b>Abstract</b> -----	<b>iv</b>
<b>Table des Matières</b> -----	<b>vii</b>
<b>Liste des tableaux</b> -----	<b>x</b>
<b>Liste des figures</b> -----	<b>xii</b>
<b>Liste des annexes</b> -----	<b>xiv</b>
<b>Liste des sigles et abréviations</b> -----	<b>xv</b>
<b>Dédicace</b> -----	<b>xix</b>
<b>Remerciements</b> -----	<b>xx</b>
<b>Chapitre 1. Introduction</b> -----	<b>1</b>
<i>1.1. Ataxie spinocérébelleuse de type 3</i> -----	<i>1</i>
1.1.1. Généralités-----	1
1.1.1.1. Maladies à répétition-----	1
1.1.1.2. Maladies à expansion de poly-Q-----	2
1.1.1.3. Ataxie spinocérébelleuse de type 3-----	3
1.1.2. Caractères en commun entre la MMJ et les autres maladies à expansion de poly-Q-----	4
1.1.2.1. Phénomène de l'anticipation-----	4
1.1.2.2. Agrégation et corps d'inclusion-----	4
1.1.3. Prévalence et fréquence-----	6
1.1.4. Présentation clinique : symptômes, neuropathologies et diagnostics-----	7
1.1.5. Classification clinique-----	9
1.1.6. Pronostic-----	9
1.1.7. Héritage et génétique-----	10
1.1.8. Ataxin-3-----	11
1.1.8.1. Caractéristiques et structure-----	11
1.1.8.2. Fonctions biologiques-----	13
1.1.8.2.1. Activité DUB et maintien de l'homéostasie protéique-----	15
1.1.8.2.2. Régulation de la transcription-----	17
1.1.8.2.3. Réparation de l'ADN-----	18
1.1.8.2.4. Organisation du cytosquelette et régulation de la myogenèse-----	18
<i>1.2. Voies perturbées et Implications thérapeutiques</i> -----	<i>19</i>
1.2.1. Supprimer ou modifier la protéine ATXN3 mutante par la thérapie génique-----	22
1.2.2. Réduire le clivage protéolytique-----	24
1.2.3. Réduire l'agrégation protéique-----	25
1.2.3.1. Modification post-traductionnelle-----	26
1.2.3.1.1. Phosphorylation-----	26
1.2.3.1.2. SUMOylation-----	26
1.2.3.2. Améliorer l'homéostasie protéique-----	27
1.2.3.2.1. Autophagie-----	28
1.2.3.2.2. Système ubiquitine protéasome (UPS)-----	29
1.2.3.2.3. Chaperons-----	31
1.2.3.2.4. Système sérotoninergique-----	32
1.2.4. Prévenir l'apoptose et améliorer le processus de la réparation de l'ADN endommagé-----	33

1.2.5. Contrer la dérégulation transcriptionnelle -----	34
1.2.6. Réduire le stress oxydatif et restaurer la dysfonction mitochondriale -----	36
1.2.7. Améliorer l'homéostasie calcique-----	38
1.2.8. Réduire l'inflammation-----	39
1.2.9. Améliorer l'homéostasie neuronale-----	40
<b>1.3. Organismes modèles -----</b>	<b>42</b>
1.3.1. <i>C. elegans</i> - Modèle génétique à l'étude -----	42
1.3.1.1. Origine et caractéristiques-----	42
1.3.1.2. <i>C. elegans</i> et ATXN3 -----	43
1.3.1.3. Modèles <i>C. elegans</i> pour la MMJ -----	44
1.3.1.4. Développement de nos modèles <i>C. elegans</i> pour la MMJ -----	47
1.3.1.5. Criblages et <i>C. elegans</i> -----	48
1.3.1.5.1. Généralités-----	48
1.3.1.5.2. Système de criblage utilisé-----	49
1.3.1.6. Facteurs de transcription chez <i>C. elegans</i> -----	49
1.3.1.6.1. Généralités-----	49
1.3.1.6.2. Exemples de FT pour les familles bHLH et forkhead -----	51
1.3.1.6.2.1. <i>hlh-30/TFEB</i> -----	51
1.3.1.6.2.2. <i>TFEB</i> -----	52
1.3.1.6.2.2.1. Fonctions-----	52
1.3.1.6.2.2.2. Mécanismes impliqués dans son activation -----	54
1.3.1.6.2.3. <i>fkh-2/FOXG1</i> -----	55
1.3.1.6.2.4. <i>FOXG1</i> -----	56
1.3.1.6.2.4.1. Fonctions et mécanismes impliqués d'après sa localisation -----	56
1.3.1.6.3. Facteurs de transcription impliqués dans la MMJ, identifiés par le modèle <i>C. elegans</i> -----	57
1.3.2. Autres organismes modèles pour la MMJ -----	57
<b>1.4. Introduction à l'étude -----</b>	<b>63</b>
1.4.1. Première partie du projet de thèse – Criblage pharmacologique-----	63
1.4.2. Seconde partie du projet de thèse – Criblage des modificateurs génétiques -----	64
<b>Chapitre 2.-----</b>	<b>66</b>
<b>Small molecule rescue of ATXN3 toxicity in <i>C. elegans</i> via TFEB/ HLH-30 -----</b>	<b>66</b>
<b>Chapitre 3.-----</b>	<b>115</b>
<b>Overexpression of FKH-2/FOXG1 is neuroprotective in a <i>C. elegans</i> model of Machado-Joseph disease -----</b>	<b>115</b>
<b>Chapitre 4. Discussion -----</b>	<b>161</b>
4.1. Criblages-----	161
4.1.1. Criblage pharmacologique -----	161
4.1.2. Criblage de modificateurs génétiques à base d'ARNi-----	162
4.1.3. Limites et avantages des expériences à base d'ARNi -----	163
4.1.4. Limites et avantages de la technique du criblage employé -----	164
4.2. Facteurs de transcription identifiés -----	167
4.2.1. HLH-30/TFEB dans la MMJ -----	167
4.2.2.1. Implication de HLH-30/TFEB et l'action des composés identifiés sur son expression -----	168
4.2.2.2. Identification des composés dépendants et indépendants de HLH-30/TFEB -----	170
4.2.2.3. Fonctions générales des composés et leurs mécanismes d'action possibles dans la MMJ -----	171
4.2.2. FKH-2/FOXG1 dans la MMJ-----	177
4.2.2.1. Inhibition et surexpression génétiques -----	177
4.2.2.2. Mécanismes d'action possibles-----	178
4.2.3. Lien entre les deux facteurs de transcriptions identifiés et des voies cellulaires impliquées dans la MMJ -----	179

<i>4.3. Criblages dans d'autres maladies à expansion de poly-Q</i> -----	181
4.3.1. Criblages pharmacologiques-----	181
4.3.2. Criblages génétiques à base d'ARNi-----	182
4.3.3. Lien entre les criblages effectués pour cette thèse et ceux des autres études-----	182
<b>Chapitre 5. Conclusions générales</b> -----	<b>184</b>
<b>Bibliographies</b> -----	<b>187</b>
<b>Annexe 1.</b> -----	<b>i</b>
<b>Annexe 2.</b> -----	<b>ii</b>



## Liste des tableaux

### Chapitre 1. Introduction

**Tableau I :** Les maladies à expansion de polyglutamine.

**Tableau II :** Les modèles transgéniques *C. elegans* de la MMJ.

**Tableau III :** Autres modèles animaux, drosophile, poissons-zèbres et souris, pour la MMJ.

### Chapitre 2. Small molecule rescue of ATXN3 toxicity in *C. elegans* via TFEB/ HLH-30

**Table S1:** Complete list of all drugs of the specific libraries tested in this study. A total of 3942 drugs from four different companies (Microsource Discovery, Sigma Lopac, Prestwick and Biomol).

**Table S2:** Raw movement score data for all drugs able to rescue the motility defect observed in *ATXN3-CAG89* mutant transgenic worms. These data are from the liquid culture screen obtained by the MicroTracker machine.

\*\* Pour les Tableaux supplémentaires du Chapitre 2, Table S1 et Table S2, étant des fichiers Excel, ils sont disponibles en ligne dans la section des matériaux supplémentaires du papier.

### Chapitre 3. Overexpression of FKH-2/FOXG1 is neuroprotective in a *C. elegans* model of Machado-Joseph disease

**Table S1:** Complete list of all transcription factor clones used in this study. A total of 387 clones (from ORF-RNAi library (Source BioScience, UK)) were screened in our MJD RNAi sensitive mutant worms.

**Table S2:** List of modifiers (24 suppressors and 23 enhancers) obtained from the primary screen of 387 transcription factor clones in our MJD RNAi sensitive worms. The bold character clones (9 suppressors and 13 enhancers) represent the hit candidates from the secondary screen.

**Table S3:** List of the 11 hit modifiers from the screen to be confirmed on paralysis assays. These modifiers from the screen were hit candidates that showed sequence validation and homology with human genes sequences. Clone and gene names are represented for each candidate.

## Liste des figures

### Chapitre 1. Introduction

**Figure 1.1 :** Diverses maladies neurologiques causées par une expansion de répétitions de nucléotides dans une région spécifique d'un gène.

**Figure 1.2 :** Différentes conformations prises par les protéines poly-Q mal repliées lors du phénomène de l'agrégation.

**Figure 1.3 :** Schéma structurel de la protéine ataxin-3.

**Figure 1.4 :** Interactions et fonctions biologiques de la protéine ataxin-3.

**Figure 1.5 :** Schéma des voies de signalisations perturbées et approches thérapeutiques potentielles proposées pour la MMJ.

**Figure 1.6 :** Neurones GABAergiques du nématode *C. elegans*.

**Figure 1.7 :** Schéma des fonctions et mécanismes d'activation de TFEB.

### Chapitre 2. Small molecule rescue of ATXN3 toxicity in *C. elegans* via TFEB/ HLH-30

**Figure 2.1:** Chemical-genetic screen in *ATXN3*-CAG89 mutant transgenics.

**Figure 2.2:** Validation of the positive compounds on solid media assays.

**Figure 2.3:** Rescue of motility deficit, neurodegeneration and reduce longevity when *ATXN3*-CAG89 worms are treated positive compounds at 2  $\mu$ M.

**Figure 2.4:** Involvement of TFEB/HLH-30, a key regulator of the autophagy process in MJD.

**Figure 2.5:** Chemical-genetic modulation of *hlh-30* suppresses the neuronal toxicity observed in *ATXN3*-CAG89 worms.

**Figure 2.6:** CHEN, FEN and SULFA requires *hlh-30* for their neuroprotective activities.

**Figure 2.7:** Effect of the combination of the three *hlh-30* related compounds on MJD mutants.

**Supplementary Figure 2.1:** Heat map visualization of Tanimoto scores from the five hit compounds (y-axis) screened from the Prestwick library (x-axis).

**Supplementary Figure 2.2:** The effect of the lead compounds on *hlh-30::GFP*, *hlh-30::GFP*; *ATXN3-CAG10* and *hlh-30::GFP*; *ATXN3-CAG89* at different stages of adulthood.

### **Chapitre 3. Overexpression of FKH-2/FOXG1 is neuroprotective in a *C. elegans* model of Machado-Joseph disease**

**Figure 3.1:** Genetic screen in *ATXN3-CAG89* mutant RNAi sensitive worms.

**Figure 3.2:** Two of the hits, *nhr-66* RNAi and *fkh-2* RNAi, increase the motility defect and the neurodegeneration phenotypes in the MJD worms.

**Figure 3.3:** *fkh-2/FOXG1* is specific to MJD and required for longevity in *ATXN3* mutants.

**Figure 3.4:** *fkh-2* LOF increases the motility and neurodegeneration phenotypes in the MJD worms.

**Figure 3.5:** Overexpression of *fkh-2* decreases the neuronal toxicity in *ATXN3-CAG89* worms.

**Supplementary Figure 3.1:** Hit candidates from the screen.

**Supplementary Figure 3.2:** Validation of screening hits on solid media assays.

**Supplementary Figure 3.3:** Rescreening of the two final hits, *nhr-66* and *fkh-2*.

## Liste des annexes

**Annexe 1:** Rescue of ATXN3 neuronal toxicity in *Caenorhabditis elegans* by chemical modification of endoplasmic reticulum stress. Fardghassemi Y, Tauffenberger A, Gosselin S, Parker JA. (2017). *Disease Models and Mechanisms*.

**Annexe 2:** A rapid chemical-genetic screen utilizing impaired movement phenotypes in *C. elegans*: Input into genetics of neurodevelopmental disorders. Schmeisser K, Fardghassemi Y, Parker JA. (2017). *Experimental Neurology*.

## Liste des sigles et abréviations

5-HT1A	Serotonin receptor 1A
AAV	Virus adéno-associé
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ALFA	Alfacalcidol
AMPK	5' adenosine monophosphate-activated protein kinase
APP	Protéine précurseur de l'amyloïde
Appl	$\beta$ -amyloid precursor protein like
ARN	Acide ribonucléique
ARNi	ARN interférent
ARNm	ARN messenger
ARNsh	ARN courts en épingle à cheveux
ARNsi	ARN interférents courts
ASO	Oligonucléotides anti-sens
ASO	Oligonucléotides anti-sens
ATG	Autophagy related
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATP	Adénosine triphosphate
ATTCT	Adénine-Thymine-Thymine-Cytosine-Thymine
<i>atx-3</i>	Gène <i>C. elegans</i> ataxin-3
<i>ATXN3</i>	Gène humain ataxin-3
A $\beta$	Amyloid beta
Bax	Bcl-2-associated X protein
BCL-2	B-cell lymphoma 2
BDNF	Facteur neurotrophique dérivé du cerveau
bHLH	Basic helix-loop-helix
BiP	Immunoglobulin heavy chain-binding protein
bZIP	Basic leucine zipper
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CA8	Anhydrase carbonique 8
CAA	Cytosine-Adénine-Adénine
CAG	Cytosine-Adénine-Guanine
CBP	CREB-binding protein
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CGG/CCG	Cytosine-Guanine-Guanine/Cytosine-Cytosine-Guanine
CHEN	Chenodiol
CHIP	C-terminus of heat-shock 70-interacting protein
CK2	Caséine kinase 2
CLEAR	Coordinated Lysosomal Enhancement And Regulation
CMV	Cytomégaloïdavirus
COQ7	Coenzyme Q7
COX	Cyclooxygénase
CREB	cAMP response element-binding protein
CTG	Cytosine-Thymine-Guanine

CYCLO	Cyclophosphamid
DHPS	Dihydropteroate synthase
DNAJB	DnaJ Heat Shock Protein Family (Hsp40)
DNAJB6	DnaJ Heat Shock Protein Family (Hsp40) Member B6
DNAJC8	DnaJ Heat Shock Protein Family (Hsp40) Member C8
DRPLA	Maladie de l'atrophie dentatorubrale-pallidolusienne
DUB	Désubiquitination
EGF	Epidermal Growth Factor
Elav	Embryonic lethal abnormal vision
ERAD	Dégradation des protéines associées avec le RE
ERK2	Extracellular signal-regulated kinase 2
FDA	Food and Drug Administration
FEN	Fenbufen
FGF	Facteurs de croissance des fibroblastes
FKH-2	Forkhead 2
FMR1	Fragile X mental retardation 1
FOXG1	Forkhead box G1
FOXO	Forkhead box O subclass
GAA	Guanine-Adénine-Adénine
GABA	Acide gamma-aminobutyrique
Gmr	Glass multiple reporter
GS3K $\beta$	Glycogène synthase kinase 3 beta
HDAC	Histone désacétylase
HLH-30	Hélice-boucle-hélice 30 (Helix-loop-helix 30)
HSF-1	Heat Shock Factor-1
HSP	Heat Shock Protein
HSP40	Heat shock protein 40
HSPB7	Small Heat Shock Protein Family B Member 7
IGF	Insulin-like growth factor
IIS	Insulin/insulin-growth factor (IGF)-1-like signaling
IKB- $\alpha$	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor alpha
IP <sub>3</sub>	Inositol 1,4,5-triphosphate
IP <sub>3</sub> R1	Récepteur d'inositol 1,4,5-triphosphate de type 1
IRM	Imagerie par résonance magnétique
ITPR1	Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Type 1
JNK	c-Jun N-terminal protein kinases
kDa	Kilo Dalton
KO	Knock-out
LAMP	Lysosome-associated membrane protein
LC3	Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3
Loco	Locomotion defects
MA	Maladie d'Alzheimer
MAP2	Microtubule-associated protein 2
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MCOLN1	Mucolipine
MH	Maladie de Huntington

miARN	micros ARN
MiT/TFE	Microphtalmie/facteur de transcription E
MMJ	Maladie de Machado-Joseph
MMP-2	Matrix metalloproteinase-2
MP	Maladie de Parkinson
MosSCI	Mos1-mediated Single Copy Insertion
MTOC	Centre d'organisation des microtubules
mTORC1	Mammalian target of rapamycin complexe 1
NCoR	Nuclear receptor co-repressor
NEDD8	Neuronal precursor cell expressed developmentally downregulated
NGM	Nematode Growth Media
NHR	Récepteur d'hormone nucléaire
NPY	Neuropeptide Y
p300	Histone acétyltransférase p300
PCAF	p300/CBP-associated factor
PCR	Réaction en Chaîne par Polymérase
PGC-1 $\alpha$	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha
PKC	Protéine kinase C
PKC $\delta$	Protéine kinase C delta
PNKP	Kinase 3'-phosphatase polynucléotide
Poly-Q	Polyglutamine
QOC	Contrôle de qualité des protéines
Rab1A	Ras-related protein Rab-1A
Rab7	Ras-related protein Rab-7
RAN	Repeat-associated non -AUG
RE	Réticulum endoplasmique
RNS	Espèces réactives de nitrate
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
SBMA	L'atrophie musculaire spinale et bulbaire
SCA	Ataxie spinocérébelleuse
SCA10	Ataxie spinocérébelleuse de type 10
SCA3	Ataxie spinocérébelleuse de type 3
SDF1	Stromal cell-derived factor 1
SEN	Séquence Export Nucléaire
Shh	Sonic hedgehog
SIRT1	Sirtuin-1
SLA	Sclérose Latérale Amyotrophique
SLN	Signal de Localisation Nucléaire
SOD1	Superoxide dismutase 1
SULFA	Sulfaphenazole
TFEB	Facteur de transcription EB
TGF- $\beta$	Transforming growth factor beta
TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor alpha
UIM	Motif d'Interaction avec l'Ubiquitine
UPS	Système Ubiquitine Protéasome



UTR  
VPS39

Région non traduite (Untranslated Region)  
Vacuolar Protein Sorting Factor 39

## Dédicace

*À la plus belle et à la meilleure grand-mère du monde.  
Tu resteras toujours éternelle dans mon cœur.  
J'espère que je serai une femme comme toi dans la vie.  
Une femme forte, brillante et unique.*

## Remerciements

Je voudrais d'abord et avant tout remercier énormément mon directeur de recherche, Dr Alex Parker. L'accomplissement de mes cheminements de maîtrise et de doctorat n'aurait jamais été possible sans sa présence, son soutien, son encadrement, ses recommandations et ses conseils. En m'accueillant dans son laboratoire, il m'a donné la chance et l'opportunité de travailler sur des projets extraordinaires que j'ai adorés, et de passer de très belles années au côté d'une superbe équipe, étant devenue ma seconde famille. Il m'a ouvert la porte à un monde enrichissant et à un avenir brillant et prometteur. Grâce à lui, j'ai pu tant apprendre, comprendre, contribuer et approfondir mes connaissances scientifiques. J'ai eu la chance d'assister à de superbes conférences, de présenter mes projets avec une grande passion, et de connaître des scientifiques à travers le monde. J'ai passé de très belles années dans son laboratoire, et chacun de ces moments est d'une grande richesse et d'ampleur pour moi. Vous avoir fait une demande pour venir réaliser mes études graduées dans votre laboratoire était définitivement un excellent choix, et j'en suis vraiment ravie. Je vous remercie infiniment pour tout.

Je voudrais ensuite remercier grandement la superbe équipe avec qui j'ai eu la chance de travailler. Chaque matin en me réveillant, j'avais hâte de venir vous voir et de compléter mes projets. Chacun des moments que j'ai passés avec vous était si formidable que les mots ne sont pas assez pour les décrire. Pour moi, vous n'étiez pas mes collègues, mais plutôt, ma seconde famille, et cela restera toujours de même. Je voudrais spécialement remercier Audrey, Gilles, Claudia et Ericka. Vous êtes des personnes extraordinaires et je suis tellement heureuse de vous connaître. Je vous remercie infiniment pour votre présence et votre support si chaleureux durant toutes ces années. Vous étiez à mes côtés lors de mes bons, mais aussi mes plus durs moments avec la perte de ma grand-mère. Je vous remercie énormément pour votre présence, votre aide, votre écoute, votre soutien, vos conseils, vos encouragements, nos moments formidables, nos rires, nos célébrations, nos sorties, nos « *coffee time* », et sans oublier bien sûr, votre patience avec moi et les moments « *photo time, let's take pictures* ». Qu'est-ce que j'aurais fait sans vous? Vous êtes vraiment très chers pour moi et je suis reconnaissante de vous avoir dans ma vie. Du fond du cœur, merci énormément pour tout.

Merci beaucoup également aux membres du jury de mon comité de thèse d'avoir accepté de lire et d'évaluer ma thèse de doctorat. Je suis très heureuse et chanceuse d'avoir chacun d'entre vous au sein de mon comité. Merci infiniment de m'accorder votre temps, votre aide et votre présence. J'aimerais aussi remercier les membres de mon comité de thèse pour leur soutien, leur temps et leurs conseils durant toutes mes années doctorales. C'est très apprécié.

Enfin, je souhaite terminer cette section en remerciant énormément mes amis et les membres de ma famille, mon père, ma mère, et spécialement, ma grand-mère qui n'est malheureusement plus dans ce monde. Elle aurait tant voulu voir ce jour, mais je suis certaine, d'où elle est qu'elle me regarde actuellement et est très fière de moi. Je remercie infiniment chacun de vous pour votre soutien, vos encouragements, votre temps et votre présence, toujours, peu importe la situation. J'aimerais faire un remerciement très spécial à ma mère, qui est ma vie. Je n'aurais jamais pu être la femme et la personne que je suis aujourd'hui sans elle. Tout ce que j'ai c'est grâce à elle, par sa persévérance, ses conseils, ses mots, sa présence, ses encouragements et son soutien inconditionnel. Merci tellement d'être toujours à mes côtés, peu importe la situation, et de me donner la force et le courage de passer à travers toutes les épreuves de ma vie. Tu es une personne si formidable et je suis si heureuse et reconnaissante d'avoir une femme comme toi en tant que mère. Merci tellement d'être l'ange de ma vie.

Encore une fois, un GRAND MERCI à tout le monde!

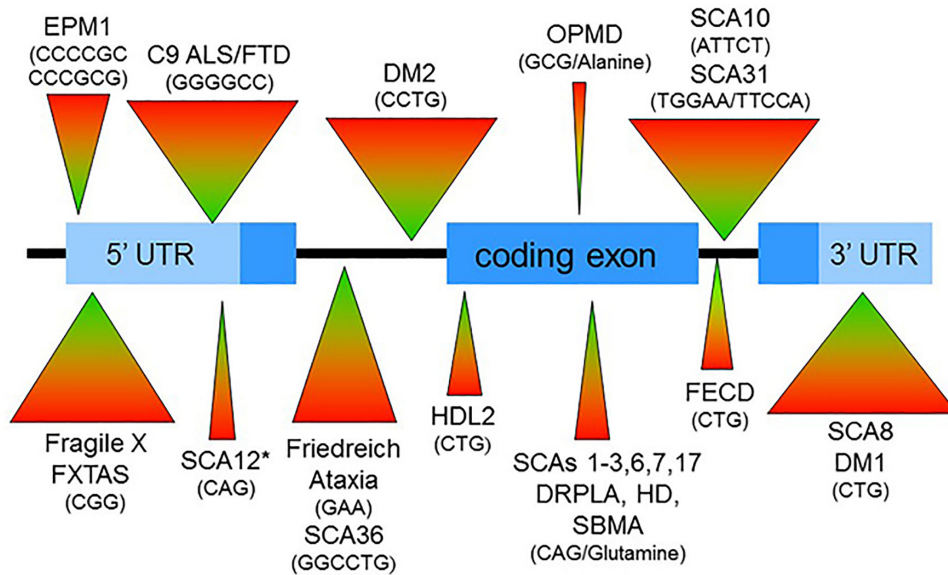
# Chapitre 1. Introduction

## 1.1. Ataxie spinocérébelleuse de type 3

### 1.1.1. Généralités

#### 1.1.1.1. Maladies à répétition

Les maladies à répétition se développent lorsqu'il y a une expansion des répétitions de nucléotides dans une région spécifique d'un gène au-delà d'un certain seuil. L'expansion des répétitions peut être située dans différentes régions, telles que les régions codantes ou non codantes, le nombre de nucléotides peut varier de trois à six nucléotides par répétition, et la séquence des nucléotides peut différer selon la maladie neurologique (**Figure 1.1**) (1-4). Ces maladies affectent principalement le système nerveux et peuvent causer plusieurs changements pathologiques entraînant des troubles neurologiques et neuromusculaires chez l'individu atteint (1-4). Elles n'ont été considérées comme étant un groupe de maladies qu'en 1991 suite à l'identification du syndrome de l'X fragile, causé par une expansion des triplets CGG/CCG (cytosine-guanine-guanine/cytosine-cytosine-guanine) dans le gène *FMRI*, et l'atrophie musculaire spinale et bulbaire (SBMA), causée par une expansion des trinuécléotides CAG/CTG (cytosine-adénine-guanine/cytosine-thymine-guanine) dans la région codante du gène du récepteur des androgènes localisé sur le chromosome X (1,4-7). Concernant les maladies à répétition de trinuécléotides, elles se divisent en trois catégories : les maladies à expansion de polyglutamine (poly-Q), les maladies à expansion non-poly-Q et les maladies génétiques de polyalanine. Pour cette thèse, l'intérêt est mis sur les maladies à expansion de poly-Q, parmi lesquelles figure aussi l'ataxie spinocérébelleuse de type 3 (SCA3).



**Figure 1.1 : Diverses maladies neurologiques causées par une expansion de répétitions de nucléotides dans une région spécifique d'un gène (4).**

Les maladies à répétition diffèrent les unes des autres selon plusieurs facteurs, dont: (i) la région où l'expansion est située, les régions codantes (exons) ou non codantes (les introns ou les régions non traduites 5' ou 3' (UTR)); (ii) la séquence des nucléotides, par exemple, CAG pour les maladies à expansion de poly-Q, ou GAA (guanine-adénine-adénine) pour l'ataxie de Friedrich ; et (iii) le nombre de nucléotides par répétition variant de trois à six nucléotides, tels que trois nucléotides pour les maladies à expansion de poly-Q (CAG), ou cinq nucléotides pour l'ataxie spinocérébelleuse de type 10 (SCA10 ; ATTCT [adénine-thymine-thymine-cytosine-thymine]). Aussi, l'emplacement où l'expansion des répétitions se situe affecte la longueur des répétitions; elle peut atteindre jusqu'à plusieurs centaines de répétitions lorsque l'expansion est située dans la région codante ou encore, jusqu'à plusieurs milliers de répétitions lorsqu'elle est dans les régions non codantes. Tiré de *Paulson, H., Handb Clin Neurol., 2018.*

### 1.1.1.2. Maladies à expansion de poly-Q

Les maladies à expansion de poly-Q sont des maladies héréditaires autosomales dominantes, à l'exception de SBMA étant une maladie récessive liée à l'X, se développant lorsqu'il y a une expansion des trinuécléotides cytosine-adénine-guanine (CAG) dans la région codante d'un gène (3,8-11). Elles regroupent neuf maladies neurodégénératives, incluant les ataxies spinocérébelleuses (SCA) de type 1, 2, 3, 6, 7 et 17, la maladie de Huntington (MH), SBMA, et l'atrophie dentatorubrale-pallidolusienne (DRPLA) (**Tableau I**) (8,11-13). Lorsque les répétitions de trinuécléotides atteignent un seuil pathologique (**Tableau I**), un ensemble de complications physiques (ataxie, dystonie, débalancement, rigidité, etc.), cognitives (déficits de

mémoire aux niveaux verbal et visuel, dysfonctionnement visuospatial, et déficits de fluidité verbale) et psychologiques (anxiété et limitation dans les interactions sociales) est observé chez les individus atteints (8,14). Une perte sélective des neurones intervient aussi, surtout au niveau du cervelet, du tronc cérébral et du tractus spinal (11,15). Des sous-populations neuronales spécifiques, selon la maladie en question, peuvent également être affectées et dégénérées chez les individus atteints. La fréquence moyenne des maladies à expansion de poly-Q est de 1-10 cas par 100 000 individus (16). Parmi elles, la maladie SCA3 et la MH possèdent la plus haute prévalence mondiale (11,17,18).

**Tableau I :** Les maladies à expansion de polyglutamine (11). Tiré de *Fan, H.C., Cell Transplant., 2014.*

**Table 1.** Polyglutamine-Associated Diseases and Their Causative Genes and Proteins

PolyQ Diseases	Locus	Protein	Expanded CAG Repeats	
			Normal	Pathological
SCA1	6p23	Ataxin-1	6–39	41–83
SCA2	12q24	Ataxin-2	14–32	34–77
SCA6	19p13	CACNA1A	4–18	21–30
SCA7	3p21–p12	Ataxin-7	7–18	38–200
SCA17	6q27	TBP	25–43	45–63
MJD/SCA3	14q24–q31	Ataxin-3	12–40	62–86
HD	4p16.3	Huntingtin	6–35	36–121
DRPLA	12p13	Atrophin-1	3–38	49–88
SBMA	Xq11–q12	Androgen receptor	6–36	38–62

polyQ, polyglutamine; SCA, spinocerebellar ataxia; HD, Huntington’s disease; MJD, Machado–Joseph disease; DRPLA, dentatorubropallidolusian atrophy; SBMA, spinal bulbar muscular atrophy; CACNA1A, calcium channel, voltage-dependent, P/Q type,  $\alpha$  1A subunit; TBP, thymine–adenine–thymine–adenine (TATA) box binding protein.

### **1.1.1.3. Ataxie spinocérébelleuse de type 3**

L’ataxie spinocérébelleuse de type 3 (SCA3), aussi connue en tant que la maladie de Machado-Joseph (MMJ), a été pour la première fois décrite en 1972, suite à son apparition chez plusieurs familles d’origine açores/portugaises (19). Deux des familles identifiées avec cette ataxie étaient descendantes de William Machado et Antone Joseph, d’où le nom de cette maladie (20). La MMJ est un désordre neurologique progressif autosomique dominant causé par une expansion instable des trinuécléotides CAG dans la région codante du gène associé, *ATXN3*

(21,22). Elle est causée par un défaut génétique spécifique, résultant d'une altération des cellules et des fibres nerveuses du cerveau menant à une dégénérescence du cervelet, du centre de coordination du cerveau, mais aussi des régions cérébrales associées (23-25).

### **1.1.2. Caractères en commun entre la MMJ et les autres maladies à expansion de poly-Q**

#### ***1.1.2.1. Phénomène de l'anticipation***

La MMJ, tout comme les autres maladies à expansion de poly-Q, présente une forte corrélation génotype-phénotype entre la longueur des répétitions de trinuécléotides et la sévérité de la maladie. En effet, en général, plus la longueur des répétitions est longue, plus l'âge d'apparition des symptômes devient précoce, et plus la maladie est considérée comme étant sévère. Ces maladies présentent une anticipation clinique : tendance d'une apparition plus précoce des symptômes avec une plus grande sévérité de la maladie pour les générations successives (4,8,11,26). Un facteur important influençant le phénomène de l'anticipation est le parent étant à l'origine de la transmission. L'expansion des répétitions survient surtout lors de la transmission de l'allèle du parent à l'enfant, mais aussi lors du développement de la progéniture et de la différenciation des tissus. Pour la MMJ, tout comme pour les autres maladies à expansion de poly-Q, la probabilité de développer une expansion des répétitions de trinuécléotides est augmentée lorsque la transmission est d'origine paternelle (4,27-29). Toutefois, il est à noter qu'en cas de MMJ, même si la transmission paternelle augmente cette probabilité comparativement à une transmission maternelle, le biais paternel n'est pas autant prononcé que par exemple, la maladie de Huntington (29).

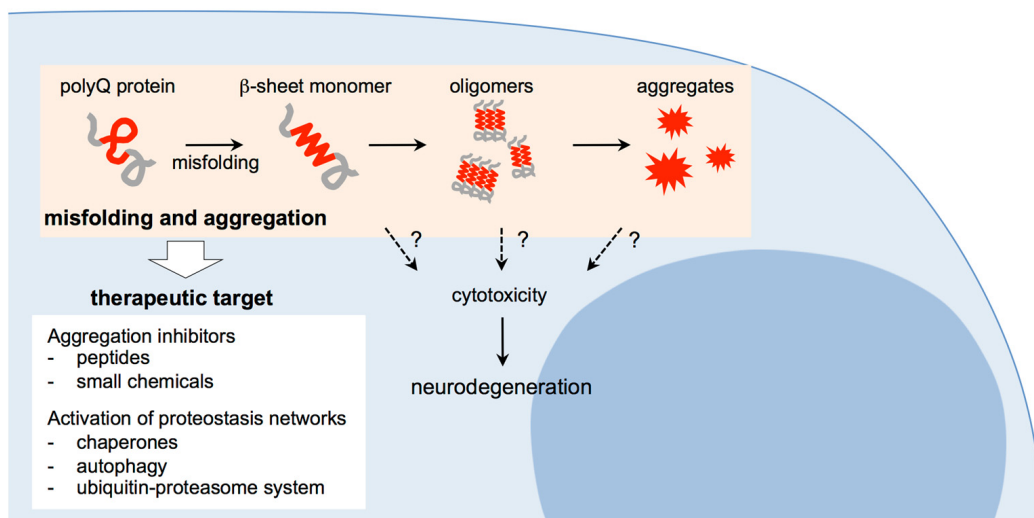
#### ***1.1.2.2. Agrégation et corps d'inclusion***

Une des caractéristiques fondamentales et classiques pour la MMJ, mais aussi pour les autres maladies à expansion de poly-Q et la plupart des maladies neurodégénératives, est l'agrégation des protéines et la formation des corps d'inclusion (8,9,30).

L'agrégation des protéines est un processus dans lequel les protéines mal repliées s'accumulent et s'agrègent. Ce phénomène peut être causé par différents événements, incluant la présence d'une mutation dans la séquence d'ADN, des défauts survenant lors de la synthèse protéique, des stress environnementaux et/ou le vieillissement. Les protéines mal repliées passent à travers diverses conformations avant d'arriver aux agrégats insolubles, tels que la formation des



protéines avec une structure riche en feuillets  $\beta$  dans un état monomérique, et la formation des oligomères (**Figure 1.2**) (31). La détermination de la conformation étant responsable de la toxicité produite dans l'organisme, ainsi que l'identification de certaines formes d'agrégats comme étant neutres ou mêmes protectrices plutôt que toxiques, font encore débat, élevant des réponses et conclusions controversées (31-35). Entre autres, plusieurs études suggèrent la formation et l'accumulation des agrégats insolubles et des corps d'inclusion comme étant la cause de cette toxicité (31,36-43) et d'autres, les espèces solubles intermédiaires, telles que les oligomères et les monomères (31,44-47).



**Figure 1.2 : Différentes conformations prises par les protéines poly-Q mal repliées lors du phénomène de l'agrégation (31).**

Schéma illustrant les différentes étapes du processus de l'agrégation. La formation d'une structure riche en feuillets  $\beta$  dans un état monomérique, des oligomères, et des agrégats insolubles constituent les différentes conformations entreprises par les protéines poly-Q mal repliées lors du processus de l'agrégation. La détermination de la conformation et de la forme étant responsable de la toxicité et de la neurodégénérescence produites dans l'organisme reste encore un débat et un sujet controversé. Diverses cibles thérapeutiques pour réduire l'agrégation dans les maladies à expansion de poly-Q, incluant la MMJ, sont suggérées, telles que l'utilisation des inhibiteurs, ou des stratégies permettant une activation du système de la protéostase. Tiré de *Takeuchi, T., Brain Sci., 2017.*

Concernant les corps d'inclusion, ce sont des structures complexes où les protéines agrégées sont séquestrées, et ils regroupent de nombreuses autres protéines, incluant les chaperons moléculaires, les éléments du système ubiquitine protéasome, le matériel centrosomal

et les protéines du cytosquelette (48). Leur formation survient surtout lorsqu'il y a une surexpression et une accumulation des protéines mal repliées ou endommagées (49). De nombreuses études supportent et associent la formation des corps d'inclusion à l'état pathogénique de la MMJ, mais aussi à d'autres maladies à expansion de poly-Q (50-53). Il a été rapporté que les corps d'inclusion sont enrichis en des protéines impliquées dans diverses voies de signalisation, telle que la signalisation cellulaire, l'apoptose et la division cellulaire. Ainsi, la coagrégation des protéines mal repliées avec les protéines cellulaires normales est suggérée comme étant la cause expliquant la présence de différents types de protéines dans les corps d'inclusion, et aussi la toxicité associée à l'agrégation protéique dans les maladies neurodégénératives (54-56). En effet, comme ils incorporent diverses autres protéines cellulaires telles que les chaperons, les facteurs de transcription et les protéasomes, ils causent la perte structurelle et/ou fonctionnelle des neurones, incluant la mort neuronale et la neurodégénérescence dans plusieurs régions spécifiques du cerveau (55,57,58). À l'opposé de ces études suggérant un rôle toxique pour les corps d'inclusion, d'autres démontrent plutôt un rôle protecteur pour ces derniers. En effet, elles suggèrent une possibilité à ce que les corps d'inclusion soient une réponse cellulaire protectrice déclenchée contre la toxicité produite afin de séquestrer les espèces protéiques anormales, telles que les protéines mal repliées et les agrégats, diminuant ainsi les risques d'une dysfonction et d'une mort neuronale (48,59-61).

### **1.1.3. Prévalence et fréquence**

La MMJ affecte environ 1-5 cas par 100 000 individus (62). En raison de cette prévalence mondiale, elle est située en seconde place, après la MH, dans les maladies à expansion de poly-Q (18,63), et est considérée comme étant la forme la plus commune parmi toutes les différentes formes d'ataxie identifiées (25,26,64-66). Sa fréquence varie considérablement selon la région et l'ethnie où elle est manifestée. En effet, sa fréquence relative est la plus haute au Brésil, au Portugal, à Singapour, en Chine, en Allemagne et au Japon (20,65). À l'opposé, elle est moins fréquente au Canada, aux États-Unis d'Amérique, au Mexique, en Australie, en Inde, et relativement rare en Afrique du Sud et en Italie (65).

#### **1.1.4. Présentation clinique : symptômes, neuropathologies et diagnostics**

La MMJ est caractérisée par plusieurs manifestations cliniques, dont une ataxie cérébelleuse progressive suivie d'une incoordination motrice affectant l'équilibre, la démarche et le langage. L'ataxie, étant le principal et le premier symptôme associé à cette maladie, identifié dans 92,4 % des cas à l'étude, est un trouble de la coordination des mouvements volontaires causé par un problème au système nerveux, plus précisément, au niveau du cervelet, contrôlant la coordination des muscles (26,65,67). D'autres symptômes peuvent aussi se présenter chez les individus atteints, tels que les signes pyramidaux, dont la spasticité, la faiblesse, le ralentissement, des mouvements alternés rapides et l'hyperréflexie, la neuropathie périphérique avec de l'amyotrophie, des anomalies oculomotrices, une ophtalmoplégie externe progressive, des fasciculations faciale et linguistique, des signes extrapyramidaux, dont la dystonie, la rigidité et/ou la bradykinésie (lenteur d'exécution des mouvements sans perte de force musculaire), des troubles cognitifs, une perte de poids, et des troubles de sommeil (68-70). Parmi ceux-ci, les principaux symptômes observés chez la majorité des individus atteints sont l'ataxie, la détérioration motrice progressive, la dystonie, la spasticité, la rigidité, la vision double et des difficultés de langage (65). Un diagnostic clinique de la MMJ est hautement recommandé pour les individus présentant une ataxie cérébelleuse progressive et des signes pyramidaux (68). De plus, à part des complications physiques, les personnes atteintes peuvent aussi développer des problèmes psychologiques, incluant la dépression, l'anxiété et une limitation des interactions sociales, et des troubles cognitifs, tels qu'une altération des fonctionnements exécutif et émotionnel et des déficits de mémoire aux niveaux verbal et visuel (71-73).

Ce trouble neurologique est accompagné par une neurodégénérescence sélective dans le système nerveux, principalement une dysfonction et une perte neuronale au niveau du cervelet, des noyaux gris centraux, de la substance noire, du striatum, du tronc cérébral, du thalamus, du mésencéphale et de la moelle épinière (8,12,74). Un trait anatomique important rapporté chez les individus atteints de la MMJ concerne l'élargissement du quatrième ventricule provoquant une atrophie des neurones dans le pont basilaire et les noyaux cérébelleux profonds, et une perte des fibres pontocérébelleuses et des voies spinocérébelleuses, étant des voies afférentes principales du spino-cervelet (74,75). Une dégénérescence importante des neurones dopaminergiques de la substance noire et des noyaux vestibulaires, ainsi que des neurones moteurs dans de nombreux

divers noyaux ont été observés dans les cerveaux post-mortem de patients atteints de la MMJ (74-76). De plus, dans certains cas, un endommagement spécifique des axones des motoneurones a aussi été rapporté, renforçant davantage l'association de la MMJ à une dégénérescence des neurones moteurs (77). Une dépigmentation dans la substance noire et une atrophie dans plusieurs régions, telles que le cervelet, le pont, la moelle allongée et certains des nerfs crâniens, ont également été observés chez plusieurs patients (78-80). Contrairement à la majorité des autres formes de l'ataxie spinocérébelleuse, dans la MMJ, les noyaux olivaires, le cortex cérébelleux et les cellules de Purkinje sont relativement épargnés (74). Ils sont aussi affectés, mais moins sévèrement que les autres régions du cerveau (81).

Les diverses techniques d'imagerie par résonance magnétique (IRM) sont des outils de diagnostic non invasifs et quantitatifs optés pour l'évaluation structurelle et fonctionnelle des troubles observés en cas de MMJ (82-85). À partir des divers sous-types de l'IRM, une atrophie et une réduction importante du volume dans le cervelet, le tronc cérébral et la matière grise dans les zones temporales, frontales, pariétales et insulaires, ainsi que des lésions étendues dans certaines zones supratentorielles ont été identifiés (85,86). Des altérations métaboliques et microstructurales dans la substance blanche du cerveau, et des activations cérébrales inhabituelles dans le cervelet et certains tissus extracérébelleux, incluant entre autres une perturbation au niveau de la connectivité cérébrale, ont également été détectés chez les individus atteints de cette pathologie (85,87). Par conséquent, ces divers types d'IRM permettent l'identification des porteurs précliniques de la MMJ, la surveillance de la progression de la maladie et également, l'évaluation aux interventions thérapeutiques (85). Pour les individus susceptibles d'être atteints de la MMJ, un examen neurologique peut aussi être effectué afin de déterminer si la personne présente les symptômes typiques associés à la MMJ. Des tests génétiques moléculaires simples peuvent également être entrepris afin d'identifier la mutation dans le gène causatif et évaluer le nombre de répétitions de trinuécléotides CAG, confirmant ainsi le diagnostic (20). Un indice important pour le diagnostic de la MMJ est entre autres les antécédents familiaux. En effet, la plupart des individus atteints de la MMJ possèdent des antécédents familiaux avec des symptômes similaires pouvant aider la médecine quant au diagnostic (20).

### **1.1.5. Classification clinique**

La MMJ est caractérisée par un haut degré de pléomorphisme. Les variabilités existant entre chacun des individus atteints de cette maladie ne sont pas seulement restreintes à l'âge d'apparition des premiers symptômes, mais aussi aux signes neurologiques et au degré de sévérité des symptômes. En général, un lien direct existe entre la sévérité des symptômes et la longueur des répétitions de trinuécléotides; plus la longueur de la répétition est grande, plus les symptômes sont sévères (65). Toutefois, il est à noter que les symptômes manifestés ainsi que leur sévérité peuvent grandement varier d'un individu à un autre, même s'il présente une longueur de répétitions de trinuécléotides similaire. L'hétérogénéité clinique et la nature progressive de la MMJ rendent sa classification clinique difficile. Par conséquent, elle est classifiée cliniquement en trois sous-types : Joseph, Thomas et Machado. Le type 1 (Joseph) est caractérisé par une apparition précoce de la maladie (vers l'âge de 24 ans), une ataxie cérébelleuse minimale, et des signes pyramidaux et extrapyramidaux prédominants. Concernant le type 2 (Thomas), celui-ci correspond à une apparition intermédiaire de la maladie (vers l'âge de 41 ans) caractérisée par une ataxie cérébelleuse prédominante et progressive, et des signes du motoneurone supérieur. Enfin, pour le type 3 (Machado), l'âge d'apparition de la maladie est tardif (vers 47 ans), et elle est caractérisée par une ataxie cérébelleuse, une ophtalmoplégie externe progressive et une neuropathie périphérique significative, phénotype présent chez environ 60 % des cas avec la MMJ, entraînant une amyotrophie et une aréflexie généralisée (24,65,88-91). Certains considèrent également un sous-type additionnel pour la MMJ, le type 4. Ce dernier est considéré comme étant un type rare de la MMJ présentant des caractéristiques parkinsoniennes, des déficits cérébelleux légers, et une neuropathie ou amyotrophie sensorielle motrice distale (92).

### **1.1.6. Pronostic**

L'âge d'apparition des premiers symptômes de la MMJ varie d'un individu à un autre, mais généralement, ils apparaissent au milieu de la vie adulte et progressent sur plusieurs décennies, pouvant même aller jusqu'à près de 30 ans suite à la détection des symptômes pour certains des patients. En moyenne, l'âge où débutent les premiers symptômes est situé autour de 36 ans, et les individus atteints possèdent une durée de vie d'environ 21 ans suite à la détection de la maladie (65,93,94). L'apparition juvénile (vers l'âge de 4-5 ans), à l'adolescence ou jusqu'à

même 70 ans peuvent également survenir, mais il s'agit de cas extrêmes (95-97). Cette grande plage quant à l'âge d'apparition des premiers symptômes de la maladie reflète des différences selon la longueur des répétitions de trinuécléotides variant d'un individu à un autre; des répétitions de trinuécléotides d'une plus grande taille entraînent l'apparition plus précoce de la maladie (24,94). Outre la taille des répétitions, d'autres facteurs tels que des facteurs épigénétiques, non génétiques ou génétiques non spécifiques peuvent aussi contribuer à l'apparition précoce des symptômes liés à la MMJ (98-103).

### 1.1.7. Héritage et génétique

Comme la MMJ est une maladie neurodégénérative héréditaire autosomale dominante, chacun des enfants des parents affectés possède un risque a priori de 50 % d'hériter du gène *ATXN3* avec l'expansion des répétitions CAG. Elle est considérée comme étant une maladie à pénétrance complète. Malgré cela, très peu de cas (2 %) ont été rapportés sans pénétrance. Il n'existe pas de différence quant à l'héritage du gène et le développement de la maladie entre les individus des deux sexes (24,29,65).

Le locus de la MMJ a été découvert en 1993, suite à son identification sur le chromosome 14 (21,104). Par la suite, en 1994, des chercheurs ont identifié, chez des individus atteints de la MMJ, une expansion des répétitions de trinuécléotides CAG dans la partie codante du gène *ATXN3*, au niveau de l'exon 10, mappé sur le chromosome 14, en position 14q24.3-14q32.45 (22). Chez les individus sains, la répétition des trinuécléotides CAG se situe entre 12 à ~44 unités alors qu'en cas de pathologie, l'expansion est entre ~60 à 87 CAG, avec une pénétrance complète (**Tableau I**) (22,105). Bien qu'ils soient moins récurrents, il existe aussi des cas avec une longueur intermédiaire d'expansion, des répétitions de CAG de 45 et 51 à 59 unités, avec une pénétrance incomplète des symptômes s'apparentant à la MMJ (105-109). Le gène *ATXN3* encode une protéine appelée ataxin-3 (*ATXN3*) (22). Une expansion des trinuécléotides CAG dans le gène *ATXN3* entraîne une instabilité et une expansion de poly-Q dans la protéine *ATXN3* (*ATXN3* mutante), menant ainsi à la formation d'une mauvaise structure tridimensionnelle (110).

D'après des études effectuées sur des modèles knock-out du gène ataxin-3 de souris et de *C. elegans*, ces derniers n'ont ni démontré un défaut moteur, ni une neurodégénérescence

significative, ni des phénotypes particuliers associés à la MMJ, suggérant ainsi la pathologie de la MMJ principalement due à un mécanisme de gain de fonction toxique causée par l'expansion de poly-Q dans la protéine ATXN3 (111,112). Cependant, il est à noter que lorsqu'il y a une expansion de poly-Q dans la protéine ATXN3, cela peut provoquer des altérations et des perturbations au niveau des fonctions normales de la protéine native. Par conséquent, cette perturbation au niveau de ses fonctions normales peut ensuite, même en n'étant pas la cause principale, contribuer au développement de la pathologie de la MMJ (41,113-119). Ceci-dit, la MMJ est donc principalement causée par un mécanisme de gain de fonction toxique, mais aussi, la perte des fonctions normales de la protéine ATXN3 peut également contribuer en partie au développement de la maladie.

### **1.1.8. Ataxin-3**

#### ***1.1.8.1. Caractéristiques et structure***

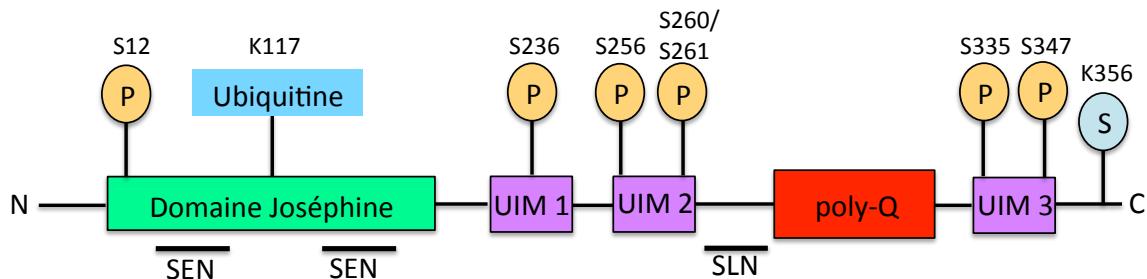
L'épissage alternatif de l'ARN prémessager de *ATXN3* mène à environ 56 ARN messagers matures, parmi lesquels plus de la moitié sont dégradés, et les autres permettent la formation de 20 isoformes (120-122). *ATXN3* encode une protéine à liaison polyubiquitine, ataxin-3 (ATXN3). Cette dernière possède plusieurs fonctions importantes, incluant le maintien et la stabilisation de l'homéostasie protéique, la résistance au stress, la régulation de la transcription, la réparation de l'ADN, l'organisation du cytosquelette et la régulation de la myogenèse (8,123-131). Cette protéine possède 339 acides aminés et un poids moléculaire d'environ 42 kDa pour les individus sains (65). Membre de la famille des protéases à cystéine, elle possède une expression cytoplasmique et nucléaire dans la plupart des tissus. Elle est présente dans le cytoplasme, le noyau et les mitochondries (121). Dans le cerveau, elle est surtout présente dans les neurones, mais elle se trouve aussi en petite quantité dans les cellules gliales (65). La forme non pathogénique de la protéine ATXN3 est principalement cytoplasmique, mais à l'opposé, sa forme pathogénique, avec une expansion des répétitions de trinuécléotides CAG, elle tend plutôt à s'agréger dans les noyaux des cellules neuronales (25,132-134). La cause de cette localisation en conditions de pathologie est encore inconnue, mais il s'agit d'un phénomène déjà observé et décrit dans d'autres maladies à expansion de poly-Q, incluant la MH (24). L'agrégation de la protéine ATXN3 pathogénique dans les noyaux neuronaux constitue une caractéristique importante pour la neuropathologie de la MMJ (41,74). Dans une étude effectuée sur des souris

transgéniques pour la MMJ, il a été démontré que la localisation nucléaire de la protéine ATXN3 avait comme conséquence une aggravation des phénotypes neurologiques avec une plus grande formation de corps d'inclusion ainsi qu'une mort plus précoce (135). À l'opposé, dans cette même étude, des souris transgéniques codant pour la protéine ATXN3 munie d'un signal d'exportation nucléaire ont développé des phénotypes neurologiques plus doux avec moins de corps d'inclusion, proposant la localisation nucléaire de cette protéine nécessaire quant au développement des symptômes associés à la MMJ (135).

Structurellement, la protéine ATXN3 est composée d'un domaine Joséphine à son extrémité N-terminale, qui est un domaine globulaire catalytique hautement conservé, suivi de deux motifs d'interaction avec l'ubiquitine (UIM), une séquence de poly-Q avec une longueur variable et souvent, d'une troisième UIM dans la partie C-terminale selon les isoformes. Elle possède aussi deux séquences d'export nucléaire (SEN) et une séquence de localisation nucléaire (SLN) facilitant le transport actif à travers les pores nucléaires (**Figure 1.3**). Le domaine Joséphine contient une lysine ubiquitinable (K117), un site de phosphorylation (S12) et deux SEN. Ces dernières sont des séquences courtes d'acides aminés permettant l'exportation de la protéine cible du noyau vers le cytoplasme (8). Le domaine Joséphine est principalement composé de deux sous-domaines : le sous-domaine catalytique globulaire et une hélice en forme d'épingle à cheveux (136,137). À sa surface, deux sites de liaison pour l'ubiquitine sont présents : le site 1 placé à la proximité de la fente catalytique, séparant les deux sous-domaines, et le site 2 localisé sur la surface opposée (138). La mono-ubiquitination de la lysine 117 du domaine Joséphine permet à la protéine ATXN3 de réguler et d'augmenter son activité de désubiquitination (DUB), une fonction importante pour cette protéine (139). Cette fonction lui permet de supprimer des modifications uniques de l'ubiquitine, ou encore de modifier ou de cliver l'ubiquitine ou des chaînes polyubiquitinées des substrats nécessitant une dégradation et une élimination par le système (140,141). Les acides aminés du domaine Joséphine sont fortement conservés, ce qui est caractéristique des résidus catalytiques des protéases à cystéine (8,136). Pour ce qui est des domaines UIM, ils sont situés de part et d'autre de la séquence de poly-Q. Ils facilitent la liaison de la protéine ATXN3 aux chaînes polyubiquitinées (105). Compte tenu des isoformes de la protéine ATXN3, le nombre de UIM présents dans la structure peut varier entre deux et trois. Deux des UIM (UIM 1 et UIM 2), localisés dans la partie N-terminale de la région de poly-Q, sont toujours conservés, mais pour ce qui est du UIM 3, placé



dans la partie C-terminale du domaine de poly-Q, selon l'isoforme, il n'est pas nécessairement toujours conservé. Les deux UIM conservés sont des structures  $\alpha$ -hélicoïdales séparées par une courte et flexible région de liaison, et ils agissent en coopération lors de la liaison de l'ubiquitine. Ainsi, l'affinité qui possède les deux motifs en tandem est plus grande que celle existant pour chaque UIM de façon individuelle (142). De plus, ils possèdent cinq résidus sérines avec des sites de phosphorylation potentiels (S236, S256, S260/261, S335, S347), et un site de SUMOylation (K356) dans la partie C-terminale (20,41). Les UIM sont des régulateurs clés de l'activité DUB de la protéine ATXN3. En effet, ce sont les UIM qui sont impliqués dans la liaison de la protéine ATXN3 aux protéines polyubiquitinées, ainsi que régulent la spécificité du clivage de l'ubiquitine des substrats et la mono-/poly-ubiquitination du domaine Joséphine (20,104,143). Concernant le domaine poly-Q, sa longueur varie grandement : dans la forme non pathogénique, il y a 12 à ~ 44 répétitions de CAG, et dans la forme pathogénique, la longueur varie de ~ 60 à 87 répétitions de CAG (11,24,144). De plus, entre UIM 2 et la région de poly-Q, une SLN est présente, permettant l'importation de la protéine cible dans le noyau cellulaire par transport nucléaire (8,145).



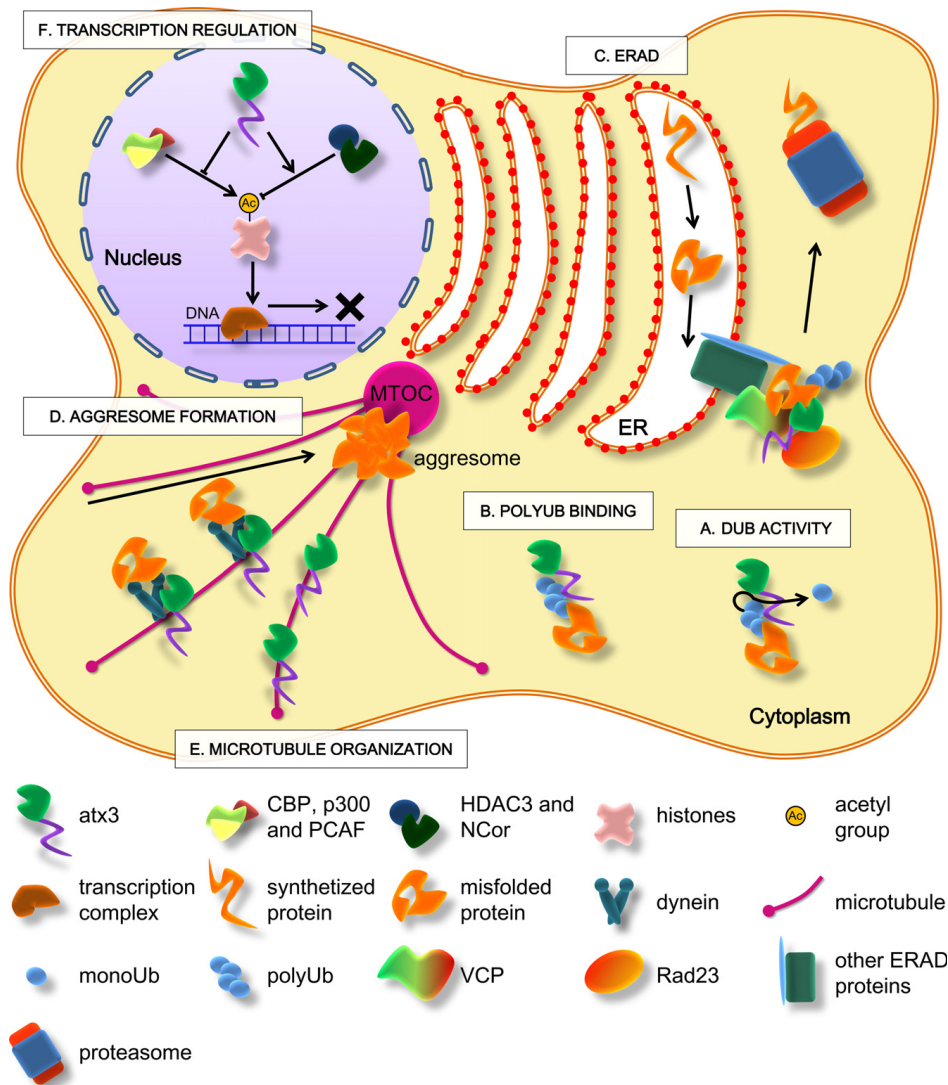
**Figure 1.3 : Schéma structurel de la protéine ataxin-3.**

La protéine ataxin-3 est composée d'un domaine Joséphine à son extrémité N-terminale, deux à trois UIM (selon l'isoforme) et une région de poly-Q. Cette protéine contient au total six sites de phosphorylation (P), un site de SUMOylation (S), une lysine ubiquitinable (K117), deux séquences exports nucléaires (SEN) et une séquence de localisation nucléaire (SLN).

### ***1.1.8.2. Fonctions biologiques***

La protéine ATXN3 possède un rôle primordial dans le maintien et la stabilisation de l'homéostasie protéique, et aussi dans la résistance au stress, favorisant ainsi une prévention de la production d'un stress cellulaire (123-126). Elle possède également des fonctions importantes

dans la régulation de la transcription, la réparation de l'ADN, l'organisation du cytosquelette et la régulation de la myogenèse (**Figure 1.4**) (8,127-131).



**Figure 1.4 : Interactions et fonctions biologiques de la protéine ataxin-3 (8).**

La protéine ataxin-3 est une protéase à cystéine connue pour avoir une activité DUB et interagit avec des chaînes polyubiquitinées. Elle joue un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie protéique et la résistance au stress. En raison de ses interactions moléculaires, elle est impliquée dans diverses voies associées à l'homéostasie protéique, incluant les voies autophagiques, le système ubiquitine protéasome (UPS), le système de dégradation des protéines associées avec le réticulum endoplasmique (ERAD), et aussi dans la formation des aggrésomes. La protéine ATXN3 possède également d'autres fonctions, telles que la régulation de la transcription, la réparation de l'ADN, la régulation de la myogenèse et l'organisation du cytosquelette. Tiré de *Matos, C.A., Prog Neurobiol., 2011.*

#### 1.1.8.2.1. Activité DUB et maintien de l'homéostasie protéique

La protéine ATXN3 possède une activité DUB. Les enzymes DUB sont des protéases ayant pour fonction de cliver l'ubiquitine ou les protéines de type ubiquitine des protéines cibles et de les recycler ensuite (**Figure 1.4**) (8,141). Elles sont des régulateurs importants du système ubiquitine. Ces enzymes sont aussi responsables de : l'activation des protéines de l'ubiquitine, tel que les enzymes de l'activation, de conjugaison et les ligases de l'ubiquitine, impliqués dans le processus de l'ubiquitination, l'élimination de l'ubiquitine des adduits cellulaires, antagoniste de l'ubiquitination des protéines, et le maintien du protéasome 26S loin des chaînes d'ubiquitine inhibitrices (140,146-151). Un *knock-out* du gène ataxin-3, *in vitro* dans des cellules en culture ou dans un modèle de souris, cause une augmentation du niveau des protéines polyubiquitinées à un degré similaire à celui observé lors d'une inhibition du protéasome. Ceci confirme la fonction DUB de la protéine ATXN3 et supporte aussi son implication dans la dégradation protéasomale (111). En tant que DUB, la protéine ATXN3 est principalement associée à la voie du système ubiquitine protéasome (UPS), un des mécanismes principaux responsables de l'élimination et de la clairance des protéines mal repliées ou endommagées. De plus, par son activité DUB et dû à ses interactions avec plusieurs protéines clés de diverses voies, la protéine ATXN3 est également impliquée dans les voies autophagiques, l'activation enzymatique, les interactions protéine-protéine, et la localisation subcellulaire (20,112,116,152).

La perturbation des voies de l'homéostasie protéique est souvent associée à des maladies à expansion de poly-Q (153,154). Le contrôle de qualité des protéines (PQC) est primordial pour la survie neuronale et la fonction cellulaire normale. Les protéines mal repliées ou endommagées peuvent être éliminées par trois principaux systèmes du PQC : l'UPS, les chaperons moléculaires et l'autophagie (155,156). La protéine ATXN3 parvient à accomplir ses fonctions dans le maintien de l'homéostasie protéique et la résistance au stress, entre autres, par ses interactions moléculaires avec des protéines spécifiques impliquées dans divers processus biologiques, tels que la dégradation des substrats polyubiquitinés vers le protéasome, particulièrement, dans le système de dégradation des protéines associées avec le réticulum endoplasmique (ERAD) (**Figure 1.4**) (8,157-162). Parmi ces protéines figurent les protéines parkin et CHIP (« *C-terminus of heat-shock 70-interacting protein* ») qu'elle déubiquitine directement, VCP/p97 avec qui son interaction permet la régulation de la rétrotranslocation des substrats ERAD, et les homologues humains des protéines de réparation de l'ADN de levure, Rad23, hHR23A et hHR23B

**(Figure 1.4)** (8,124,125,159,163,164). La protéine ATXN3 interagit également avec NEDD8 (« *neuronal precursor cell expressed developmentally downregulated gene 8* »), une protéine de type ubiquitine impliquée dans la régulation des fonctions protéiques dans un processus appelé la neddylation, une modification post-traductionnelle des protéines avec ressemblance à l'ubiquitination (165). Quant au processus de l'autophagie, la protéine ATXN3 lui est directement associée, particulièrement en raison de son interaction avec la protéine Beclin-1, une protéine clé de la voie autophagique impliquée dans la nucléation des autophagosomes (152). En effet, il a été rapporté que la protéine ATXN3 se lie et régule le niveau de cette protéine autophagique et ainsi, par cette interaction, permet sa stabilisation et la prévention de sa dégradation par le protéasome (152).

Lorsqu'il y a une surcharge de l'UPS par les protéines mal repliées, le système de dégradation des protéines devient alors saturé et dans l'incapacité d'accomplir ses fonctions normales. C'est alors que se forment des agrésomes, des agrégats de protéines mal repliées, près du centre d'organisation des microtubules (MTOC) (**Figure 1.4**) (8,166,167). Il s'agit d'un processus hautement régulé permettant l'organisation des protéines mal repliées en une seule localisation et ensuite, leur dégradation par les voies autophagiques et les lysosomes, contribuant ainsi au maintien de l'homéostasie cellulaire (166,167). La protéine ATXN3 parvient à réguler et à médier le processus de la formation des agrésomes par ses interactions avec les protéines du cytosquelette, les régulateurs protéasomiaux et les protéines autophagiques, incluant la tubuline, la dynéine, l'histone désacétylase 6 (HDAC6), parkin, CHIP et p62 (48,125,168-170). Elle parvient également à localiser et à réguler la formation des agrésomes des protéines mal repliées pathogéniques, telles que le mutant SOD1 (« *superoxide dismutase* ») et CFTR (« *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* ») (123,129). Son implication dans la formation des agrésomes est due à ses sites catalytiques et à ses UIM, lié à son activité DUB. Une dysfonction au niveau de ces sites provoque une perte de fonction par la protéine ATXN3 à participer à ce processus, entraînant ainsi une consolidation des agrégats protéotoxiques, contribuant possiblement à la perte neuronale et à la neurodégénérescence (123).

En cas d'une expansion de poly-Q dans la protéine ATXN3, il y a une perturbation des voies de PQC et une altération du système ERAD à cause de la production continue des protéines mal repliées. Par conséquent, cette grande pression exercée par les protéines poly-Q sur le

système PQC entraîne une altération de la dégradation protéique, la formation des oligomères, des agrégats et des corps d'inclusion, la séquestration des régulateurs clés des voies autophagique et UPS, une déstabilisation de Beclin-1, et un stress cellulaire contribuant à la toxicité et à la neurodégénérescence (20,59,171). En cas de MMJ, comme la protéine ATXN3 est elle-même impliquée dans les voies de PQC, une perturbation de ces voies cause une cytotoxicité plus importante dans le système et contribue davantage au développement de la pathologie (104).

#### 1.1.8.2.2. Régulation de la transcription

En raison de sa capacité à se lier à l'ADN et à interagir avec les régulateurs de la transcription, ceci confère à la protéine ATXN3 un rôle important dans la régulation du processus de la transcription, fort probablement en tant que co-répresseur transcriptionnel (112,172). Cette fonction est accomplie d'après différentes manières possibles (8,112,173). En effet, d'après les différentes régions dans sa structure, la protéine ATXN3 possède cette capacité à interagir et à se lier à divers facteurs de la régulation de la transcription. Par sa région C-terminale, elle parvient à se lier et à interagir avec des co-activateurs spécifiques de la transcription, CBP (« *CREB-binding protein* »), p300 (histone acétyltransférase p300) et PCAF (« *p300/CBP-associated factor* »), et par cette liaison, il y a répression de la transcription. À partir de ses UIM, elle se lie aux répresseurs de la transcription, l'histone désacétylase 3 (HDAC3) et NCoR (« *nuclear receptor co-repressor* »), bloque ainsi l'acétylation des histones, et par conséquent, provoque une répression de la transcription. Enfin, principalement par son domaine Joséphine, elle se lie aux histones et réprime également l'acétylation en bloquant l'accès aux sites d'acétylation d'histones (**Figure 1.4**) (8,127,137,174).

Lorsqu'il y a une expansion de poly-Q dans la protéine ATXN3, cela mène à la perturbation et à l'altération de ses fonctions et de ses interactions entraînant par conséquent, une modification substantielle du profil de la transcription et une dérégulation transcriptionnelle globale (174-178). Il a été démontré dans une étude effectuée dans un modèle de lignée cellulaire pour la MMJ, qu'en cas de pathologie, il y a une incorporation de CBP dans des inclusions nucléaires (179). Il a été démontré que la surexpression de ce facteur peut prévenir cette toxicité médiée par les protéines poly-Q dans la culture de cellules neuronales (179). L'accumulation des protéines poly-Q dans le noyau et le recrutement des facteurs de transcription aux inclusions démontrent la présence d'une dérégulation transcriptionnelle. Dans la MMJ, mais aussi pour les

autres maladies à expansion de poly-Q, cette perturbation est un élément important de la pathogenèse de la neurodégénérescence induite par les protéines poly-Q.

#### *1.1.8.2.3. Réparation de l'ADN*

La protéine ATXN3 est également impliquée dans les mécanismes de réparation de l'ADN. Elle interagit directement avec l'enzyme kinase 3'-phosphatase polynucléotide (PNKP), phosphatase ayant un rôle clé dans les voies impliquées dans la réparation des dommages à l'ADN (180-182). Des études ont démontré que lorsqu'il y a une mutation au niveau du gène *PNKP*, une série de complications neurologiques peuvent survenir, telles qu'une polyneuropathie et une atrophie cérébelleuse progressive, une épilepsie, un retard dans le développement, mais aussi une neurodégénérescence du fait de la perte cellulaire accélérée (183,184). Il a également été rapporté que lorsqu'il y a un silençage du gène *ATXN3*, il y a une augmentation du niveau des substrats polyubiquitinés et de l'ADN endommagé, une perturbation de la réparation de l'ADN, une signalisation des points de contrôle compromis et également, une vulnérabilité cellulaire accrue quant au stress génotoxique. Ceux-ci confirment donc un rôle essentiel pour la protéine ATXN3 dans le processus de la réparation de l'ADN endommagé (180,181,185).

Lorsqu'il y a une expansion de poly-Q dans la protéine ATXN3, la protéine PNKP, probablement dû à sa séquestration dans les agrégats ATXN3, est inactivée. Ceci provoque une perturbation de la réparation de l'ADN, une accumulation des cassures des brins d'ADN endommagés et une activation des voies proapoptotiques, contribuant ainsi au développement de la pathologie de la MMJ (180-182).

#### *1.1.8.2.4. Organisation du cytosquelette et régulation de la myogenèse*

Outre les fonctions mentionnées, la protéine ATXN3 est également impliquée dans l'organisation du cytosquelette et la régulation de la myogenèse d'après ses interactions avec les protéines tubuline, dynéine, MAP2 (« *microtubule-associated protein 2* ») et certaines intégrines (**Figure 1.4**) (8). Elle est essentielle aux étapes initiales de différenciation pour l'organisation du cytosquelette et pour la régulation du niveau des sous-unités d'intégrine (130). Une étude a démontré qu'une perte de fonction de la protéine ATXN3 entraîne une série de complications et des altérations morphologiques dans les lignées cellulaires humaines et de souris; une désorganisation de plusieurs composantes du cytosquelette, incluant les microtubules, les

microfilaments et les filaments intermédiaires, une perte dans les adhésions cellulaires et une augmentation de la mort cellulaire, proposant ainsi un rôle important pour la protéine ATXN3 dans l'organisation du cytosquelette (131). Pour ce qui est de son rôle dans le maintien de la myogenèse, son silençage dans les myoblastes d'un modèle de souris a présenté comme conséquence un désalignement cellulaire et un retard dans la différenciation suite à l'induction de la myogenèse (130). Ces observations ont donc permis de supporter une fonction importante pour la protéine ATXN3 dans le maintien et la régulation de ce processus (130).

Une dérégulation et une dysfonction des composantes du cytosquelette sont observées lorsqu'il y a une expansion de poly-Q dans la protéine ATXN3, et cela contribue davantage au développement de la MMJ (130,131,158). Il s'agit plutôt d'un caractère commun rapporté aussi pour d'autres maladies neurodégénératives, telles que la maladie d'Alzheimer (MA), la maladie de Parkinson (MP) et la MH (131,186-188).

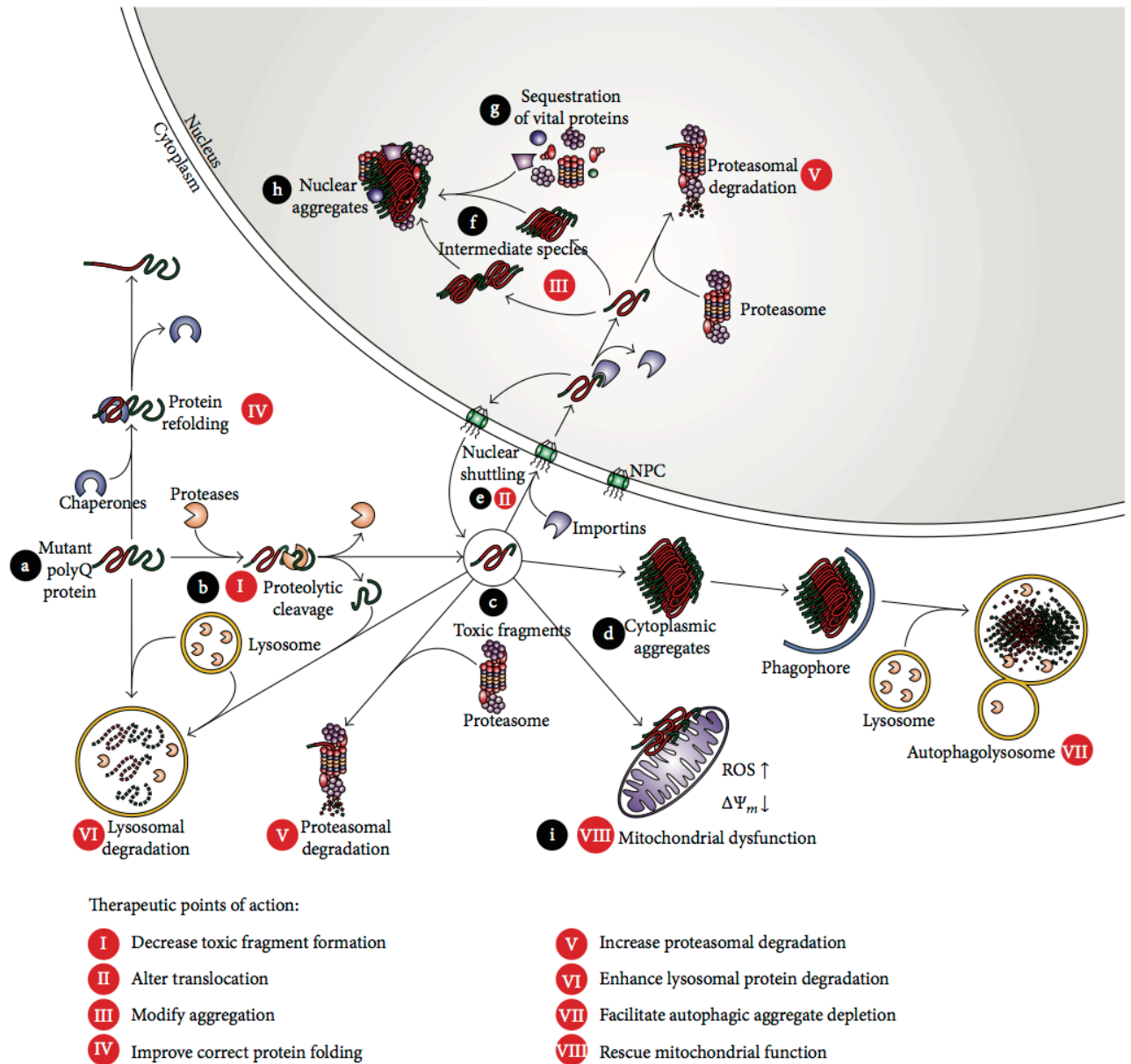
## **1.2. Voies perturbées et Implications thérapeutiques**

Lorsqu'il y a une expansion de poly-Q dans la protéine ATXN3, une série de complications se déclenchent dans le système: l'oligomérisation et l'agrégation, la formation des fragments clivés toxiques, la dérégulation de l'homéostasie protéique, l'altération des voies du PQC, des interactions protéiques aberrantes, l'altération de la réparation d'ADN, des modifications post-traductionnelles, la dérégulation de la transcription, la production d'un stress oxydatif, la dysfonction mitochondriale, la perturbation du transport axonale, la production d'une neuroinflammation, et la dérégulation des homéostasies calcique et neuronale.

À ce jour, aucune thérapie spécifique conçue pour traiter les individus atteints de la MMJ n'existe. Les seuls traitements disponibles sont des traitements de physiothérapie et d'ergothérapie, et des traitements pharmacologiques permettant une atténuation symptomatique pour quelques-uns des symptômes tels que le parkinsonisme, la spasticité, la dystonie, les crampes musculaires et les difficultés de langage (189-194). Il y a aussi des médicaments tels que la buspirone et la tandospirone, étant des agonistes partiels du récepteur 5-HT1A («*serotonin receptor 1A*»), prises contre la dépression, l'anxiété et l'insomnie. Chez les patients atteints de la MMJ, il a même été démontré que la prise de ces médicaments permet une atténuation de l'ataxie et de la douleur aux jambes (195-198). Par conséquent, comme il n'existe encore aucune thérapie

spécifique permettant de traiter et de guérir les individus atteints de la MMJ, comprendre davantage cette maladie, ses mécanismes et ses voies de signalisations, est essentielle pour un éventuel développement thérapeutique contre cette maladie neurologique dévastatrice. La majorité des recherches se concentrent sur les voies de signalisations générales qui sont perturbées dans les maladies à expansion de poly-Q, incluant les voies de l'UPS, l'autophagie, le stress cellulaire, et la réparation de l'ADN endommagé (106,143,199). Il est à noter que diverses espèces toxiques peuvent contribuer et mener au développement de la MMJ : principalement l'expansion de poly-Q dans la protéine ATXN3, mais aussi possiblement, des ARN ATXN3 contenant l'expansion de CAG, des peptides toxiques à décalage de cadre avec une expansion de polyalanine, des produits de la transcription bidirectionnelle, et des produits de la traduction RAN (« *repeat-associated non-AUG* ») (200-204). Cependant, comme les connaissances quant à la contribution de chacune de ces espèces toxiques à la pathogenèse de la MMJ restent restreintes, il est essentiel d'effectuer des évaluations vigilantes quant à l'efficacité et à l'innocuité des approches thérapeutiques suggérées pour chacune des espèces ciblées. Les voies perturbées et les stratégies thérapeutiques potentielles proposées sont détaillées dans les sous-sections suivantes, et la majorité d'entre elles sont schématisées dans la **Figure 1.5**.





**Figure 1.5 : Schéma des voies de signalisations perturbées et approches thérapeutiques potentielles proposées pour la MMJ (13).**

Plusieurs mécanismes moléculaires et voies de signalisation sont perturbés et altérés par l'expansion de poly-Q dans la protéine ATXN3. La protéine mutante subit un clivage protéolytique par des enzymes spécifiques, telles que les protéases, et ceci, entraîne la formation des fragments toxiques. Ces derniers peuvent ensuite se déplacer dans le noyau, former des espèces intermédiaires, séquestrer d'autres protéines et former ainsi des agrégats nucléaires. L'accumulation des agrégats protéiques provoque une altération et une perturbation de plusieurs systèmes dans l'organisme, incluant, entre autres, une dysfonction mitochondriale, une augmentation du stress oxydatif, une perturbation de l'homéostasie protéique et une altération des systèmes principaux de contrôle de qualité des protéines (UPS, autophagie et chaperonnes

moléculaires). Plusieurs approches thérapeutiques prometteuses et potentielles sont proposées pour la MMJ, telles qu'une réduction des fragments toxiques, une altération de la translocation nucléaire, une réduction de la formation des agrégats protéiques, une augmentation de la dégradation des protéines mutantes et des agrégats protéiques par les voies UPS, autophagiques et lysosomales, et une restauration de la fonction mitochondriale. Tiré de *Weber, J.J., Biomed Res Int., 2014.*

### **1.2.1. Supprimer ou modifier la protéine ATXN3 mutante par la thérapie génique**

Il est possible de réduire la progression et les symptômes d'une maladie, étant causée par un mécanisme de gain de fonction toxique, en supprimant ou en modifiant le gène causatif, d'après deux principales stratégies thérapeutiques : l'ARN interférent (ARNi) et les oligonucléotides anti-sens (ASO). Selon plusieurs facteurs, incluant le type de ciblage, la cible et le temps de l'intervention thérapeutique, différents taux de succès sont obtenus dans les modèles étudiés (205-213).

Les stratégies proposées pour rendre silencieux le gène *ATXN3* par ARNi comprennent la transfection des constructions de l'ARNi par des allèles spécifiques ou non spécifiques. Les constructions de l'ARNi peuvent être délivrées par l'utilisation de vecteurs spécifiques tels que le virus adéno-associé (AAV) et lentivirus, ou par l'utilisation de systèmes non viraux, comme les nanoparticules lipidiques (207,214,215). Dans tous les cas, une expression à long terme efficace de l'ARNi est nécessaire afin de prévenir l'agrégation protéique (214,215). Le silençage à allèle spécifique du gène *ATXN3* mutant est possible en ciblant un allèle de polymorphisme nucléotidique unique, ou en utilisant des constructions avec un saut d'exon pour l'exon 9 ou 10 (216,217). Une diminution considérable des anomalies neuropathologiques dans le striatum d'un modèle transgénique de rat MMJ a été observée suite au ciblage d'un ARN en épingle à cheveux (ARNsh), ciblant spécifiquement un polymorphisme nucléotidique unique, la variante cytosine, présente dans 70% des individus atteints de la MMJ (218). Ces observations ont été ensuite confirmées, par l'utilisation de cette même stratégie, dans des modèles de souris transgéniques MMJ, démontrant une réduction des anomalies neuropathologiques et comportementales (213,214,219). Pour ce qui est du silençage à allèle non spécifique du gène *ATXN3* mutant et sauvage, il s'agit d'une autre stratégie possible à entreprendre pour prévenir l'agrégation protéique et la neuropathologie observée dans la MMJ. Dans une étude effectuée avec un modèle transgénique de rat, une diminution significative de la neuropathologie associée à la MMJ a été

rapportée suite à l'utilisation de cette approche, la proposant ainsi comme étant potentielle dans le traitement de la MMJ (210). Cependant, il faut rester prudent avec cette approche et l'investiguer davantage avant de passer en applications cliniques, car il s'agit d'une méthode de silençage global. Son utilisation pourrait compromettre les fonctions normales de la protéine ATXN3 et ainsi, provoquer une série de complications néfastes dans le système.

Il est également possible de cibler certains microARN (miARN) spécifiques dérégulés dans la MMJ. En effet, une transfection des miARN mimiques de ATXN3, conçus artificiellement, a permis une liaison à la partie 3'-UTR de son ARNm, résultant en l'inhibition de son expression et par conséquent, à une réduction de l'accumulation de la protéine ATXN3 mutante et de la cytotoxicité dans l'organisme (220-223). Contrairement à d'autres maladies, la thérapie à base de miARN n'est pas encore en vigueur en essais cliniques pour la MMJ. Même si les résultats en essais précliniques ont été prometteurs, des investigations supplémentaires sont requises avant de passer en essais cliniques (224).

Comme autre approche pour la thérapie génique, il y a également l'approche utilisant les oligonucléotides anti-sens (ASO). Ces derniers sont des oligonucléotides courts, monocaténares et synthétiques permettant une augmentation de la stabilité dans les fluides biologiques et une modification (suppression ou correction) de l'expression génique (225). Ils servent de paires de séquences hautement sélectives à des régions spécifiques de l'ARNm permettant la régulation de la traduction du matériel génétique en des protéines fonctionnelles. Ils se lient à l'ARN cible complémentaire, et par cette liaison, ils peuvent activer le mécanisme anti-sens de la RNase H et par conséquent, médier le clivage de l'ARN cible, ou encore, moduler l'épissage, induire un saut d'exon, arrêter la traduction ou séquestrer les miARN endogènes (225,226). Contrairement à la méthode de l'ARNi, les ASO présentent une approche à suppression génique non virale, et ils sont devenus une stratégie thérapeutique convaincante et prometteuse pour plusieurs diverses maladies, telles que les maladies neurologiques, oncologiques, cardiaques et métaboliques (206). Les ASO sont une approche potentielle en évaluation en essais précliniques pour plusieurs maladies neurodégénératives, et pour certaines, ils sont même en vigueur en essais cliniques (227,228). Entre autres, en 2016, suite à un succès aux essais cliniques, la première thérapie de modification de gène médiée par ASO a été approuvée par la FDA (« *Food and Drug Administration* ») pour le traitement de SMBA (229,230). Le profil sécuritaire et la grande

efficacité du traitement par ASO pour la SMBA a stimulé l'intérêt de son utilisation en essais cliniques pour d'autres maladies neurodégénératives (231-233). Également, d'après de nombreuses études précliniques réalisées pour la MMJ, il a été possible d'observer, suite au traitement par ASO, une diminution remarquable du niveau de la protéine ATXN3 mutante dans diverses régions du cerveau, et aussi une amélioration de la fonction motrice dans les modèles à l'étude (106,205,206,234). Les résultats précliniques semblent prometteurs et efficaces pour l'évaluation de cette approche en essais cliniques sur des patients atteints de cette maladie.

### **1.2.2. Réduire le clivage protéolytique**

Le clivage protéolytique est un processus par lequel il y a une séparation irréversible des liaisons peptidiques dans une protéine ayant comme conséquence l'activation, l'inactivation ou le renouvellement de celle-ci (235). Le clivage protéolytique de la protéine ATXN3 mutante, effectué par les enzymes calpaïnes et caspases, est un facteur critique pour la progression de la MMJ, connu en tant qu'hypothèse du fragment toxique (171). Comme il y a protéolyse à divers sites de clivage, les fragments obtenus possèdent des tailles moléculaires et une composition de domaine différentes (171,236-240). Ce clivage mène à la formation de fragments N-terminal et C-terminal, supportant les fragments C-terminal comme étant probablement l'entité toxique provoquant des changements conformationnels et la formation des agrégats intranucléaires pathologiques (135,238). En effet, ces fragments ont tendance à former des agrégats, à s'accumuler dans le noyau et à co-agrégier avec la protéine ATXN3 native, provoquant ainsi une altération et une perturbation de ses fonctions normales (110,235). Il a été démontré que les fragments de la protéine ATXN3 mutante sont plus toxiques que la protéine mutante complète (171,241).

Afin de diminuer et de prévenir la toxicité causée dans le système par l'expansion de poly-Q dans la protéine ATXN3, il faudrait donc réduire son clivage protéolytique. L'approche thérapeutique classique proposée par la plupart des chercheurs est l'inhibition de ce clivage en ciblant les enzymes responsables, les calpaïnes et les caspases. À partir des inhibiteurs spécifiques (le calpastatin, le calpeptine, etc.), il a été possible d'observer une réduction quant à l'agrégation des inclusions intranucléaires, la neurodégénérescence et la toxicité dans divers organismes modèles à l'étude (239,242-248). Comme autre approche, il est aussi possible d'utiliser un ASO médiant un saut d'exon pour les exons 8 et 9 de la protéine ATXN3 mutante,

région contenant de nombreux sites prédits de clivage et deux UIM (211). Par cette méthode, il a été possible de réduire la formation des fragments clivés toxiques. Cependant, son habileté à se lier aux chaînes polyubiquitinées par son activité DUB a été retirée suite à cette modification. Ainsi, étant donné le faible taux d'efficacité, et le retrait des fonctions de la protéine ATXN3, cette approche ne constitue pas une option thérapeutique viable pour la MMJ (211). Par conséquent, l'approche d'inhibition des enzymes responsables du clivage protéolytique semble être une méthode plus efficace à considérer quant à la réduction des fragments toxiques dans la MMJ. Malgré cela, des investigations supplémentaires sont nécessaires afin d'évaluer, entre autres, l'effet de cette inhibition sur d'autres protéines du système, à court et à long terme, car ces enzymes possèdent également plusieurs autres fonctions dans l'organisme (143). En effet, les caspases sont aussi impliquées dans la mort cellulaire médiée par différentes voies telles que l'apoptose et l'autophagie, la prolifération et la différenciation cellulaire, la suppression tumorale, le développement neuronal, le guidage axonal et le vieillissement (249). Quant aux calpaïnes, elles sont également impliquées dans l'apoptose, la prolifération et la motilité cellulaire, et elles sont des régulateurs importants des fonctions cellulaires. Le système des caspases est un système protéolytique intracellulaire important avec principalement des fonctions apoptotiques, et le système des calpaïnes favorise davantage le processus protéolytique à la dégradation pour réguler l'activité, la spécificité, la localisation et la structure du substrat (250). Par conséquent, comme leur inhibition peut altérer leur fonction normale et provoquer une perturbation quant à leurs interactions avec diverses autres protéines, des investigations supplémentaires pour cette approche sont nécessaires avant de passer aux essais cliniques pour le traitement de la MMJ (143).

### **1.2.3. Réduire l'agrégation protéique**

Le processus de l'agrégation est un phénomène fondamental pour les maladies neurodégénératives en général, incluant la MMJ. Il s'agit bien d'un phénomène toxique produit dans le système. En revanche, concernant la conformation étant responsable de cette toxicité, et l'identification de certaines de ses formes comme étant plutôt neutres ou même protectrices restent encore un débat et un sujet controversé avec des conclusions différentes selon les études (31-35). Afin de réduire et de prévenir l'agrégation protéique, plusieurs se sont donc concentrés à

étudier les mécanismes responsables de ce processus, incluant les modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation et la SUMOylation, et le système de PQC.

### ***1.2.3.1. Modification post-traductionnelle***

#### *1.2.3.1.1. Phosphorylation*

Comme mentionné précédemment, la protéine ATXN3 possède plusieurs sites de phosphorylation. La phosphorylation est un processus important pour des modifications post-traductionnelles permettant la régulation des interactions protéine-protéine, le métabolisme cellulaire, la dégradation protéique et des réactions enzymatiques (251). Selon le site phosphorylé, cette modification post-traductionnelle peut avoir des effets préventifs ou stimulateurs quant à la formation d'agrégats protéiques et au développement de la maladie (252). La phosphorylation à S12 de la protéine ATXN3 mutante, site de phosphorylation localisé dans son domaine Joséphine, a été démontrée favoriser une diminution de la cytotoxicité, l'agrégation et la désubiquitination protéique, suggérant ainsi ce site comme une cible thérapeutique possiblement potentielle pour la MMJ (253). Au contraire, une phosphorylation des sites placés dans les UIM de cette protéine, par la caséine kinase 2 (CK2), a provoqué une accumulation des protéines dans le noyau et la formation des corps d'inclusion, proposant ainsi un rôle stimulateur pour la phosphorylation par CK2 dans la pathologie de la MMJ (254,255). Toutefois, lorsqu'il y a phosphorylation d'un des mêmes sites associés à CK2 (S256) par une différente kinase, le glycogène synthase kinase 3 (GSK3), un effet contraire est observé; celle-ci inhibe l'agrégation protéique, lui suggérant ainsi un rôle protecteur dans la MMJ (256). Par conséquent, l'effet de la phosphorylation peut différer selon la kinase qui phosphoryle un site donné. Comme approche thérapeutique, l'utilisation des molécules inhibitrices pour CK2 pourrait être une stratégie efficace. Cependant, des expériences supplémentaires pour évaluer la faisabilité de cette stratégie, ainsi que les sites de phosphorylation optimales et prometteuses à cibler sont nécessaires.

#### *1.2.3.1.2. SUMOylation*

Une association a été rapportée entre la protéine ATXN3 mutante et le processus de la SUMOylation. Ce processus consiste en l'attachement covalent d'un petit modificateur de type ubiquitine (SUMO) aux résidus lysines de la protéine cible et influence ainsi sa localisation, ses interactions, son activité et sa stabilité (257,258). Une SUMOylation est entreprise au résidu K356, localisé dans la partie C-terminale de la protéine. Ceci provoque une réduction de la

formation des fibrilles de ATXN3 *in vitro* et augmente également son affinité pour l'ATPase VCP/p97 (257). Cette dernière est impliquée dans la rétrotranslocation des protéines mal repliées du réticulum endoplasmique (RE) jusqu'au cytosol pour leur dégradation par le protéasome (126,164). La SUMOylation de la protéine ATXN3 mutante peut affecter l'ERAD et l'agrégation protéique. Entre autres, dans une étude, il a été démontré que la SUMOylation d'une isoforme de la protéine ATXN3 mutante résulte en une augmentation de sa dégradation protéique, une réduction des neurones corticaux avec des corps d'inclusion, et une augmentation de son affinité pour VCP/p97 (257). Malgré cela, avant de la cibler comme une approche thérapeutique à examiner davantage en essais précliniques, des études supplémentaires sont d'abord nécessaires pour déterminer comment exactement cette modification post-traductionnelle affecte et modifie les fonctions, l'agrégation, la dégradation et la clairance de la protéine ATXN3.

#### ***1.2.3.2. Améliorer l'homéostasie protéique***

Les systèmes principaux de contrôle de qualité des protéines (PQC) responsables de la clairance des protéines mal repliées et agrégées sont : l'autophagie, l'UPS et les chaperonnes moléculaires. Ils sont critiques et essentiels pour la survie cellulaire, l'homéostasie et la fonction cellulaire normale (155,156). La perturbation de l'homéostasie protéique et des systèmes de PQC est fréquente dans les maladies à expansion de poly-Q, incluant la MMJ. En effet, lorsqu'il y a une production continue des protéines ATXN3 mutantes, étant sujet aux agrégats, les voies de PQC peuvent devenir surchargées et incapables de remplir leur fonction primaire, la dégradation et l'élimination des protéines mal repliées et agrégées. De plus, cette agrégation peut provoquer une séquestration des composantes des voies de PQC, former des corps d'inclusion et exacerber ainsi la toxicité produite dans l'organisme. Dans les inclusions nucléaires neuronales, plusieurs protéines sont retrouvées telles que des protéines à chocs thermiques (des chaperons), des sous-unités protéasomales et ubiquitaires, des facteurs de transcription, des protéines associées à l'autophagie et la protéine ATXN3 native (51,259,260). En cas de MMJ, cette altération est même exacerbée, car la protéine ATXN3, ayant une activité DUB, est elle-même impliquée dans les voies de PQC, particulièrement dans la voie UPS, et lorsqu'il y a une expansion de poly-Q dans la protéine ATXN3, cela peut entraîner une séquestration de la protéine ATXN3 native dans les agrégats de poly-Q et les corps d'inclusions et ainsi, provoquer une altération et une perturbation de ses fonctions normales (20).

#### 1.2.3.2.1. Autophagie

L'autophagie est un processus hautement conservé permettant la dégradation des protéines mal repliées et des organites subcellulaires endommagés. Il est divisé en plusieurs étapes : l'initiation de l'autophagie, la formation des autophagosomes, étant des vésicules à double membrane englobant les éléments qui doivent être dégradés, la maturation des autophagosomes, la formation des autolysosomes, qui sont formés par le fusionnement des lysosomes aux autophagosomes, et enfin, la dégradation et le recyclage des autolysosomes (261).

Plusieurs études rapportent une altération et une perturbation de la voie autophagique en cas de MMJ (262-264). En effet, une dérégulation de l'expression de plusieurs protéines clés autophagiques a été rapportée dans le cerveau post-mortem de patients atteints de la MMJ, incluant une réduction significative de Beclin-1 et une augmentation des protéines clés autophagiques ATG12 (« *Autophagy related 12* »), LAMP-2 (« *Lysosome-associated membrane protein 2* »), Rab7 (« *Ras-related protein Rab-7* »), Rab1A (« *Ras-related protein Rab-1A* ») et LC3 (« *Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3* ») (118). Comme mentionné précédemment, la protéine ATXN3 native a comme fonction d'interagir avec la protéine Beclin-1 et de la retenir d'une dégradation par le protéasome. Cependant, lorsque la protéine ATXN3 est mutante, sa fonction normale est perturbée et elle provoque le ciblage et la dégradation de cette protéine au protéasome, expliquant ainsi son niveau réduit dans la MMJ. Cela entraîne une réduction du flux autophagique et de la formation des autophagosomes, résultant ainsi en la perturbation de la voie autophagique (265). Également, une co-localisation de plusieurs protéines autophagiques a été détectée dans les agrégats intranucléaires du cerveau post-mortem des patients atteints de la MMJ (217,266).

Cibler la voie autophagique, une des voies impliquées dans le système PQC, pour la dégradation des agrégats protéiques ATXN3 mutants, en tant qu'approche thérapeutique pour la MMJ, pourrait être potentielle et prometteuse. Il est possible de réguler cette voie de manière génétique ou pharmacologique. Dans des études effectuées sur des modèles murins transgéniques MMJ, suite à une surexpression de Beclin-1, médiée par un vecteur lentiviral, plusieurs effets bénéfiques ont été observés, incluant une stimulation du flux autophagique, une clairance de la protéine ATXN3 mutante, une restauration du défaut moteur, et une amélioration des déficits neuropathologiques (267-270). Il a également été démontré que la surexpression de l'enzyme



CYP46A1, une enzyme impliquée dans le métabolisme du cholestérol cérébral, étant réduite dans les extraits cérébelleux des patients et des souris MMJ, entraîne une diminution des agrégats protéiques, améliore le défaut moteur et les neuropathologies associées à la MMJ, par une activation indirecte de la voie autophagique, suggérant ainsi un rôle important de la voie du cholestérol neuronal à contribuer aux mécanismes et voies impliqués dans la clairance des agrégats protéiques, soit par la voie autophagique (271,272).

Il est également possible d'activer l'autophagie par l'utilisation de molécules spécifiques telles que la rapamycine, le tréhalose, la cordycépine et la calpeptine (244,273,274). Même en ayant tout démontré des effets bénéfiques dans les modèles MMJ, incluant une activation et une augmentation de la dégradation protéique par la voie autophagique, une réduction des agrégats protéiques et une amélioration des phénotypes et anomalies neuropathologiques, aucun des composés, à l'exception du tréhalose, n'a encore été appliqué en essais cliniques pour la MMJ (197,244,273-275). Le tréhalose, un inducteur de l'autophagie indépendante de mTOR, a été évalué sur des patients MMJ (phase II complétée), et comme résultat, il s'est avéré être un traitement sécuritaire et efficace permettant une stabilisation des déficits neurologiques dans la MMJ (276). Également en essais précliniques, son traitement a permis, à la suite d'une activation et d'une augmentation du processus de l'autophagie, une réduction des agrégats protéiques, des neuropathologies, et une amélioration du déficit moteur et de la démarche ataxique dans des modèles de souris MMJ (277). L'action du tréhalose à induire l'autophagie est due à sa capacité à activer les systèmes AMPK (« 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase ») et TFEB (Facteur de transcription EB), des régulateurs clés du processus de l'autophagie, qui favorisent ensuite l'activation des protéines importantes impliquées dans cette voie, incluant entre autres Beclin-1, ATG10, ATG12, p62 et LC3 (278-283). Par conséquent, le tréhalose, composé approuvé par la FDA (Food and Drug Administration), semble être une approche efficace et prometteuse pour le traitement des patients MMJ, mais aussi, possiblement, pour d'autres maladies à expansion de poly-Q et des maladies neurodégénératives.

#### 1.2.3.2.2. *Système ubiquitine protéasome (UPS)*

L'expansion de poly-Q dans la protéine ATXN3 n'empêche pas la liaison de la protéine mutante aux chaînes polyubiquitinées et n'inactive pas son activité enzymatique dans les essais cellulaires et *in vitro* (158,284). Cependant, cette expansion peut altérer ses fonctions normales,

incluant la spécificité au substrat, les interactions protéine-protéine et l'efficacité de ciblage des substrats au protéasome. Une augmentation et une accumulation des protéines poly-Q ubiquitinées ont été rapportées dans le cerveau post-mortem des patients MMJ (118). L'expansion de poly-Q dans la protéine ATXN3 peut provoquer une série de complications, incluant une perte de fonction de la protéine ATXN3 native, impliquée dans les voies de PQC, entraîner une surcharge de la voie UPS, perturber les fonctions normales de cette voie et également, séquestrer les régulateurs clés, les sous-unités ubiquitine et protéasomale, de la voie UPS dans les agrégats ATXN3 mutants. En effet, plusieurs études confirment la présence de protéines du complexe protéasomal et d'autres protéines, comme celles impliquées pour le transport vers le protéasome, dans des inclusions nucléaires et des agrégats ATXN3 mutants dans le cerveau des patients et des modèles de souris transgéniques MMJ (51,259,285-288). Par conséquent, des altérations et des perturbations au niveau de la voie UPS contribuent à l'accumulation des protéines polyubiquitinées dans le système et au développement de la MMJ (118,259). Lorsque la voie UPS est perturbée, cela peut également affecter et provoquer des effets indirects sur plusieurs autres aspects de la voie du système ubiquitine, comme la localisation subcellulaire, l'activation enzymatique, les voies autophagiques, les interactions protéine-protéine et la réparation de l'ADN. Par conséquent, la perturbation de l'homéostasie de l'ubiquitine, à cause de l'expansion de poly-Q dans la protéine ATXN3 mutante, ne se limite pas seulement à une altération de la voie UPS, mais plutôt à une possible propagation sur plusieurs aspects du système de signalisation ubiquitine (20).

Cibler chacune des voies impliquées dans le système de PQC représente des approches thérapeutiques prometteuses pour la MMJ et les autres maladies à expansion de poly-Q. Que ça soit l'autophagie, l'UPS ou les chaperonnes moléculaires, ce sont toutes des stratégies potentielles à entreprendre pour prévenir l'agrégation protéique et la progression de la maladie en augmentant leur activité. Tout comme les approches suggérées pour l'autophagie, pour la voie UPS aussi, il est possible de la réguler d'après des méthodes génétiques ou chimiques, par des composés. Une des approches proposées pour la voie UPS consiste à effectuer une surexpression des protéines impliquées dans cette voie afin d'augmenter le niveau de l'ubiquitination et de la dégradation (289-291). En effet, par cette approche, il a été possible d'augmenter le niveau de l'ubiquitination et de la dégradation de la protéine ATXN3 mutante, et de diminuer la neurodégénérescence, l'agrégation et la mort cellulaire dans les modèles MMJ à l'étude (289-

291). Cependant, comme la voie UPS est une voie de dégradation protéique générale et peut avoir des effets indirects sur d'autres aspects de la voie du système ubiquitine, une régulation à la hausse de cette voie peut devenir problématique à long terme. En effet, elle peut causer une élimination non spécifique d'autres protéines, et par conséquent, entraîner une altération des fonctions cellulaires normales jusqu'à être délétères. Par conséquent, des expériences supplémentaires quant aux effets d'une régulation à la hausse de cette voie sur les autres aspects du système sont nécessaires en essais précliniques avant de passer possiblement en essais cliniques (143).

Outre l'approche génétique, il est aussi possible d'activer la voie UPS par une approche chimique en utilisant divers composés tels que, entre autres, l'inhibiteur de la rho kinase (H1152), le catalpole, la puérarine et la daidzéine, afin d'augmenter la dégradation et la clairance de la protéine ATXN3 mutante par cette voie (199,292). Il est également possible d'activer cette voie par l'utilisation de composés agonistes des récepteurs de l'adénosine A2A, étant des récepteurs du système adénoenergique provoquant une activation du système UPS par la voie de signalisation AMPK. En effet, par cette approche, il a été possible d'observer une diminution de la mort neuronale, de l'agrégation protéique et des symptômes ataxiques suite à une augmentation de l'activité du protéasome dans les modèles transgéniques de souris MMJ, proposant ainsi le système adénoenergique comme une cible thérapeutique potentielle (293).

Supprimer les agrégats protéiques ATXN3 mutants du système par une activation des voies autophagiques et UPS semble être toutes deux des stratégies potentielles, prometteuses et bénéfiques à entreprendre pour contrer la pathologie de la MMJ.

#### *1.2.3.2.3. Chaperons*

Les protéines à choc thermique (« *Heat Shock Protein* », HSP) sont des chaperons moléculaires qui possèdent un rôle protecteur pour les protéines poly-Q à les replier et à augmenter leur dégradation. Il a également été démontré qu'une régulation et une modulation des chaperons dans le système peuvent provoquer une diminution des caractéristiques associées à la MMJ, incluant l'agrégation protéique et la formation des inclusions, en repliant et en désagrégeant la protéine ATXN3 mutante et/ou en augmentant l'homéostasie protéique (115,294). De plus, des études soutiennent un lien entre les chaperons impliqués dans la MMJ et

le système de l'autophagie-lysosome (295). En effet, les trois principaux systèmes de PQC sont étroitement liés ensemble, et par conséquent, ils peuvent chacun s'influencer.

Une réduction du niveau d'expression de certaines chaperons moléculaires, dont DNAJB (« *DnaJ Heat Shock Protein Family [Hsp40]* ») et HSP70, a été rapportée dans les fibroblastes des patients atteints de la MMJ à apparition précoce, proposant la déficience au niveau des chaperons comme étant une des causes de l'agrégation protéique dans la MMJ (296).

Plusieurs études soutiennent un lien entre la MMJ et plusieurs chaperons moléculaires, telles que HSP40 (« *Heat Shock Protein* », HSP), HSP70, HSPB7 (« *Small Heat Shock Protein Family B Member 7* »), HSPB8-BAG3, DNAJC8 (« *DnaJ Heat Shock Protein Family [Hsp40] Member C8* ») et DNAJB6 (« *DnaJ Heat Shock Protein Family [Hsp40] Member B6* »), considérant ces chaperons comme étant des régulateurs potentiels pour l'agrégation protéique (197,294,296-302).

Comme approches thérapeutiques, pour replier la protéine ATXN3 mutante afin de réduire son agrégation et la formation des inclusions, il est possible de réguler et de moduler les chaperons de façon génétique ou pharmacologique, par l'utilisation de composés spécifiques, incluant entre autres des activateurs de HSP70 ou des inhibiteurs de HSP90 (115,199,294,303). Ces inhibiteurs ont démontré leur fonction thérapeutique à partir d'un mécanisme dépendant à HSF1 (« *heat shock transcription factor 1* ») dans la MMJ (303). Cependant, des expériences supplémentaires en essais précliniques sont encore nécessaires afin de déterminer l'utilité et l'efficacité thérapeutique des traitements avec les chaperons quant à la suppression de l'agrégation protéique sur la pathologie de la MMJ avant de les évaluer en essais cliniques.

#### *1.2.3.2.4. Système sérotoninergique*

Lorsqu'un stress protéotoxique se produit, à cause de l'expansion de poly-Q dans la protéine, une communication doit se faire entre les cellules neuronales et les tissus distaux afin de les informer de la présence d'une anomalie dans le système. Cette communication est effectuée entre autres par la libération de la sérotonine par les neurones sérotoninergiques, contribuant ainsi à la régulation de l'homéostasie protéique (198,304). Ceci dit, il est donc possible de moduler l'homéostasie protéique dans la MMJ par l'activation de la signalisation sérotoninergique. Entre autres, dans une étude effectuée sur un modèle transgénique de *C. elegans* MMJ, suite à un

criblage de modulateurs de neurotransmission et des molécules pharmacologiques, un rôle potentiel et prometteur à diminuer considérablement les agrégats insolubles et à améliorer le défaut moteur pour les agents sérotoninergiques a été identifié (12). Parmi les molécules identifiées, le citalopram, un inhibiteur sélectif du recapture de la sérotonine, a été le composé le plus efficace à restaurer la dysfonction neuronale et l'agrégation protéique observées chez les vers mutants (12). La potentialité de ce composé pour la MMJ a ensuite été confirmée dans un modèle transgénique de souris MMJ, favorisant une réduction significative de l'agrégation protéique, des inclusions neuronales et des astroglioses, des anomalies neuropathologiques et une amélioration du déficit moteur suite à leur traitement (305). De plus, dans une autre étude effectuée sur un modèle transgénique de *C. elegans* MMJ, un traitement chronique et aigu avec un agoniste hautement spécifique du récepteur de sérotonine 5-HT1A, le béfiradole, s'est avéré bénéfique à réduire la protéotoxicité, l'agrégation et le déficit moteur causés par l'expansion de poly-Q dans la protéine ATXN3 (198). Contrairement au composé tandospirone, un agoniste partiel du récepteur 5-HT1A, ayant démontré un effet limité au traitement aigu et nécessitant l'activation supplémentaire d'autres récepteurs de sérotonine lors d'une administration chronique, le composé béfiradole a démontré une sélectivité élevée pour l'orthologue du récepteur 5-HT1A chez *C. elegans* (SER-4), et un effet thérapeutique prometteur dans le modèle MMJ à l'étude (198). Ces études proposent ainsi la modulation du système sérotoninergique comme étant une cible thérapeutique prometteuse et potentielle pour le traitement de la MMJ. De plus, elles suggèrent l'homéostasie protéique comme étant le lien entre la signalisation sérotoninergique et la neurodégénérescence dans la MMJ (12,198,305).

#### **1.2.4. Prévenir l'apoptose et améliorer le processus de la réparation de l'ADN endommagé**

Par son activité DUB, la protéine ATXN3 native peut désubiquitiner et stabiliser la protéine p53, un suppresseur de tumeur et un facteur de transcription impliqué dans de nombreux processus cellulaires, particulièrement dans la mort cellulaire apoptotique (306). Cependant, lors d'une expansion de poly-Q dans cette protéine, il y a une augmentation de cette activité DUB et donc une amplification de la stabilité et de l'activité proapoptotique de p53 (185,307). Par conséquent, il a été démontré que ceci provoque une plus sévère neurodégénérescence dépendante de p53 dans les modèles de poissons-zèbres et de souris transgéniques MMJ, supportant ainsi son implication dans la pathologie de la MMJ (185). De plus, il a été démontré

qu'en cas de MMJ, en raison de l'augmentation de l'activité transcriptionnelle de p53, il y a aussi une augmentation de l'expression de la protéine régulatrice proapoptotique Bax (« *Bcl-2-associated X protein* ») dans les neurones cérébelleux et les noyaux pontins cultivés (308). Il a également été démontré qu'il y a une activation des voies proapoptotiques dépendantes de p53 et PKC $\delta$  (la protéine kinase C delta), lorsqu'une déficience est causée dans le processus de la réparation d'ADN endommagé suite à une expansion de poly-Q dans la protéine ATXN3. En effet, cette expansion entraîne une inhibition de l'activité phosphatase de PNKP, enzyme ayant un rôle essentiel quant à la réparation d'ADN endommagé, conduisant à une accumulation des cassures des brins d'ADN endommagés, et à une activation chronique de la protéine kinase ATM (« *ataxia telangiectasia mutated* »), kinase impliquée dans la réponse aux dommages à l'ADN, et à l'activation des voies proapoptotiques. Ces perturbations sont responsables de la dysfonction et de la mort neuronale rapportées en cas de MMJ (181,184).

Comme stratégie thérapeutique, il est possible d'inhiber l'activité proapoptotique de p53 et de réduire sa stabilité en utilisant un inhibiteur qui lui est spécifique, comme la pifithrine- $\alpha$ . En effet, dans une étude effectuée sur les souris transgéniques MMJ, une réduction importante de la mort neuronale et de la neurodégénérescence a été observée suite à leur traitement avec ce composé, proposant ainsi cette approche comme étant prometteuse pour la MMJ, mais aussi d'autres maladies neurodégénératives, incluant la MH et la MP (308). Pour ce qui est du processus de réparation de l'ADN endommagé, comme approche, il est entre autre possible de surexprimer PNKP, ou d'inhiber l'activité de ATM par l'utilisation d'un composé pharmacologique. En effet, dans une étude effectuée sur un modèle cellulaire de MMJ, l'utilisation des deux approches a permis une suppression de l'activation aberrante des voies proapoptotiques et une réduction de la mort cellulaire, supportant ainsi un rôle crucial pour ces deux protéines dans la dysfonction neuronale et la neurodégénérescence observées dans la MMJ (181). Également, l'inhibition de p53 est aussi une autre approche alternative possible à entreprendre pour améliorer ce processus étant perturbé en cas de MMJ.

### **1.2.5. Contrer la dérégulation transcriptionnelle**

Comme mentionné auparavant, lorsqu'il y a une expansion de poly-Q dans la protéine ATXN3, cela provoque une perturbation de ses fonctions et interactions normales, comme ses interactions avec les activateurs de la transcription, entraînant une dérégulation transcriptionnelle

(174-178). De plus, plusieurs facteurs de transcription ont été rapportés à être séquestrés et trouvés dans les inclusions nucléaires neuronales en cas de MMJ (51,179,259,260).

Afin de contrer cette dérégulation transcriptionnelle, plusieurs approches thérapeutiques ont été suggérées telles que l'utilisation des inhibiteurs d'histone désacétylase. Les histones désacétylases (HDAC) sont des enzymes qui possèdent des fonctions importantes dans l'homéostasie de l'acétylation des histones et d'autres protéines, et dans la régulation des activités cellulaires essentielles, incluant la transcription (309-311). Lorsqu'il y a un débalancement du niveau de l'acétylation et une dérégulation transcriptionnelle, cela cause des maladies neurologiques et neurodégénératives telles que les maladies à expansion de poly-Q. En effet, une expansion de poly-Q dans la protéine provoque une inhibition des facteurs de transcriptions clé au processus de l'activation de la transcription. Cela cause en revanche une altération importante de l'acétylation, un état d'hypoacétylation, et ainsi, induit une dérégulation transcriptionnelle et une toxicité cellulaire dans ces maladies (309-312). Comme traitement, l'utilisation des inhibiteurs HDAC permet une correction de cette déficience en favorisant une régulation à la hausse de l'acétylation des protéines (312). Ces inhibiteurs possèdent des propriétés neuroprotectrices, neurotrophiques et anti-inflammatoires, tout en permettant une prévention de la dysfonction et de la mort neuronale (309-311). Ils jouent donc un rôle important dans la modification de la transcription génique, entre autres, par le remodelage de la chromatine et par des changements au niveau de la structure des protéines dans les complexes de facteurs de transcription (313). Par conséquent, les inhibiteurs HDAC représentent une stratégie thérapeutique prometteuse pour les maladies neurodégénératives, incluant la MMJ. L'utilisation des inhibiteurs HDAC tels que le valproate ou le butyrate, sur des modèles MMJ, a démontré plusieurs effets bénéfiques, incluant une diminution des symptômes ataxiques, une amélioration des phénotypes neurologiques, une augmentation de la longévité, et une amélioration de la fonction locomotrice (176,312,314,315). Également, dans une étude, le valproate a été essayé sur des patients atteints de la MMJ (phase I complétée) (315). Le valproate est un médicament utilisé pour traiter l'épilepsie, la dépression bipolaire, la prévention des migraines, et plus rarement, certaines douleurs chroniques (315,316). Selon ses interactions, diverses fonctions lui sont assignées. Entre autres, il s'est montré efficace à traiter le trouble de la bipolarité par son action à augmenter la neurotransmission de l'acide gamma-aminobutyrique (GABA) par l'inhibition des enzymes impliquées dans le métabolisme des neurotransmetteurs GABA, tel que la GABA

transaminase (317). Dû à son action à inhiber les canaux sodiques voltage-dépendants et de type T, le valproate est aussi un anticonvulsivant puissant (318). Également, son utilisation s'est avérée prometteuse et bénéfique dans plusieurs maladies neurologiques et neurodégénératives, y compris les maladies à expansion de poly-Q, dû à son rôle d'inhibiteur des HDAC, par lequel, il est aussi impliqué dans la prolongation de la longévité (312,315,318). Le traitement de divers organismes modèles avec ce composé a montré une réduction de la cytotoxicité et une amélioration dans la neurogenèse, l'angiogenèse et les performances comportementales, proposant ainsi des propriétés neuroprotectrices et anti-inflammatoires pour le composé valproate (312,315,318). Ceci-dit, dans l'étude mentionnée, suite à un traitement multidose de valproate, les patients atteints de la MMJ ont démontré des améliorations dans la fonction locomotrice avec quelques effets secondaires, comme des étourdissements et une perte d'appétit. Ils proposent ce composé comme étant bénéfique et potentiel pour le traitement de la MMJ, mais également, possiblement, pour les autres maladies à expansion de poly-Q (315). Toutefois, des améliorations et des optimisations sont encore nécessaires quant à la faisabilité de cette approche avant d'être évaluée en essais cliniques en tant que traitement pour la MMJ.

### **1.2.6. Réduire le stress oxydatif et restaurer la dysfonction mitochondriale**

Du stress oxydatif et des dommages mitochondriaux ont été rapportés à être impliqués dans la pathogenèse de plusieurs maladies neurodégénératives, incluant la MA, la MP, la sclérose latérale amyotrophique (SLA) et les maladies à expansion de poly-Q (13,319-321). Le stress oxydatif est dû à un déséquilibre entre la génération des espèces réactives d'oxygène (ROS) et le système de défense biologique antioxydant permettant la détoxification de ces produits réactifs (322). Lorsqu'il y a une surproduction de ROS, cela peut entraîner une série de complications et des dommages, entre autres, dans le système mitochondrial comme des dommages à l'ADN mitochondrial, une modification de la perméabilité de sa membrane, des dommages à la chaîne respiratoire, une perturbation de son système de défense et une dérégulation de l'homéostasie calcique (321). Ces complications peuvent médier ou amplifier la dysfonction neuronale et provoquer la neurodégénérescence (321). Comme la mitochondrie possède plusieurs fonctions importantes dans les activités cellulaires, incluant la production de l'ATP (adénosine triphosphate), le maintien de l'homéostasie calcique, la régulation de la mort cellulaire programmée et la régulation du système immunitaire, une dysfonction à ce niveau est un



phénomène critique pour le développement des maladies neurologiques et le vieillissement (323-328).

Une augmentation du stress oxydatif et des altérations au niveau de la mitochondrie et des antioxydants endogènes ont été rapportées en cas de MMJ. En effet, dans une étude effectuée sur des modèles cellulaires MMJ, une augmentation du stress oxydatif, une réduction de l'activité enzymatique des antioxydants tels que la catalase, le glutathion réductase et le superoxyde dismutase, et une augmentation des dommages et des déplétions à l'ADN mitochondrial ont été observées (329). De plus, un stress oxydatif plus sévère et une capacité réduite des antioxydants, le superoxyde dismutase et le glutathion peroxydase, ont été notés dans les cellules des patients symptomatiques MMJ comparativement à celles des patients présymptomatiques ou en santé, suggérant ainsi une association directe entre le stress oxydatif et l'expression des symptômes pour la MMJ (330).

Augmenter le niveau des antioxydants afin de réduire le stress oxydatif et les dommages à l'ADN constitue à être une stratégie thérapeutique potentielle à entreprendre pour la MMJ, mais aussi pour les autres maladies à expansion de poly-Q. Comme le stress oxydatif favorise la localisation nucléaire de ATXN3, le réduire serait encore davantage pertinent, car cela permettrait aussi une réduction de l'entrée de la protéine ATXN3 dans le noyau (134). Par ailleurs, une réduction du niveau d'expression de la protéine déacétylase Sirtuin-1 (SIRT1) a été rapportée dans les modèles animaux et patients MMJ (331). La protéine SIRT1 est connue pour augmenter les fonctions mitochondriales, diminuer le stress oxydatif et réguler l'expression de plusieurs gènes antioxydants (332,333). Ceci dit, deux différentes approches ont été entreprises afin d'augmenter son expression dans des modèles de souris transgéniques MMJ : la restriction calorique et l'utilisation d'un composé activateur de SIRT1, le resvératrol. Dans les deux cas, une augmentation d'expression de SIRT1, une activation de la voie autophagique, une réduction du stress oxydatif et une amélioration du défaut moteur ont été observées dans les modèles de souris MMJ à l'étude (331). Dans une étude antérieure effectuée dans notre laboratoire, il a été possible de démontrer une réduction importante du stress oxydatif présent dans notre modèle transgénique *C. elegans* MMJ, suite à l'utilisation de composés chimiques (42). En effet, il a été possible de diminuer considérablement le stress oxydatif, le stress lié au réticulum endoplasmique (RE),

l'agrégation protéique, le défaut de la motilité et la neurodégénérescence, suite à l'utilisation de composés étant neuroprotecteurs et modulateurs du stress lié au RE (42).

### **1.2.7. Améliorer l'homéostasie calcique**

La voie calcique est une voie importante dans l'activité synaptique neuronale et surtout, au niveau des cellules Purkinje, exprimant de nombreuses protéines et enzymes dépendantes de calcium (334,335). Les cellules Purkinje sont une classe de neurones inhibiteurs GABAergiques du cortex cérébelleux possédant un rôle primordial dans la coordination, le contrôle et l'apprentissage des mouvements (336,337). Elles font également partie des neurones étant affectés en cas de MMJ. Une dérégulation de la voie calcique et une surcharge du niveau de calcium dans le système peuvent provoquer divers effets néfastes, incluant la perméabilisation mitochondriale, la production d'un stress oxydatif, la perturbation de l'organisation du cytosquelette, une activation de la calpaïne, et la mort cellulaire (338-340). En cas de MMJ, il a été rapporté que le niveau de calcium intracellulaire est modulé par les protéines ATXN3 mutantes. En effet, elles possèdent cette capacité à se lier au récepteur d'inositol 1,4,5-triphosphate de type 1 (IP<sub>3</sub>R1), canal responsable de la libération de calcium, et provoquer ainsi la potentialisation de la libération de calcium du stockage du RE, résultant en une dérégulation et une perturbation de l'homéostasie calcique dans le système (341).

Comme stratégies thérapeutiques, il est possible de réguler la voie calcique, entre autres, par l'utilisation du dantrolène, un relaxant musculaire et un stabilisateur calcique (341). Cette approche a permis, par l'inhibition de la libération excessive du calcium intracellulaire, une amélioration de la fonction motrice et une prévention de la perte neuronale dans les noyaux pontiques et les régions du *substantia nigra* d'un modèle de souris transgéniques MMJ (341). Bien que cette étude préclinique a démontré des résultats prometteurs et que l'utilisation de ce composé n'a démontré aucun effet néfaste durant les essais cliniques pour d'autres maladies, aucun essai clinique utilisant le dantrolène comme thérapie n'a encore été entrepris pour le traitement de la MMJ. Une autre approche thérapeutique possible à entreprendre pour réguler cette voie et d'empêcher une libération excessive du calcium est une surexpression de l'anhydrase carbonique 8 (CA8) (342). En effet, dans une étude effectuée sur un modèle de souris transgéniques MMJ, une surexpression de CA8 a permis une réduction significative de ROS et des anomalies de libération de calcium (342). Cette action a été possible grâce à la fonction de

CA8 capable de se lier au récepteur IP<sub>3</sub>R1 et permettant la diminution d'affinité d'inositol 1,4,5-triphosphate (IP<sub>3</sub>) pour son récepteur (342,343). Ces approches, régulant l'homéostasie calcique, permettent une contribution quant au ralentissement de la progression de la neurodégénérescence dans la MMJ.

### 1.2.8. Réduire l'inflammation

Une régulation à la hausse de plusieurs gènes et marqueurs inflammatoires, prouvant une activation du processus de l'inflammation, a été détectée dans la pathologie de la MMJ (344-346). Entre autres, un niveau élevé des ARNm encodant pour MMP-2 («*matrix metalloproteinase-2*»), SDF1 $\alpha$  («*stromal cell-derived factor 1 alpha*») et la protéine précurseur de l'amyloïde (APP) a été observé dans un modèle cellulaire de la MMJ (344). Une expression importante de MMP2, la protéine bêta-amyloïde (A $\beta$ ) ainsi que l'antagoniste anti-inflammatoire du récepteur interleukine-1, la cytokine pro-inflammatoire interleukine-1 $\beta$  et la chimiokine pro-inflammatoire SDF1 dans les neurones pontiques, et une augmentation des astrocytes réactifs et des microglies activées dans le pons des patients atteints de la MMJ ont également été rapportés (344).

Afin de réduire et de prévenir le processus de l'inflammation dans la MMJ, la première approche qu'on pense est le traitement pharmacologique par l'utilisation de composés anti-inflammatoires. En effet, dans une étude effectuée sur un modèle de souris transgéniques MMJ, une diminution significative des marqueurs neuroinflammatoires, incluant l'interleukine-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  («*tumor necrosis factor alpha*») et IKB- $\alpha$  («*nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha*») phosphorylé, et une amélioration de la neuropathologie et de la performance motrice ont été observées suite au traitement avec l'ibuprofène, un anti-inflammatoire non stéroïdien, lui proposant ainsi un rôle neuroprotecteur dans la MMJ (347). Ce composé a aussi été évalué pour d'autres maladies neurologiques, et a démontré des effets bénéfiques et prometteurs, entre autres, pour des patients atteints d'une MA légère (348,349). De plus, les composés anti-inflammatoires peuvent être efficaces en tant que thérapies d'appoint et ils peuvent aussi être particulièrement bénéfiques au stade précoce de la maladie (197).

Comme une diminution du niveau du neuropeptide Y (NPY) a été rapportée dans le cervelet des modèles MMJ (humains et souris transgéniques), une surexpression de NPY a également été suggérée (350). Ce dernier, principalement exprimé dans le système nerveux, possède plusieurs fonctions importantes dans le système, incluant une augmentation du support trophique, une réduction de la toxicité, un effet neuroprotecteur, une régulation de l'homéostasie calcique et une réduction de la neuroinflammation dans plusieurs maladies neurologiques (351-353). Par conséquent, une surexpression de NPY dans les modèles de souris transgéniques MMJ a permis une réduction de l'agrégation de la protéine ATXN3 mutante, une amélioration des anomalies neuropathologiques et du déficit moteur, une augmentation des facteurs neurotrophiques et une diminution des marqueurs neuroinflammatoires, suggérant ainsi l'approche NPY comme une stratégie thérapeutique neuroprotectrice pour la MMJ (350).

Outre les stratégies précédentes, il est aussi possible d'effectuer une transplantation de cellules spécifiques. En effet, dans une étude réalisée sur un modèle de souris transgéniques MMJ, un remplacement cellulaire a été effectué par une injection de cellules souches neuronales dans le cervelet des souris (354). Cela a permis une amélioration significative de la performance motrice et de la neuropathologie, une réduction de la perte des cellules Purkinje, de l'agrégation et de l'expression des marqueurs pro-inflammatoires, incluant l'interleukine-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$ , et une augmentation des facteurs neurotrophiques, démontrant ainsi des effets neuroprotecteurs sur le système (354). Les cellules souches neuronales peuvent être utilisées en tant que substitut cellulaire pour diminuer la neuroinflammation, mais aussi traiter d'autres aspects de la MMJ.

### **1.2.9. Améliorer l'homéostasie neuronale**

L'expansion de poly-Q dans la protéine ATXN3 et son agrégation entraînent la dérégulation de plusieurs systèmes cellulaires provoquant entre autres une perturbation de l'homéostasie neuronale et de la fonction normale de nombreuses protéines. Par ailleurs, une altération importante des biomarqueurs neurochimiques, une perturbation dans le métabolisme de la membrane et des phospholipides de la myéline, une démyélinisation, une dysfonction et une perte neuro-axonale, une axonopathie, et une perturbation des fonctions des oligodendrocytes ont été rapportées dans plusieurs études effectuées dans divers modèles, incluant des modèles de souris transgéniques MMJ, des tissus et des cortex cérébelleux post-mortem de patients atteints de la MMJ (74,113,355-360).

Différentes molécules et voies cellulaires ont été étudiées afin de trouver des cibles neuroprotectrices améliorant le profil neuronal et pouvant aussi être utilisées en tant que traitements potentiels pour la MMJ. Entre autres, dans une étude effectuée sur un modèle de souris transgéniques MMJ, une restauration de la myélinisation du cervelet, des biomarqueurs des neurofilaments et de la pathologie neuro-axonale a été rapportée suite à un silençage du gène humain *ATXN3* mutant par ARNi (360). Il a également été démontré qu'une administration de la caféine, un antagoniste sélectif des récepteurs de l'adénosine A2A, permet une réduction de la synaptotoxicité et de la gliose, de nombreuses anomalies neuropathologiques, la perte progressive de la fonction motrice, et la préservation de l'anatomie du cervelet dans des modèles de souris transgéniques MMJ (361,362). Ces études soutiennent qu'il est possible d'améliorer l'homéostasie neuronale par une approche génétique ou par l'utilisation d'un composé spécifique, proposant ces approches comme étant des traitements potentiels pour la MMJ.

Parmi les différentes approches thérapeutiques proposées, la thérapie génique, la modulation du système sérotoninergique, tel que le traitement avec le composé citalopram, l'utilisation de molécules induisant la dégradation autophagique ou par la voie UPS, semblent être les cibles thérapeutiques les plus prometteuses pour le traitement des patients atteints de la MMJ. Toutefois, il est à noter que, même si ces traitements semblent être prometteurs, aucun ne s'est encore démontré efficace à contrer cette maladie. Par conséquent, la nécessité à développer et à découvrir de nouvelles stratégies thérapeutiques est essentielle pour la MMJ, d'où la rationalité de la conduite des projets de cette thèse.

## 1.3. Organismes modèles

### 1.3.1. *C. elegans* - Modèle génétique à l'étude

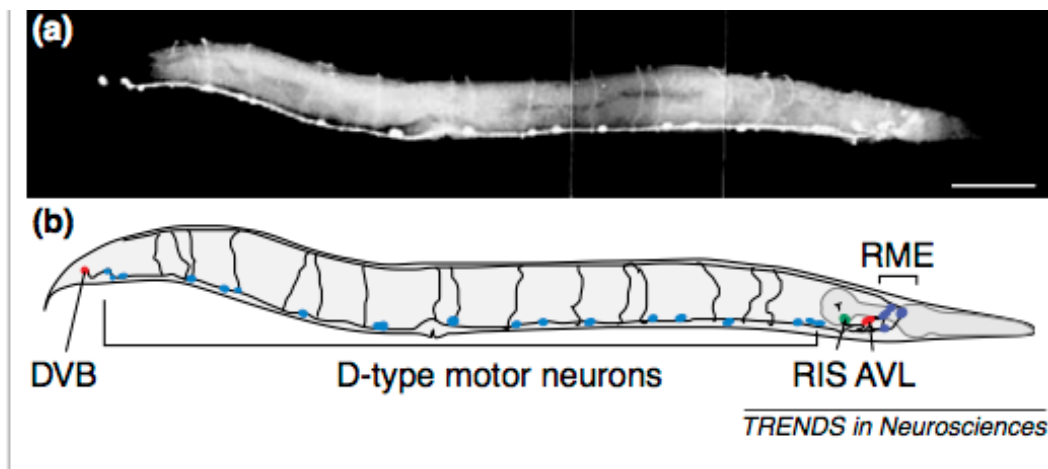
#### 1.3.1.1. Origine et caractéristiques

L'espèce *Caenorhabditis elegans* a été décrite pour la première fois en 1900 suite à ce qu'un botaniste, Émile Maupas, s'est intéressé au mode de reproduction hermaphrodite de cette espèce (363). Par la suite, le biologiste Sydney Brenner était à la recherche d'une espèce facile à maintenir et à visualiser avec une génétique facile à tracer pour isoler des mutants et effectuer des croisements tout en étant capable de réaliser des études génétiques du développement et du système nerveux. C'est alors, au début des années 1960, que cette espèce est devenue un organisme modèle, suite à son utilisation, par Sydney Brenner, pour l'étude de divers systèmes biologiques, incluant le système nerveux (363).

Le ver *C. elegans*, un nématode d'environ un millimètre de long, est un organisme modèle possédant plusieurs avantages, dont, entre autres, sa maintenance facile, sa courte durée de vie (environ quatre semaines), son développement génétique invariable, et sa transparence. Grâce à ce dernier caractère, il permet l'utilisation de protéines fluorescentes *in vivo*, sans marquages successifs, permettant une visualisation facile de sa morphologie et de ses lignées neuronales. Il possède un temps de génération assez rapide, étant entre deux et trois jours. La plupart des *C. elegans* sont des hermaphrodites. En effet, la fréquence d'obtention d'un mâle est d'environ 0,1 %. Chacune des hermaphrodites est capable de produire environ 200 à 300 progénitures, permettant ainsi aux chercheurs des analyses statistiques rapides (364). Il possède des stades de développement bien précis, quatre stades larvaires (L1 au L4) et un stade adulte. Aussi, près d'environ 80 % des gènes du ver possèdent un homologue chez l'humain, démontrant un profil génétique conservé avec les gènes humains (365). De plus, c'est un modèle peu coûteux et facilement accessible et abordable.

Il s'agit d'un modèle génétique simple particulièrement bien adapté pour les études neurologiques grâce à la grande similarité existante entre les neurones et l'interconnectivité des synapses des vers *C. elegans* et ceux des vertébrés aux niveaux moléculaire et cellulaire. Le système nerveux de cet organisme est bien développé. Il possède 56 cellules gliales et 302

cellules neuronales au stade adulte, dont 26 sont des neurones moteurs GABAergiques (**Figure 1.6**) (366). Les neurotransmetteurs critiques impliqués dans la locomotion pour le *C. elegans* sont le GABA (acide gamma-aminobutyrique), avec un rôle inhibiteur, et l'acétylcholine, un excitateur. En effet, le système locomoteur de ce modèle est principalement contrôlé par la corde neurale ventrale, où les neurones cholinergiques sont responsables d'une contraction musculaire unilatérale, et l'activation des neurones inhibiteurs de type GABAergique, responsable des contractions musculaires controlatérales, permettant ainsi la propagation du signal électrique pour le mouvement des vers (367,368).



**Figure 1.6 : Neurones GABAergiques du nématode *C. elegans* (369).**

Image fluorescente en (a) et schématisation en (b) des 26 neurones GABAergiques de *C. elegans* au stade adulte. Ces neurones parviennent à contrôler la motricité des vers en inhibant l'activité des neurones cholinergiques. Une dysfonction au niveau des neurones GABAergiques entraîne donc des troubles moteurs et un défaut de motilité. Tiré de Schuske, K., *Trends Neurosci.*, 2004.

De ce fait, à la suite de toutes les particularités mentionnées précédemment, cela renforce davantage l'utilisation de ce nématode comme un organisme modèle pour des études génétiques et neurologiques. Pour cette thèse, le nématode *C. elegans* a été considéré comme étant le modèle de choix pour étudier et caractériser la pathologie de la MMJ.

### 1.3.1.2. *C. elegans* et *ATXN3*

L'orthologue du gène *ATXN3* humain est *atx-3* chez le nématode *C. elegans*. Il représente 38 % d'identité et 56 % de similarité (112). Il encode la protéine ATX-3, ayant un poids

moléculaire équivalent à celui suggéré pour la protéine humaine, étant de 42 kDa. La protéine ATX-3 de *C. elegans*, tout comme son orthologue chez l'humain, possède une activité DUB contre les chaînes polyubiquitinées (112). Elle possède de nombreuses interactions en commun avec celles existant chez l'humain, comme son interaction avec les homologues de VCP/p97, CDC-48.1 et CDC-48.2 (370,371). Le *knock-out* (KO) de ce gène dans les vers n'a démontré ni un phénotype particulier associé à la MMJ, ni un défaut de locomotion ou une neurodégénérescence significative. Cependant, une dérégulation des gènes impliqués dans la voie de l'UPS, de la transduction de signal, de la structure cellulaire et de la motilité a été observée (112). Il a également été rapporté que les vers KO pour ataxin-3 présentent une meilleure réponse au stress et survivent mieux aux conditions de choc thermique que les vers sauvages (372). Ceci est dû à l'activation de DAF-16/FOXO («*forkhead box protein*»), facteur de transcription impliqué dans la longévité et la résistance au stress, provoquant une surexpression des chaperons moléculaires spécifiques permettant ainsi une meilleure thermotolérance et capacité pour ces vers à envisager des stimuli nocifs (372).

### **1.3.1.3. Modèles *C. elegans* pour la MMJ**

Afin de pouvoir étudier la pathologie de la MMJ dans les vers, des constructions transgéniques, exprimant soit le fragment C-terminal ou la longueur complète *ATXN3*, avec différentes longueurs de répétitions, pathogéniques/mutants (à partir de ~ 60 répétitions de CAG et plus) et non pathogéniques/sauvages (jusqu'à ~ 30 répétitions de CAG), ont été développées (**Tableau II**) (373). Les modèles transgéniques exprimant la longueur complète *ATXN3* humain pathogénique ont démontré un défaut de motilité, une longévité réduite, une neurodégénérescence, une dysfonction neuronale et une agrégation protéique (42,374-376). Pour ce qui est de nos souches transgéniques générées pour étudier la pathologie de la MMJ, nous avons exprimé la longueur complète de l'ADN complémentaire de *ATXN3* humain dans les neurones GABAergiques des vers sous le promoteur *unc-47*. La souche transgénique mutante *ATXN3-CAG89* a démontré un défaut de motilité, une neurodégénérescence, une longévité réduite, du stress oxydatif, une activation de la réponse au stress du réticulum endoplasmique, et une agrégation protéique importante, lorsque comparée avec la souche non pathogénique *ATXN3-CAG10* (**Tableau II**) (42). Pour les modèles exprimant le fragment C-terminal *ATXN3* pathogénique, un défaut de motilité, une interruption de la transmission synaptique, un défaut de



ponte, des anomalies morphologiques, un défaut au niveau des processus neuronaux, une agrégation protéique et une dysfonction neuronale ont été rapportés (374,375,377). Les vers mutants exprimant le fragment C-terminal ATXN3 présentent des phénotypes plus sévères que ceux exprimant la longueur complète de la protéine à cause de, entre autres, leur propriété d'être plus susceptible de s'agréger (375). Il est à prendre en considération que selon le promoteur de gène utilisé, du type d'isoforme, la taille de l'expansion de poly-Q et les cellules où la protéine est exprimée dans les vers, les phénotypes observés et leur intensité varient dans diverses études (373).

**Tableau II :** Les modèles transgéniques *C. elegans* pour la MMJ (373). Inspiré et adapté de Schmidt, J., *Adv Exp Med Biol.*, 2018.

Construction	Promoteur et Étiquette	Longueur complète ATXN3/ Fragment C-terminal	Phénotypes	Réf.
MJD1-17Q-GFP MJD1-91Q-GFP MJD1-130Q-GFP	<i>unc-119</i> (pan-neuronal)  GFP (C-terminal)	Longueur complète	- MJD1-17Q-GFP et MJD1-91Q-GFP : expression diffuse dans les corps cellulaires.  - MJD1-130Q-GFP : agrégation protéique à partir du jour six adulte, défaut de motilité, léthargie, longévité réduite.	(374)
19Q-GFP 33Q-GFP 63Q-GFP 127Q-GFP	<i>unc-119</i> (pan-neuronal)  GFP (C-terminal)	Fragment C-terminal	- 19Q-GFP et 33Q-GFP : expression diffuse dans les corps cellulaires et les processus neuronaux.  - 63Q-GFP : agrégation protéique dans quelques neurones.  - 127Q-GFP : agrégation protéique dans la majorité des neurones, 80% des embryons restent non éclos, interruption de la transmission synaptique, dysfonction neuronale, défaut de motilité, anomalies morphologiques, défaut au niveau de la ponte, branchement collatéral anormal	(374)

			dans 70% des vers au stade adulte (jour sept adulte et plus), défaut au niveau des processus neuronaux.	
19Q-GFP/Ub-dsRed 127Q-GFP/Ub-dsRed	<i>unc-47</i> (neurones GABAergiques)  GFP et RFP (C-terminal)	Fragment C-terminal	Fluorescence rouge vif dans 94% des vers 127Q-GFP/Ub-dsRed avec une agrégation protéique, confirmant une altération au niveau de la voie UPS.	(374)
AT3q14 AT3q75 AT3q130	F23B3.3 (pan-neuronal)  YFP (C-terminal)	Longueur complète	- AT3q14 et AT3q75 : expression diffuse dans les corps cellulaires et les processus neuronaux. Dysfonction neuronale dans la lignée AT3q75.  - AT3q130 : formation des foci surtout au niveau des neurones des cordes nerveuses ventrale et dorsale et dans certains neurones latéraux, agrégation protéique dans des neurones spécifiques, agrégation augmente avec l'âge, dysfonction neuronale plus importante que AT3q75, défaut moteur, réduction légère de l'indice chimiotactisme.	(375)
257cAT3q14 257cAT3q75 257cAT3q80 257cAT3q128	F23B3.3 (pan-neuronal)  YFP (C-terminal)	Fragment C-terminal	- 257cAT3q14 : suit un modèle d'expression diffuse.  - 257cAT3q75 et 257cAT3q80: expression diffuse dans les corps cellulaires, formation de punctas dans certains neurones, agrégation protéique dans les vers à partir du jour deux adulte, agrégation augmente avec l'âge, dysfonction neuronale. La lignée 257cAT3q75 a démontré une réduction significative de l'indice chimiotactisme.  - 257cAT3q128 : formation des foci dans divers corps cellulaires du système nerveux, plus petit et léthargique que les vers de la lignée AT3q130, agrégation protéique, dysfonction neuronale plus prononcée que pour les lignées	(375)

			257cAT3q75 et 257cAT3q80.	
AT3CT(Q45) AT3CT(Q63)	<i>unc-54</i> (muscles de la paroi corporelle)  YFP (C-terminal)	Fragment C-terminal	Dysfonction cellulaire, agrégation protéique et toxicité dans les cellules musculaires dépendantes de la longueur de l'expansion poly-Q, mais indépendantes de l'âge.	(377)
AT3Q17-GFP AT3Q130-GFP	<i>unc-119</i> (pan-neruonal)  GFP (C-terminal)	Longueur complète	AT3Q130 : défaut de motilité, agrégation protéique.	(376)
ATXN3-CAG10 ATXN3-CAG89  **Nos modèles transgéniques**	<i>unc-47</i> (neurones GABAergiques)  Pas d'étiquette	Longueur complète	ATXN3-CAG89 : défaut de motilité, neurodégénérescence, longévité réduite, agrégation protéique.	(42)

#### 1.3.1.4. Développement de nos modèles *C. elegans* pour la MMJ

Pour étudier la MMJ et caractériser le gène causatif associé à cette pathologie, *ATXN3*, deux souches transgéniques *C. elegans* ont été générées : [*unc-119(ed3)*; ttTi5605mosII; *xqIs350(unc-47p::ATXN3-CAG10; unc-119(+))*] et [*unc-119(ed3)*; ttTi5605mosII; *xqIs351(unc-47p::ATXN3-CAG89; unc-119(+))*]. La première souche, *ATXN3-CAG10*, désigne la forme non pathogénique/sauvage (avec 10 répétitions de CAG), et la deuxième, *ATXN3-CAG89*, la forme pathogénique/mutante (avec 89 répétitions de CAG) des vers transgéniques MMJ. Comme la MMJ est également associée avec une dégénérescence des motoneurons, nous avons exprimé la longueur complète de l'ADN complémentaire de *ATXN3* humain non étiquetée, sauvage ou mutante, dans les 26 neurones GABAergiques du nématode, sous le promoteur *unc-47*, par la méthode de MosSCI (« *Mos1-mediated Single Copy Insertion* ») (42,90,378-382). Le principe de cette méthode consiste à casser un chromosome à un endroit spécifique, par l'excision d'un transposon *Mos1*, à créer une rupture d'ADN double brin, et enfin, en présence d'une matrice d'ADN avec une homologie au point de rupture, introduire l'ADN de la matrice dans le génome par le processus de la réparation (42,378). Afin d'identifier les insertions dans le chromosome, un marqueur de sélection positive, (*unc-119(+)*), et pour les variations extrachromosomiques, un

marqueur fluorescent, ont été utilisés (42,378). Plusieurs lignées ont été développées pour chaque transgène. Ceux démontrant des niveaux d'expression du transgène et des profils moléculaires similaires ont été isolés pour des futures analyses. L'expression de la protéine a été confirmée par immunobuvardage, et le nombre de répétitions des trinuécléotides par séquençage.

### **1.3.1.5. Criblages et *C. elegans***

#### *1.3.1.5.1. Généralités*

Le nématode *C. elegans* est un très bon modèle à utiliser pour des criblages, y compris les criblages pharmacologiques ou génétiques, et ce, pour plusieurs raisons, incluant sa capacité à modéliser les maladies humaines complexes, la possibilité de simultanément évaluer l'efficacité et les propriétés d'un composé spécifique (absorption, distribution, métabolisme, excrétion et toxicité) suite à son traitement, et la possibilité d'évaluer et d'investiguer plusieurs phénotypes d'intérêt (12,383-393). Entre autres, le criblage est un outil efficace permettant l'évaluation de divers phénotypes chez le modèle *C. elegans*, incluant la locomotion, la longévité, la morphologie, le comportement, la réponse neuronale aux stimuli, et l'activité électrophysiologique (392,394). En milieu liquide, le ver *C. elegans* a également un comportement de nage stéréotypé avec une grande activité de la jonction neuromusculaire et une fonction des muscles de la paroi corporelle à un niveau élevé, renforçant davantage son efficacité pour ce type de criblage (383,387-389). Son emploi comme organisme modèle pour des approches de criblages permet donc l'identification rapide des gènes, des composés, leurs cibles, des mécanismes, et des voies de signalisation en jeu pour une maladie d'intérêt.

Le criblage pharmacologique, employé pour le projet principal de cette thèse, permet l'identification rapide des molécules protectrices. Par celles-ci, il est ensuite possible à déterminer des voies de signalisation et des mécanismes associées à la maladie d'intérêt, favorisant ainsi éventuellement le développement des stratégies thérapeutiques efficaces et bénéfiques quant au traitement des patients atteints de cette pathologie (12,383-393).

Pour ce qui est du criblage génétique à base d'ARNi, celui-ci est une approche efficace permettant une identification rapide des gènes impliqués dans une maladie, et par leurs biais, les voies de signalisation et les mécanismes en jeu. Le modèle *C. elegans* est entre autres un des rares organismes par lesquels des criblages d'ARNi à l'échelle du génome sont possibles,

résultant en un modèle et une approche bénéfiques pour l'identification des gènes impliqués dans des processus biologiques et des conditions pathologiques.

#### *1.3.1.5.2. Système de criblage utilisé*

Les criblages pharmacologiques et des modificateurs génétiques, en milieu liquide, ont tous les deux été effectués à partir de la machine WMicroTracker (Phylum Tech) (395). Il s'agit d'un système de vision par ordinateur en temps réel permettant de quantifier automatiquement le mouvement des vers placés dans une plaque de microtitration de 96 puits pendant plusieurs heures. Elle possède deux faisceaux de lumière infrarouge traversant chacun les puits de haut en bas, et un détecteur déterminant la fréquence à laquelle les rayons lumineux sont interrompus par les vers dans les puits. Chaque interruption compte comme un mouvement enregistré par la machine pour une période fixe. Comme toute autre méthode, elle possède des avantages, mais aussi, quelques limites qu'il est important à considérer lors de son emploi.

#### **1.3.1.6. Facteurs de transcription chez *C. elegans***

##### *1.3.1.6.1. Généralités*

Les facteurs de transcription (FT) sont des protéines de liaison à l'ADN à séquence spécifique étant impliqués dans le contrôle de l'expression génique et dans la régulation des processus biologiques bien particuliers, dont la différenciation, la structuration tissulaire, le cycle cellulaire, les voies métaboliques, le signal de transduction, le développement, et les réponses aux stimuli environnementaux (396-400). De nombreux FT ont été identifiés dans le modèle *C. elegans* à partir de diverses méthodes telles que des combinaisons de génétique, des criblages moléculaires et des projets de séquençage génomique. Cet organisme modèle possède diverses familles de FT, principalement les doigts de zinc, les récepteurs d'hormones nucléaires (NHR), les homéodomaines, les *forkhead*, les motifs hélice-boucle-hélice (bHLH, « *Basic helix-loop-helix* »), les bZIP (« *basic leucine zipper* »), et les T-box (401,402).

La famille des FT à doigt de zinc est la plus grande famille des FT de liaison à l'ADN chez les eucaryotes. Même si la majorité des protéines contiennent des domaines uniques à doigt de zinc, afin d'obtenir une liaison à haute affinité avec l'ADN, deux doigts de zinc à proximité sont favorables (403). Le motif à doigt de zinc contient un domaine de protéine utilisant un ou plusieurs ions de zinc afin de stabiliser sa structure. La majorité de ces FT sont impliqués dans la

liaison avec l'ADN ou dans les interactions protéine-protéine (404). Les protéines contenant ce motif possèdent des fonctions dans la transcription génique, la traduction, le trafic de l'ARNm, l'organisation du cytosquelette, l'adhésion cellulaire, le repliement des protéines, et le remodelage de la chromatine. Les FT ont des structures stables qui subissent rarement des changements conformationnels pour se lier à leur cible (405).

Le génome de *C. elegans* encode pour un nombre important de NHR, beaucoup plus élevé que ce qui est encodé chez l'humain (401). Il est prédit que les NHR agissent plutôt en tant que capteurs environnementaux, expliquant entre autres, en partie, leur nombre élevé dans ce modèle (406,407). Ces FT sont généralement régulés par des hormones lipophiles permettant par conséquent la coordination du métabolisme, du développement et de l'homéostasie. Entre autres, ils possèdent aussi des fonctions importantes dans la régulation du cycle biologique, la progression des cellules souches, le processus du développement, la spécification cellulaire, la détection des nutriments, la longévité, et le développement et l'identité neuronale (408). Au niveau structurel, chacune de ses deux régions de la coordination de zinc chevauche les domaines hélicoïdaux, pliés en une grande structure globulaire, et la liaison à l'ADN se fait, suite aux contacts avec l'aminoterminal de l'hélice  $\alpha$ , dans un sillon principal (409). Étant donné la grande variation existant dans l'hélice de reconnaissance, les FT faisant partie des familles NHR, doigt de zinc et bHLH, possèdent une diversification importante quant aux spécificités de liaison à l'ADN, permettant ainsi à la majorité d'entre eux la reconnaissance de nouveaux motifs (410).

Les membres de la famille des FT avec un homéodomaine possèdent un domaine de liaison à l'ADN à hélice-tour-hélice de 60 acides aminés. L'homéodomaine est très hautement conservé et se compose de trois régions hélicoïdales pliées en une structure globulaire liant un motif central. L'hélice de reconnaissance de l'homéodomaine lie le sillon principal de l'ADN, et sa partie amino-terminale entre en contact avec le sillon mineur de l'ADN. Les FT sont impliqués dans la régulation de l'expression génique et dans la différenciation cellulaire lors du développement embryonnaire précoce. Leur expression est également importante pour le modelage et le développement normal des membres temporo-spatiaux (411).

Le génome du *C. elegans* encode pour 15 facteurs de transcriptions *forkhead* (412). Ils sont impliqués dans le contrôle des processus du développement et possèdent une fonction importante dans l'expression des gènes impliqués dans la croissance cellulaire, la prolifération, la

différenciation et la longévité. Certains possèdent également des fonctions dans le développement embryonnaire (413,414). La liaison à l'ADN pour ces FT est possible suite à la formation d'un motif, connu en tant qu'hélice ailée (« *winged helix* ») en raison de son caractère papillon des boucles dans la structure protéique du domaine, d'après leur boîte de *forkhead* (415).

Concernant la famille des FT avec une structure bHLH, ils sont plutôt importants dans des processus développementaux, incluant la neurogenèse, la myogenèse, et la spécification et la différenciation cellulaire (416). Ils sont caractérisés par deux hélices  $\alpha$  reliées par une petite boucle. Les FT avec ce motif sont généralement dimériques. En général, l'une des deux hélices, la plus petite, permet la dimérisation, et la plus grande, la liaison à l'ADN (417).

Les FT avec un domaine bZIP ont des rôles importants dans la prolifération cellulaire, la différenciation et les réponses aux stress. Dans le système nerveux, plusieurs isoformes de ces protéines possèdent une fonction dans l'apprentissage et la mémoire, la plasticité neuronale, la neuroinflammation et la régénération axonale (418). Une partie du domaine de ces FT permet la liaison à l'ADN à séquence spécifique, et l'autre partie, le zipper leucine, permet le maintien et la dimérisation des deux régions de liaison à l'ADN favorisant ainsi une interaction globale (419,420).

Quant à la famille des FT T-box, ils sont des régulateurs importants dans le processus du développement (421,422). Leur niveau d'expression est essentiel pour un fonctionnement normal (423). En effet, une altération dans leur niveau d'expression peut contribuer au développement de maladies congénitales et des cancers (421,422). Ils sont considérés comme étant des modèles d'expression dynamiques, et partagent un domaine de liaison à l'ADN unique (423). Cependant, les mécanismes d'activité de ces FT ne sont pas encore bien compris et nécessitent des recherches supplémentaires (422).

#### *1.3.1.6.2. Exemples de FT pour les familles bHLH et forkhead*

##### ***1.3.1.6.2.1. hlh-30/TFEB***

Une fonction conservée dans l'autophagie a été rapportée pour *hlh-30* (*hélice-boucle-hélice 30*), l'orthologue du gène *TFEB* humain chez *C. elegans*. Le gène *hlh-30* encode pour un facteur de transcription à liaison d'ADN, HLH-30 (424). Il a été démontré que HLH-30 parvient à réguler l'expression de plusieurs gènes associés à l'autophagie et au lysosome, tel que *lgg-1/LC3*,

*sqst-1/p62*, *imp-1/LAMP-1*, des sulphatases, des cathepsines et des sous-unités des ATPases vacuolaires, et à moduler le processus de l'autophagie, similairement à TFEB. De plus, un rôle essentiel lui a été attribué quant à la modulation de la durée de vie. Il a été rapporté qu'un KO de ce gène provoque une altération de l'autophagie et une réduction de la longévité, mais inversement, sa surexpression permet une induction de la voie autophagique et une extension de la durée de vie chez les vers *C. elegans*. Également, en condition de stress, par une inhibition de la voie mTOR, une localisation nucléaire a été observée pour HLH-30 chez *C. elegans*, tout comme pour TFEB lors d'une restriction calorique des souris, approche employée pour augmenter la durée de vie (424). Ces observations suggèrent donc un rôle conservé pour HLH-30 et TFEB dans le processus de l'autophagie, et probablement, dans la longévité (424). Il a également été démontré que HLH-30 et DAF-16 fonctionnent ensemble en tant que des facteurs de transcription combinatoires afin de favoriser la longévité et d'améliorer la résistance au stress. En effet, en situation de stress, ils se localisent dans le noyau, forment des complexes et corégulent les gènes cibles en employant la même voie et dépendent l'un de l'autre pour améliorer la longévité et la résistance au stress oxydatif. Toutefois, leurs réponses au stress thermique sont indépendantes, et ils s'opposent durant la formation du dauer (425). De plus, une autre fonction conservée a également été rapportée pour HLH-30 et TFEB, le catabolisme et le métabolisme des lipides. En effet, il a été rapporté qu'un KO de *hlh-30* cause une altération des enzymes impliquées dans le catabolisme et le métabolisme des lipides, mais inversement, sa surexpression induit leur activation, supportant ainsi leur rôle conservé pour ces voies (426,427).

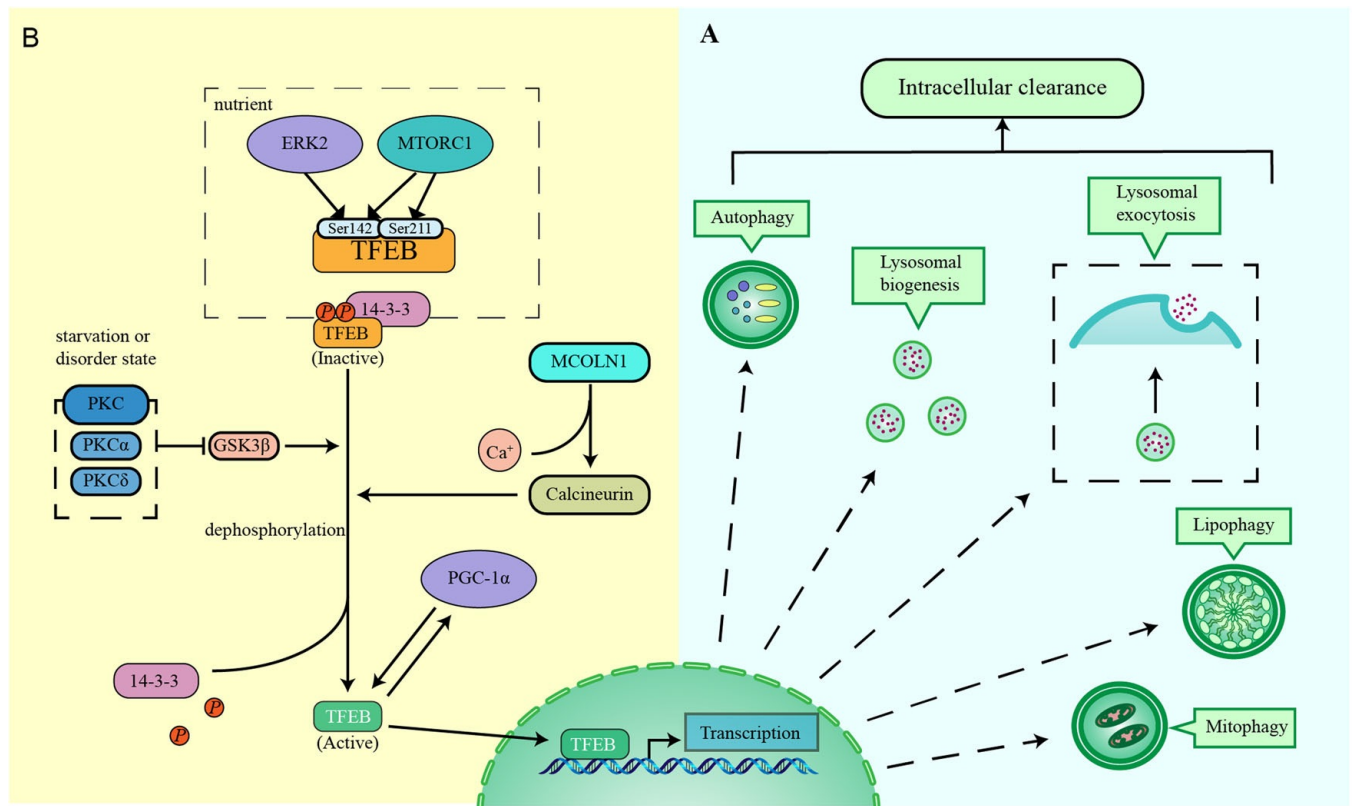
#### **1.3.1.6.2.2. TFEB**

##### *1.3.1.6.2.2.1. Fonctions*

Le facteur de transcription EB, TFEB, est une protéine hélice-boucle-hélice (bHLH), appartenant à la famille microphthalmie/facteur de transcription E (MiT/TFE), et encodé par le gène *TFEB* (428). Son rôle est essentiel dans diverses voies impliquées dans le processus de la clairance intracellulaire telles que l'autophagie, la biogenèse des lysosomes, l'exocytose et la dégradation lysosomale, la régulation de la mitophagie et de la lipophagie, et le contrôle du métabolisme énergétique (**Figure 1.7A**) (429-432). De plus, il a été rapporté que TFEB favorise l'activation de plusieurs gènes lysosomaux, en se liant directement au motif spécifique « *E box* » situé dans leur promoteur et cela permet la régulation de la fonction lysosomale. Ce réseau de



gènes est connu en tant que CLEAR (« *Coordinated Lysosomal Enhancement And Regulation* ») (430). Par ailleurs, lorsqu'il y a une activation de TFEB, cela provoque une augmentation de l'activité autophagique-lysosomale, résultant en une augmentation du nombre d'autophagosomes, de lysosomes et des enzymes lysosomales, du flux autophagique, de la dégradation protéique, et une réduction significative de la neurotoxicité et des phénotypes associés avec plusieurs maladies neurodégénératives, telles que la MP, la MA et la MH (280,428,430,433-435). Le TFEB est donc un régulateur clé de la biogenèse lysosomale et de l'autophagie. Ces derniers sont entre autres des processus importants dans les contextes du métabolisme et du vieillissement.



**Figure 1.7. Schéma des fonctions et mécanismes d'activation de TFEB (432).**

(A) Le facteur de transcription TFEB est impliqué dans divers processus tels que l'autophagie, incluant la formation des autophagosomes, la fusion des autophagosomes-lysosomes et le flux autophagique, la biogenèse lysosomale, l'exocytose et la dégradation lysosomale, le contrôle du métabolisme énergétique, et la régulation de la mitophagie et de la lipophagie. (B) Dans des conditions riches en nutriment, TFEB est localisé dans le cytosol en sa forme inactive, étant phosphorylée et liée à la protéine 14-3-3, empêchant sa translocation nucléaire. Cette phosphorylation est entretenue par mTORC1 et ERK2. Cependant, en des conditions de carence en nutriments ou de stress, TFEB est déphosphorylé et déplacé vers le noyau. Divers mécanismes peuvent provoquer cette déphosphorylation et translocation nucléaire, incluant une inhibition de mTORC1 et ERK2, les empêchant ainsi de remplir leur fonction à phosphoryler TFEB, une

activation de la phosphatase calcineurine, ou une activation de certaines isoformes de PKC en inhibant la protéine kinase GSK3 $\beta$ . Une fois déphosphorylé et activé, TFEB est déplacé vers le noyau et est lié aux gènes cibles afin d'induire leur transcription et stimuler la voie autophagique-lysosomale. Tiré de Zhang, W., *Cell Death Discov.*, 2020.

#### 1.3.1.6.2.2.2. Mécanismes impliqués dans son activation

L'activité de TFEB est contrôlée par des modifications post-traductionnelles telles que son état de phosphorylation et par des interactions protéine-protéine (428). Dans des conditions riches en nutriments, TFEB est localisé dans le cytosol en sa forme phosphorylée et inactive à la suite de la phosphorylation de ses deux résidus de sérine, Ser142 et Ser211, ayant un rôle important quant à la détermination de sa localisation subcellulaire (431,436-438). Cependant, en situation de carence en nutriments, d'un stress ou d'une dysfonction lysosomale, en partie dû à un mécanisme dépendant à mTORC1, il est déphosphorylé, activé et est déplacé vers le noyau afin de se lier aux gènes cibles et d'induire leur transcription et de stimuler les voies autophagique et lysosomale (**Figure 1.7B**) (431,432,439).

Les protéines kinases mTORC1 (« *Mechanistic target of rapamycin complex 1* ») et ERK2 (« *extracellular signal-regulated kinase 2* »), contrôleurs clés de la croissance cellulaire, sont les principales responsables de la phosphorylation de TFEB dans des conditions riches en nutriments (431,436-438). L'activation de mTORC1 se produit au niveau de la membrane lysosomale. Elle est responsable de la phosphorylation des deux résidus de sérine de la protéine TFEB, mais la phosphorylation de son résidu Ser211, en particulier, permet sa liaison à la protéine 14-3-3, empêchant sa translocation nucléaire. La protéine kinase ERK2 phosphoryle le résidu Ser142 de la protéine TFEB et assure sa translocation cytosolique. Toutefois, en condition de carence de nutriments ou de stress lysosomal, ERK2 est inhibée et mTORC1 est aussi libérée de la membrane lysosomale et devient inactive, résultant en leur incapacité de remplir leur fonction de phosphorylation et par conséquent, il y a une déphosphorylation de la protéine TFEB, son détachement de la protéine 14-3-3, et son déplacement vers le noyau en sa forme active (**Figure 1.7B**) (431,432,437,438,440-442).

En parallèle, lors d'une carence en nutriments, indépendamment de mTORC1, une libération de calcium du lysosome est déclenchée à partir de la mucopolipine 1 (MCOLN1), canal permettant au calcium de traverser la membrane lysosomale. Cela active la phosphatase

calcineurine, qui ensuite provoque la déphosphorylation et la translocation nucléaire de TFEB (**Figure 1.7B**). Lorsqu'il y a une déplétion de MCOLN1, en situation de carence en nutriments, cela provoque une inhibition de la libération du calcium lysosomal et de l'activation de la calcineurine, résultant ainsi en l'inhibition de l'activation de TFEB et de l'induction de l'autophagie (432,443,444).

Indépendamment de mTORC1, les isoformes activées de la protéine kinase C (PKC), impliquées dans la biogenèse lysosomale, peuvent également provoquer la déphosphorylation et la translocation nucléaire de la protéine TFEB. En effet, les isoformes PKC $\alpha$  et PKC $\delta$  activées, lors d'une carence en nutriments ou d'un état de trouble, elles inhibent GSK3 $\beta$  (« *Glycogen synthase kinase 3 beta* »), kinase impliquée dans la régulation traductionnelle, et mènent ainsi à l'activation de TFEB et favorisent sa localisation nucléaire (**Figure 1.7B**) (445). De plus, il existe aussi d'autres types de stress, indépendants de mTORC1, qui peuvent activer TFEB et favoriser sa translocation nucléaire, comme le stress du RE, à partir de la protéine kinase PERK, et le stress mitochondrial par la protéine ligase Parkin (446,447).

Certains régulateurs de l'activité de la protéine TFEB, tels que PGC-1 $\alpha$  (« *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha* »), modulateur principal de la biogenèse et la respiration mitochondriale, sont eux-mêmes ensuite régulés par TFEB, suggérant ainsi l'adaptation lysosomale comme étant une réponse auto-entretenue régulée par plusieurs boucles de rétroaction (427,432) (**Figure 1.7B**).

#### **1.3.1.6.2.3. *fkh-2*/FOXG1**

Le gène *fkh-2* (*forkhead 2*) est l'orthologue du gène humain *FOXG1* chez le ver *C. elegans*. Le génome de *C. elegans* encode pour 15 facteurs de transcriptions *forkhead*, incluant *fkh-1* à *fkh-10*, *daf-16*, *pes-1*, *lin-31*, *let-381* et *unc-130* (412). Bien qu'ils soient une petite famille de protéines à liaison d'ADN, ils jouent un rôle important dans le contrôle du développement par la régulation transcriptionnelle de l'expression génique (448). La redondance fonctionnelle est, entre autres, une des raisons expliquant l'impossibilité de détecter génétiquement plus de gènes *forkhead* dans le modèle *C. elegans* et le chevauchement des fonctions, entre divers *forkhead*, la cause d'une pénétrance incomplète observée dans certains phénotypes des mutants (412). Le gène *fkh-2* encode un facteur de transcription à liaison d'ADN,

FKH-2. Ce dernier est entre autres impliqué dans la différenciation neuronale et est requis pour le développement de certains neurones chimiosensoriels et certaines structures dendritiques (412). Malgré cela, les connaissances quant à ses interactions génétiques sont limitées, nécessitant une investigation plus approfondie.

#### **1.3.1.6.2.4. FOXG1**

##### *1.3.1.6.2.4.1. Fonctions et mécanismes impliqués d'après sa localisation*

*FOXG1*, appartenant à la famille des gènes *forkhead* (FOX), encode pour la protéine FOXG1 («*forkhead box G1*»). Ce dernier est un facteur de transcription nucléaire-cytosolique essentiel pour le développement du cerveau et de la stratification du cortex cérébral (449,450). En effet, il possède une fonction importante dans le développement et la réorganisation du cerveau antérieur et le laminage cortical, la formation du corps calleux, le développement du télencéphale, la migration cellulaire, et la structuration et la superposition du cortex cérébral (449-452). Il est impliqué dans la prolifération, la survie et la différenciation des neurones et d'autres types de cellules. Il favorise également le maintien de la plasticité neuronale et de l'arborisation dendritique, et son expression est essentielle pour conserver un équilibre entre les neurones inhibiteurs et excitateurs (453-459). De plus, un rôle dans l'inhibition de la mort cellulaire lui est attribué, suite à l'induction d'une apoptose dans les neurones sains lors d'une suppression de son expression (456). Une dérégulation ou des mutations de *FOXG1* entraînent plusieurs complications au niveau du système, comme une dérégulation de la différenciation des neurones inhibiteurs et excitateurs, une altération de la dendritogenèse et de la plasticité neuronale, des connexions cortico-corticales altérées, des troubles moteurs, et des anomalies au niveau du cerveau, pouvant mener au développement de diverses maladies, incluant différents types de cancer, de maladies neurodéveloppementales telles que le syndrome de Rett ou les troubles du spectre autistique, et le syndrome de *FOXG1* (457,458,460-467).

La localisation intracellulaire de FOXG1 est alternée entre le noyau et le cytoplasme (468). Il est principalement localisé dans le noyau lorsque le processus de la neurogenèse est activé, et dans le cytoplasme, lors d'une différenciation neuronale précoce (468). Dans le noyau, il se comporte plutôt en tant que répresseur transcriptionnel et cible particulièrement les facteurs de croissance des fibroblastes (FGF), l'homologue de Sonic hedgehog (Shh), et les inhibiteurs du cycle cellulaire, et dans le cytoplasme, il est un inhibiteur de TGF- $\beta$  («*transforming growth factor*

*beta*») (468,469). FOXG1 interagit avec les membres de plusieurs voies de signalisation tels que WNT, IGF (« *insulin-like growth factor* »), EGF (« *Epidermal Growth Factor* »), Shh, Hippo, Notch, SMAD et TGF- $\beta$ , et parvient ainsi à compléter ses fonctions dans la prolifération, la différenciation, la survie ou l'apoptose cellulaire, selon la situation (459).

#### *1.3.1.6.3. Facteurs de transcription impliqués dans la MMJ, identifiés par le modèle C. elegans*

De nombreuses études ont été réalisées dans divers modèles, incluant les vers *C. elegans*, quant à la détermination des FT associés à la MMJ. Entre autres, dans une étude effectuée sur un modèle transgénique de *C. elegans* MMJ, il a été démontré qu'il est possible de réduire les phénotypes associés à la MMJ, et intensifiés par le vieillissement, en modulant divers mécanismes et voies spécifiques (375). En effet, une réduction de l'agrégation et de la protéotoxicité a été observée suite à la modulation de la voie de signalisation IIS (« *insulin/insulin growth factor (IGF)-I-like signaling* ») et l'activation des facteurs de transcription HSF-1/HSF1 (« *heat shock factor-1* »), impliqué dans les réponses au stress protéotoxique et dans la longévité, et DAF-16/FOXO (375). La réduction de la voie de signalisation IIS et l'activation de HSF-1 ont permis une diminution significative de la pathogenèse et de la neurotoxicité associées à la MMJ, confirmant ainsi le lien existant entre le phénomène du vieillissement et l'agrégation protéique toxique, aussi observé pour d'autres maladies neurodégénératives (375,470-472).

Dans cette thèse, dans les chapitres suivants (les chapitres 2 et 3), deux nouveaux FT impliqués dans la MMJ ont été identifiés : HLH-30/TFEB (chapitre 2) (390) et FKH-2/FOXG1 (chapitre 3) (383). Entre autres, nous avons démontré qu'une surexpression de ces FT est neuroprotectrice en cas de MMJ, et permet une suppression de la pathogenèse et de la neurotoxicité rapportées dans notre modèle transgénique *C. elegans* MMJ.

### **1.3.2. Autres organismes modèles pour la MMJ**

Outre le modèle *C. elegans*, plusieurs autres modèles d'animaux existent pour étudier la pathologie de la MMJ tels que la drosophile, les poissons-zèbres et les souris (**Tableau III**). Les modèles de drosophile et de *C. elegans* sont plutôt des outils importants pour étudier les mécanismes pathogéniques et aussi, incluant les poissons-zèbres, pour cibler des molécules

thérapeutiques potentielles et des modificateurs génétiques. Concernant les modèles de souris, ces derniers partagent d'importantes similitudes moléculaires, anatomiques et physiologiques avec les humains, les rendant ainsi indispensables quant aux validations précliniques des approches thérapeutiques, avant de procéder aux essais cliniques. Ils sont également des outils importants quant à l'étude et à la validation des pathomécansimes en jeu pour une maladie (105,373).

Afin de pouvoir simuler les aspects cliniques et moléculaires généraux et d'étudier la pathogenèse de la MMJ, plusieurs modèles d'animaux transgéniques ont été générés (**Tableaux II-III**). Dans le tableau suivant, des modèles transgéniques de la MMJ pour la drosophile, les poissons-zèbres et les souris, mais aussi, des modèles de souris KO et *knock-in* sont présentés (**Tableau III**). Concernant les modèles transgéniques de souris, comme il en existe une grande quantité, seuls ceux qui ont été sujets antérieurement à des études de traitements ou des modificateurs génétiques ont été sélectionnés et présentés dans le tableau ici-bas.

**Tableau III :** Autres modèles animaux, drosophile, poissons-zèbres et souris, pour la MMJ (373). Inspiré et adapté de *Schmidt, J., Adv Exp Med Biol., 2018.*

Construction	Promoteur et Étiquette	Longueur complète ATXN3/ Fragment C-terminal	Phénotypes	Réf.
<b><i>Drosophila melanogaster</i></b>				
MJDtr-Q27 MJDtr-Q78	gmr-GAL4 (« <i>glass multiple reporter</i> ») (yeux) et elav-GAL4 (« <i>Embryonic lethal abnormal vision</i> ») (pan-neuronal)  Hémagglutinine (HA ; N-terminal)	Fragment C-terminal	MJDtr-Q78 : inclusions intranucléaires, apparition tardive d'une neurodégénérescence, conséquences sévères sur diverses cellules particulièrement sur les neurones.	(473)

MJDtr-Q27 MJDtr-Q78	elav-GAL4, Appl- X- GAL4 et Apl- III- GAL4 (« <i>β-amyloid precursor protein like</i> ») (neuronal) et loco-II- GAL4 (« <i>Locomotion defects</i> »), loco-III- GAL4 et M1B- GAL4 (glial) HA (N-terminal)	Fragment C-terminal	Formation des agrégats à un stade précoce et changements comportementaux pour les deux types d'expression. Neurodégénérescence seulement lorsqu'exprimée dans les cellules gliales. Changements comportementaux et histologiques pour aussi la lignée sauvage, mais avec un retard sur la lignée mutante.	(474)
SCA3-Q27 SCA3-Q84	gmr-GAL4 (yeux) et elav-GAL4 (pan- neuronal) myc (N-terminal)	Longueur complète	- Neurodégénérescence sévère et progressive à l'âge adulte pour toutes les lignées exprimant Q78 et Q84.	(115)
SCA3-Q78	gmr-GAL4 (yeux) HA (N-terminal)	Longueur complète	- Réduction de la neurodégénérescence, de l'accumulation des protéines poly-Q et de la toxicité par la co-expression de Q27 (longueur complète) ou SCA3-delta dans la lignée SCA3tr-Q78. Pas de suppression de la toxicité avec la co-expression de la forme tronquée 27Q. L'effet protecteur est donc lié au fonctionnement normal de ATXN3.	
SCA3tr-Q27 SCA3tr-Q78	gmr-GAL4 (yeux) myc (N-terminal)	Fragment C-terminal		
SCA3-Q27-UIM* SCA3-Q80-UIM* (résidus sérine dans les UIM mutés en alanine)	gmr-GAL4 (yeux) myc (N-terminal)	Longueur complète	- Neurodégénérescence compromise dans les lignées avec mutation dans les UIM, SCA3-Q27-UIM* et SCA3-Q80-UIM*.	
SCA3-Q27-C14A SCA3-Q88-C14A (mutation au niveau du domaine de la protéase ubiquitine)	gmr-GAL4 (yeux) myc (N-terminal)	Longueur complète	- Perte de l'activité protectrice de la protéase ubiquitine suite à sa mutation dans les lignées SCA3-Q27-C14A et SCA3-Q88-C14A. Augmentation importante de la toxicité et de la neurodégénérescence dans la lignée SCA3-Q88-C14A.	
SCA3-delta (absence d'une région poly-Q)	gmr-GAL4 (yeux) myc (N-terminal)	Fragment N-terminal		

Myc-Atx3Q84-Flag  Myc-Atx3Q84-Flag (6M) (avec 6 mutations putatives aux sites de clivage caspase (D171/208/217/223 /225/228 N))	elav-GAL4 (neuronal) et rh1-GAL4 (photorécepteur) et gmr-GAL4 (yeux)  myc (N-terminal) FLAG (C-terminal)	Longueur complète	Myc-Atx3Q84-Flag (6M) : réduction du clivage de la protéine ATXN3 et de la neurotoxicité comparativement à Myc-Atx3Q84-Flag. Aucun effet sur l'agrégation et la formation des inclusions intranucléaires neuronales.	(475)
<b>Poissons-zèbres</b>				
EGFP-ataxin-3-23Q EGFP-ataxin-3-84Q	elav-GAL4 (neuronal) EGFP	Longueur complète	EGFP-ataxin-3-84Q : longévité réduite, neuropathologies, fragments clivés ATXN3, défaut moteur, nage de plus courte distance dès jour six.	(244)
<b>Souris</b>				
<i>Knock-out</i>	-	-	Viabilité et fertilité normales, pas d'anomalie au niveau de la locomotion. Présence d'un niveau important de protéines ubiquitinées, supportant la fonction DUB de la protéine ATXN3.	(111)
YAC MJD15.1 YAC MJD15.4  YAC MJD64-84 (64, 67, 72, 76, 84 répétitions)  Souche de souris : C57BL/6J	ATXN3	Longueur complète	- YAC MJD15.1 et YAC MJD15.4 sont des contrôles. Pas de phénotypes.  - YAC MJD64-84 : pertes sensorielle et motrice, inclusions intranucléaires neuronales, localisation principalement nucléaire, perte cellulaire dans plusieurs régions du cerveau, démyélinisation périphérique des nerfs, perte axonale. Phénotypes s'aggravant avec le nombre de répétitions. Progression lente des phénotypes.	(476)



			- YAC MJD84.2 : tous les phénotypes mentionnés pour YAC MJD64-84 + incoordination motrice précoce, agrégats nucléaires et cytoplasmiques, neurodégénérescence importante.	
<p>70Q 148Q 148Q.NES (hors du noyau) 148Q.NLS (dans le noyau)</p> <p>Souche de souris : C57BL/6N</p>	<p><i>PRNP</i> (promoteur de la protéine prion de souris)</p>	<p>Longueur complète</p>	<p>- 70Q : tremblements, position des membres postérieurs à large base, poids corporel réduit. Cellules Purkinje rétrécies, densité électronique accrue. Corps d'inclusion abondants dans plusieurs régions du cerveau. Progression rapide des phénotypes.</p> <p>- 148Q : apparition précoce des phénotypes (à deux mois), position des membres postérieurs à large base, tremblements. Corps d'inclusion abondants dans plusieurs régions du cerveau. Mort prématurée à trois mois. Progression rapide des phénotypes.</p> <p>- 148Q.NES : symptômes comportementaux légers ou mêmes absents. Corps d'inclusion réduits.</p> <p>- 148Q.NLS : apparition précoce des phénotypes (à un mois), position des membres postérieurs à large base, tremblements. Corps d'inclusion abondants dans plusieurs régions du cerveau. Plus sévèrement affectée que les lignées 70Q et 148Q. Mort prématurée. Progression rapide des phénotypes.</p>	(135)
<p>ataxin-3-Q22 ataxin-3-Q79</p> <p>Souche de souris : FVB/N</p>	<p><i>PRNP</i></p>	<p>Longueur complète</p>	<p>ataxin-3-Q79 : étroite des membres antérieurs, défaut moteur, activité locomotrice réduite, démarche ataxique à large base, élévation pelvienne réduite, posture courbée. Neurodégénérescence des cellules Purkinje, corps d'inclusion intranucléaires dans plusieurs régions. Progression lente des phénotypes.</p>	(178)

<p>ataxin-3-[Q69]</p> <p>Souche de souris : C57BL/6J</p>	L7	Fragment C-terminal	Apparition précoce des phénotypes (à trois mois) : phénotype ataxique, poids corporel réduit. Atrophie cérébelleuse sévère, corps d'inclusion dans le cytoplasme ou dans la partie extracellulaire des cellules Purkinje. Progression rapide des phénotypes.	(269)
<p>CMVMJD83 CMVMJD94 CMVMJD135</p> <p>Souche de souris : C57BL/6bc et FVB/N pour CMVMJD83/94, et C57BL/6 pour CMVMJD135</p>	CMV	Longueur complète	<p>- CMVMJD83 : pas de phénotypes.</p> <p>- CMVMJD94 : instabilité intergénérationnelle des répétitions CAG, dysfonction neuronale, défaut moteur. Progression lente des phénotypes.</p> <p>- CMVMJD135 : instabilité intergénérationnelle des répétitions CAG, déficits neurologiques progressifs, poids corporel réduit, inclusions intranucléaires dans plusieurs régions du cerveau. Progression lente des phénotypes.</p>	(303,477)
<p><i>Knock-in</i></p> <p>Ki91</p> <p>Souche de souris : C57BL/6J</p>	ATXN3	Échange des exons 7 à 11 du locus <i>ATXN3</i> de souris avec les exons 7 à 11 de l'humain, contenant 91 répétitions de CAG	Instabilité intergénérationnelle des répétitions CAG, neurodégénérescence, neuropathologie dans les neurones et dans la glie, dérégulation transcriptionnelle, détérioration de la coordination motrice à apparition tardive. Progression lente des phénotypes.	(478)

## 1.4. Introduction à l'étude

La MMJ est une maladie neurodégénérative présentant un impact important sur la vie des patients atteints. Il est vrai qu'elle est considérée comme étant une maladie rare, mais son impact ne corrèle nullement avec la prévalence qu'elle représente. Comme il n'existe malheureusement pas encore de thérapie spécifique pour traiter la MMJ, des investigations supplémentaires et sérieuses quant aux voies et mécanismes en jeu pour la MMJ sont nécessaires pour éventuellement parvenir à développer une thérapie spécifique pour cette maladie.

L'objectif global de cette thèse était d'identifier des gènes et des voies de signalisation en jeu dans la pathologie de la MMJ, et de déterminer des stratégies thérapeutiques génétiques (surexpression ou suppression d'un gène) et moléculaires (composés neuroprotecteurs) pour contrer la toxicité produite par la protéine ATXN3 mutante.

Les vers transgéniques mutants *ATXN3-CAG89* ont démontré un défaut de la motilité, une neurodégénérescence, une longévité réduite, une agrégation protéique, du stress oxydatif et une activation de la réponse au stress du RE, suite aux expériences de caractérisation effectuées antérieurement dans notre laboratoire (42). L'observation de ces phénotypes nous a confirmé notre modèle de MMJ comme étant un paradigme de choix pour l'étude de la pathogenèse de la MMJ, et elle nous a aussi incités à aller plus loin dans l'étude de la MMJ. Nous avons réalisé deux types de criblages, pharmacologique et pour des modificateurs génétiques, afin d'identifier des molécules, des gènes, et à travers les éléments identifiés dans ces criblages, des voies de signalisation associées avec la pathologie de la MMJ.

### 1.4.1. Première partie du projet de thèse – Criblage pharmacologique

D'après les expériences antérieures effectuées dans notre laboratoire, par le développement et la caractérisation des vers transgéniques *C. elegans ATXN3-CAG89*, il a été possible à identifier un modèle potentiel pour étudier la MMJ, mais aussi, des effets bénéfiques et neuroprotecteurs pour les molécules modulatrices du stress du RE sur la neurotoxicité observée chez les vers mutants MMJ (42). Ces découvertes prometteuses, ainsi que celles obtenues pour la maladie neurodégénérative la SLA (387) et la maladie neurodéveloppementale l'autisme (388), suite aux criblages pharmacologiques, nous a incité d'effectuer un criblage pharmacologique non biaisé de 3942 molécules, majoritairement approuvées par la FDA, pour la MMJ. Les hypothèses

émises pour cette partie de l'étude ont été : (1) l'action des molécules neuroprotectrices identifiées par le criblage est acheminée fort probablement par les voies classiques étant perturbées dans la MMJ et les autres maladies à expansion de poly-Q, telles que les voies du PQC ; et (2) comme déjà démontré auparavant dans d'autres études, les probabilités d'identifier des composés modulateurs du système sérotoninergique sont élevées.

Les objectifs déterminés pour cette partie de l'étude ont été : (1) l'identification des molécules étant capables de restaurer les phénotypes associés à notre modèle MMJ, incluant le défaut de la motilité, la neurodégénérescence et la longévité réduite; (2) la détermination d'une concentration optimale; et (3) l'identification des voies en jeu pour la MMJ à partir des composés neuroprotecteurs identifiés.

Tous les objectifs mentionnés ont été réalisés avec succès, résultant en la publication du papier « Small molecule rescue of ATXN3 toxicity in *C. elegans* via TFEB/ HLH-30 » (publié dans *Neurotherapeutics*), présent au Chapitre 2 de cette thèse. Ce dernier consiste à être mon projet principal sur lequel j'ai investi la majorité de mon temps. Toutes les expériences de ce projet ont été réalisées par moi-même, à l'exception du criblage pharmacologique et de la carte de fréquentation (« *heat map* »), étant accomplies par ma collègue, Claudia Maios.

#### **1.4.2. Seconde partie du projet de thèse – Criblage des modificateurs génétiques**

Comme une lacune importante existe encore sur les divers gènes en jeu et leur action, suppresseurs ou augmentateurs, sur la pathogenèse de la MMJ, nous avons procédé au criblage de modificateurs génétiques à base d'ARNi d'une librairie comportant 387 clones de facteurs de transcription. Les hypothèses émises pour cette partie du projet ont été: (1) le criblage nous permettrait d'identifier plusieurs modificateurs génétiques, majoritairement des augmentateurs; et (2) fort probablement, des facteurs de transcription bien étudiés, tel qu'entre autres, DAF-16/FOXO, comme déjà rapporté auparavant, serait dans la liste des modificateurs génétiques finaux identifiés.

Les objectifs pour cette seconde partie de l'étude ont été : (1) l'identification des modificateurs génétiques, suppresseurs et augmentateurs, en jeu dans la MMJ, à partir du criblage à base d'ARNi d'une librairie de facteurs de transcription; et (2) la détermination de l'action, protectrice

ou toxique, du *knock-out* et/ou de la surexpression des gènes identifiés par le criblage sur les phénotypes observés dans notre modèle transgénique *C. elegans* MMJ.

Tous ces objectifs ont été accomplis avec succès dans le papier « Overexpression of FKH-2/FOXG1 is neuroprotective in a *C. elegans* model of Machado-Joseph disease » (publié dans *Experimental Neurology*), présenté au Chapitre 3 de cette thèse. Ce projet a été effectué en parallèle avec mon projet de recherche principal, et toutes les expériences ont été réalisées par moi-même.

## Chapitre 2.

### **Small molecule rescue of ATXN3 toxicity in *C. elegans* via TFEB/ HLH-30**

Fardghassemi Y, Maios C, Parker JA. (2021).

Small molecule rescue of ATXN3 toxicity in *C. elegans* via TFEB/ HLH-30. *Neurotherapeutics*.

#### Contribution des auteurs:

Y.FG a accompli toutes les expériences (à l'exception du criblage pharmacologique et du « *heat map* », étant réalisée par C.M.), a analysé et assemblé les données, et a écrit le manuscrit (le brouillon original, les modifications/corrections et les réponses aux révisions).

C. M. a réalisé les expériences de criblage pharmacologique et du « *heat map* ».

J.A.P a supervisé le projet de recherche, a fourni toutes les ressources nécessaires, et a participé à la rédaction du manuscrit et les réponses aux révisions (modifications/corrections et révisions).

## **Small molecule rescue of ATXN3 toxicity in *C. elegans* via TFEB/ HLH-30**

Yasmin Fardghassemi <sup>1,2</sup>, Claudia Maios <sup>1,3</sup> & J. Alex Parker <sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup> Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Montreal, Quebec H2X 0A9, Canada

<sup>2</sup> Department of Biochemistry, University of Montreal, Montreal, Quebec H3T 1J4, Canada

<sup>3</sup> Department of Neuroscience, University of Montreal, Montreal, Quebec H3T 1J4, Canada

\*Corresponding author at:

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

Montreal, Quebec H2X 0A9, Canada

Tel.: +1 514-890-8000 ext. 28826. Fax: +1 514 412-7602

E-mail address: [ja.parker@umontreal.ca](mailto:ja.parker@umontreal.ca) (J.A. Parker).

## **Keywords**

Machado-Joseph disease

Neurodegenerative diseases

*Caenorhabditis elegans*

Ataxin-3

Drug screening

Neuroprotective compounds

TFEB/HLH-30



## Abstract

Spinocerebellar ataxia type 3 (SCA3), also known as Machado-Joseph disease (MJD), is a polyglutamine expansion disease arising from a trinucleotide CAG repeat expansion in exon 10 of the gene *ATXN3*. There are no effective pharmacological treatments for MJD, thus the identification of new pathogenic mechanisms, and the development of novel therapeutics are urgently needed. In this study, we performed a comprehensive, blind drug screen of 3942 compounds (many FDA-approved) and identified small-molecules that rescued the motor-deficient phenotype in transgenic *ATXN3 C. elegans* strain. Out of this screen, five lead compounds restoring motility, protecting against neurodegeneration and, increasing the lifespan in *ATXN3-CAG89* mutant worms were identified. These compounds were alfacalcidol, chenodiol, cyclophosphamide, fenbufen and, sulfaphenazole. We then investigated on how these molecules might exert their neuroprotective properties. We found that three of these compounds, chenodiol, fenbufen and sulfaphenazole, act as modulators for TFEB/HLH-30, a key transcriptional regulator of the autophagy process and, require this gene for their neuroprotective activities. This genetic-chemical approach, using genetic *C. elegans* models for MJD and the screening, are promising tools to understand the mechanisms and pathways causing neurodegeneration, leading to MJD. Positively acting compounds may be promising candidates for investigation in mammalian models of MJD and preclinical applications in the treatment of this disease.

## Introduction

SCA3 (spinocerebellar ataxia type 3), also known as Machado-Joseph disease (MJD), is considered to be the most common form of SCA worldwide [1]. SCAs are considered to be rare disorders, with a prevalence ranging from 0.3 to 2.0 per 100,000 [2]. MJD, a polyglutamine expansion disease, is a hereditary autosomal dominant neurodegenerative disease that develops when there is an abnormal expansion of the trinucleotide cytosine-adenine-guanine (CAG) repeats in the causative gene [3-5]. MJD is characterized mainly by ataxia, spasticity, peripheral muscular atrophy and/or other motor-related clinical manifestations along with neurodegeneration in selective regions including the cerebellum, basal ganglia, brainstem and spinal cord [5-8]. MJD is more highly observed among people of Portuguese/Azorean with the highest prevalence in the Azorean island of Flores (1/239) [9]. This disease is caused by an unstable expansion of CAG trinucleotide within the coding region of *ATXN3* gene, located on chromosome 14 (14q24.3-14q32.45) [3, 10-12]. The CAG repeat number in healthy individuals is between 10-51, whereas in SCA3 patients, this repeat is expanded to 55-87 [13, 14]. The mutated *ATXN3* gene is translated to an abnormal polyglutamine (poly-Q) tract within the ataxin-3 protein (ATXN3) [10, 15]. The abnormal expansion in *ATXN3* gene leads to misfolding of ATXN3 and is associated with numerous harmful impacts such as: generation of toxic poly-Q protein species, protein aggregation, disrupted protein homeostasis, loss of deubiquitylase activity, and dysregulation of autophagy, among others [3, 16]. However, the exact mechanisms of disease pathogenesis, as well as molecular pathways, are still not well understood. This restraint knowledge prevents the development of possible clinical therapies to cure or even attenuate the phenotypes associated with this disease.

To investigate aspects of MJD, we turned to the simple animal model, *Caenorhabditis elegans*, a popular system for neuroscience investigations [17]. *C. elegans* is especially well-suited for neuroscience and genetic research due to the large number of conserved molecular pathways resembling that of vertebrates and its ease genetic manipulation [18, 19]. Furthermore *C. elegans* has been used to model several neurodegenerative diseases such as MJD, amyotrophic lateral sclerosis (ALS), Parkinson's disease (PD) and Alzheimer's disease (AD) [6, 20-26].

*C. elegans* is also a useful system for drug discovery and linking drug activity to specific genetic and molecular pathways required for action. It is a powerful tool for therapeutic discovery of compounds that are able to restore the disease phenotype such as the motility and also, to

identify specific molecular pathways [27, 28]. We previously showed that our transgenic *ATXN3* mutant worms display motility defects, along with progressive neurodegeneration and reduced longevity [20]. Based on these findings, the goal of this study was to identify small molecules with neuroprotective effects that could be translated along preclinical and clinical pathways for MJD. To achieve this goal we conducted a blind drug screen of 3942 compounds and identified lead compounds that suppressed motor-deficits of *ATXN3* mutant worms, and rescued accompanying neurodegeneration and reduced longevity phenotypes. Among the lead compounds, chenodiol, fenbufen and sulfaphenazole rescued the *ATXN3* toxicity by acting as modulators of the transcription factor EB (TFEB/HLH-30), a transcription factor implicated in autophagy. These molecules are promising tools to improve neuronal health and survival in MJD models, warranting investigation in vertebrate systems.

## Materials and Methods

### Nematode strains and maintenance

Standard methods of culturing and handling worms were used [19]. 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, MAH240 *sqli17[hlh-30p::hlh-30::GFP + rol-6(su1006)]* and *hlh-30(tm1978)*, all obtained from the *Caenorhabditis* Genetics Center (University of Minnesota, Minneapolis).

### Transgenic *ATXN3* worms and plasmid constructs

The development of our transgenic *ATXN3* worms is explained in our previous paper [20]. The strain used in this study include: XQ351 *unc-119(ed3)*; ttTi5605mosII; *xqIs351(unc-47p::ATXN3-CAG89; unc-119(+))*, referred as *ATXN3-CAG89*. As previously showed, these transgenic mutants have motility defect, neurodegeneration and, reduce longevity.

### Drug libraries

The Sigma LOPAC library, composed of 1280 bioactive compounds; the MicroSource Discovery library, containing 880 compounds; the Biomol Natural Products library (Enzo Life Sciences, Inc.), composed of 500 compounds; and the Prestwick Chemical library, containing 1282 compounds, were selected for the worm-based motility screenings. All compounds were dissolved in DMSO (dimethyl sulfoxide) and tested at a concentration of 20  $\mu$ M during four hours.

### Drug screen

The drug screen was performed by using WMicroTracker machine (Phylum Tech) [76]. Briefly, ~50-60 worms adult day one were exposed to the drugs at a concentration of 20  $\mu$ M or, to DMSO as the controls in a 96-well plate. The swimming movement was tracked for at least four hours. Measurements were performed in triplicates and the average movement score was compared to the control and the average movement score of the whole plate. If the values were higher than the respective controls for a certain drug, then a secondary screen was performed to validate our

observations. Candidates that increased significantly the swimming movement in the secondary screen were considered as positive hits.

### **Age-synchronized populations**

To obtain age synchronized worms, ~10 adult hermaphrodites were placed on ten NGM plates for 3-4 days and kept at 20°C. Once the plates were full of adult worms, they were collected with M9 buffer (1M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1M NaCl, 1M MgSO<sub>4</sub>) and centrifuged at 4000 rpm (A-4-81 Rotor) for 2 min 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). 5 min vortex followed with a high intensity to degrade the worms leaving a pellet containing only eggs. The pellet was washed 3 times with M9 buffer and centrifuged at 4000 rpm (A-4-81 Rotor) for 2 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 were scored for paralysis from adult day one to adult day twelve. 30 L4 worms were transferred to NGM plates. They 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. All experiments were conducted at 20°C and, each condition was done in triplicates with 30 worms/plate.

### **Lifespan assays**

40 L4 worms were transferred to NGM plates and tested every 2 days from adult day one until death. They 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. All experiments were conducted at 20°C and, each condition was done in triplicates with 40 worms/plate.

## **Fluorescence microscopy (neurodegeneration and stress reporter fluorescence quantification)**

For scoring of neuronal processes for gaps or breakages, worms were collected at adult day five and day nine for visualization of motor neurons processes *in vivo*. For fluorescence quantification of the stress reporter, *hlh-30::GFP*, *hlh-30::GFP*; *ATXN3-CAG10* and *hlh-30::GFP*; *ATXN3-CAG89* worms were collected at adult day one, two, three and five. The nematodes were immobilized 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 to hundred fifty worms were scored per condition for the neurodegeneration assays. Approximately 17 to 20 worms were visualized per condition for the fluorescence quantification experiments. Image processing and quantification were done with Adobe Photoshop. For the fluorescence quantification of the stress reporter, we calculated the changes in the ratio (size/intensity of fluorescence). Student's *t*-test was used for statistical analysis.

## **Compound treatment on solid media**

Worms were exposed from L4 state to compounds at 20  $\mu$ M or 2  $\mu$ M (with 1% DMSO or 0.1% DMSO final concentration, respectively) incorporated into NGM solid medium, or NGM solid medium only as a control. All the plates were streaked with OP50 *E. coli*. The five lead compounds were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), Cayman Chemical Co. (Ann Arbor, MI) or, Toronto Research Chemicals Inc (North York, TO). 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 and fluorescence quantification (fluorescence microscopy).

## **Cheminformatics**

Each pair of compounds to be analyzed for similarity was evaluated for presence or absence of any of thousands of possible FP2 fingerprints. Tanimoto coefficient also known as the Jaccard index represents one of the most popular methods for quantifying molecular similarity. Tanimoto

coefficient scores were calculated for each hit and compound present in the Prestwick library using OpenBabel (<http://openbabel.org>) [77, 78].

To enhance the effectiveness of similarity of molecules, Tanimoto scores higher than 0.50 were clustered using an unweighted Euclidean distance similarity metric with complete linkage clustering allowing visualization of the ranked molecules within the context of the dendrogram. Enrichment for structural similarity of members in each cluster (Tanimoto scores were  $> 0.50$  for majority of members in a cluster) was calculated using Fisher's exact test (GraphPad Prism Software) [78].

The heat maps were generated using: <https://software.broadinstitute.org/morpheus/>. This tool uses R software. (R Team: R Development Core Team (2005). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, [www.R-project.org](http://www.R-project.org).)

## **Statistics**

Paralysis and lifespan curves were generated and compared using the Log-rank (Mantel-Cox) test. For neurodegeneration and the fluorescence assays, one-way ANOVA tests were used. All experiments were repeated for at least three times. For the heat map statistics, Fisher's exact tests were realized. Prism (GraphPad Software) was used for all statistical analyses.

## Results

### Chemical-genetic screen in *ATXN3* mutant *C. elegans*

Our previous work demonstrated that the motility defects observed in *ATXN3*-CAG89 transgenic worms could be rescued using specific small molecules [20]. This promising pre-screen encouraged us to go further, so we performed a blind, liquid culture, drug screen of 3942 small molecules (at 20  $\mu$ M) for rescue of motility defects in *ATXN3*-CAG89 transgenic worms, and identified 24 lead molecules (**Fig. 2.1, Supplementary Table S1, Supplementary Table S2**).

To validate these findings the *ATXN3*-CAG89 mutant worms were then treated with the positive compounds using a solid media approach (**Fig. 2.2A-C**), and 21 of the initial 24 compounds maintained rescuing activity (clebopride, lamotrigine and phorbol 12-myristate 13-acetate were rejected) (**Fig. 2.2A-C**). These differences could be due to the acute nature of the liquid drug screen where the animals are exposed to molecules over a period of four hours, compared to drug exposure over 12 days using solid media assays.

The compounds were then tested at a lower dose (2  $\mu$ M) and we observed that 13 of the 21 compounds showed significant suppression of the locomotion deficit in *ATXN3*-CAG89 transgenics at this concentration (**Fig. 2.3A-B**). We further tested these 13 compounds at two additional concentrations (0.2  $\mu$ M and 40  $\mu$ M), and we conclude that the optimal concentration for these compounds to suppress the paralysis phenotype in our MJD model, among the ones that have been evaluated for this study, is set at 2  $\mu$ M.

### Small molecules rescue the neurodegeneration and extend lifespan in *ATXN3*-CAG89 transgenics

*ATXN3*-CAG89 transgenics display progressive degeneration of motor neurons as they age [20], and we focused on days five and nine of adulthood to evaluate the neuroprotective capacity of the 13 lead compounds. The health of motor neurons in *ATXN3*-CAG89 transgenics was assessed with a stably integrated *unc-47p::mCherry* transgene that expresses a red fluorescing protein in the GABAergic motor neurons of living animals. Using this *ATXN3*-CAG89; *unc-47p::mCherry* strain, we observed that seven compounds rescued neurodegeneration at day five of adulthood (**Fig. 2.3C**). These seven compounds were then tested on *ATXN3*-CAG89 mutant worms and neurodegeneration was examined at adult day nine, and significant rescue of neurodegeneration



was observed when treated with the following five compounds: alfacalcidol (ALFA), chenodiol (CHEN), cyclophosphamide (CYCLO), fenbufen (FEN) and sulfaphenazole (SULFA) (**Fig. 2.3D**). Finally, these five compounds rescued the decreased lifespan phenotype observed in *ATXN3-CAG89* transgenics (**Fig. 2.3E**). Altogether, we identified five molecules that suppressed several negative phenotypes associated with the expression of mutant *ATXN3 in vivo*.

### **Heat map visualisation of the five hit compounds and their chemical classes**

Afterward, we wondered to evaluate the structural similarity and similar clusters existing between either the hit or not hit compounds screened from the 1280 molecules present in the Prestwick library (all five identified leads in this study belong to this library). From the hit compounds, several chemical classes were more representative: vitamin D3 derivatives (\*\**P* = 0.0078), cyclophosphamides (\*\**P* = 0.0078), benzenes (\**P* = 0.0233), and sulfonamides (\**P* = 0.0271) in which belongs ALFA, CYCLO, FEN and SULFA, respectively (**Suppl. Fig. 2.1, Supplementary Material**). All these chemical classes were statistically overrepresented except, the steroids (ns; *P* = 0.0610), CHEN, which strongly suppressed the phenotypes but were not statistically overrepresented (**Suppl. Fig. 2.1, Supplementary Material**). This could be due to the fact that more compounds were represented in this category (16 compounds) compared to the others and also, high structural similarity was observed between different isoforms in this chemical class.

### **Involvement of TFEB/HLH-30, a key regulator of the autophagy process in MJD**

Autophagy is a major cellular recycling pathway that has an important role in aging. Several studies have highlighted an important link between autophagy and neurodegenerative diseases, and disruption of this pathway may contribute to pathology [3, 29, 30]. It has also been shown that upregulation of this pathway could be beneficial and ameliorate disease pathology [29]. Transcription factor EB (TFEB) is a major regulator of autophagy and lysosomal gene expression, and *C. elegans* possesses an orthologue named HLH-30 [31]. Based on this, we wondered if upregulation of TFEB/HLH-30 could modify phenotypes in our *C. elegans* MJD model. We crossed our *ATXN3* transgenics with a transgenic, translational *hlh-30* reporter strain which uses the *hlh-30* promoter to express *hlh-30* fused to GFP and measured the level of fluorescence in different adulthood stages: day one, two, three and five. No difference in the level of fluorescence was observed in day one of adulthood between treated or untreated *hlh-30::GFP*,

*hll-30::GFP; ATXN3-CAG10* and *hll-30::GFP; ATXN3-CAG89* transgenic worms. However, we observed increased fluorescence in *hll-30::GFP; ATXN3-CAG89* worms when compared to *hll-30::GFP* or *hll-30::GFP; ATXN3-CAG10* controls at adulthood days two, three and five (**Fig. 2.4A-B, Suppl. Fig. 2.2**). This increase of fluorescence was mostly observed in the head (H), spermatheca (S) and tail (T). These data suggest there is an upregulation of the autophagy process in response to toxicity induced by mutant poly-Q proteins. From here, we investigated the activity of the lead compounds in relation to *hll-30* expression. We found that three out of the five compounds (exceptions were ALFA and CYCLO) decreased the fluorescence level in *ATXN3-CAG89* mutant worms at adulthood days two and three (**Suppl. Fig. 2.2**) but, significantly increased it at adulthood day five (**Fig. 2.4A-B**). We observed that in aging worms, *hll-30::GFP* expression tends to shift and increase in *ATXN3-CAG89* transgenics when treated with CHEN, FEN and SULFA. We observed that the decreased level of fluorescence related to *hll-30::GFP* expression in treated *ATXN3-CAG89* worms at adulthood day three is less severe than adulthood day two and, increased at adulthood day five in the treated worms. This suggests that the increased expression of HLH-30 in *ATXN3-CAG89* worms may represent an autophagic stress response that is mitigated by the small molecules CHEN, FEN and SULFA in early stages of worms (adulthood day two and three) but with aging, in a longer-term matter (adulthood day five), the molecules increase the level of HLH-30 expression in our MJD worms in order to protect the organism and decrease the toxicity caused by mutant ATXN3. We observed no effect of the compounds in *hll-30::GFP* or *hll-30::GFP; ATXN3-CAG10* worms at different stages when treated (**Suppl. Fig. 2.2**). These data suggest a possible link between mutant ATXN3 toxicity and autophagy, as detected via *hll-30* expression. Although, further experiments would be required in order to be able to answer if the link existing between the action of the compounds and the autophagy in MJD mutants is due to a direct or indirect effect involving additional mechanisms and pathways.

### **Chemical-genetic modulation of *hll-30* suppresses the neuronal toxicity observed in *ATXN3-CAG89* worms**

Next we examined directly for neuroprotective effects of increased *hll-30* expression in conjunction with the five lead molecules. We observed a decreased rate of paralysis in *hll-30::GFP; ATXN3-CAG89* worms when compared to *ATXN3-CAG89* controls (**Fig. 2.5A**).

Indeed, overexpression of HLH-30 alleviates the motility defect observed in *ATXN3-CAG89* mutant worms. We tested the five lead molecules in the *hlh-30::GFP; ATXN3-CAG89* worms, and while they all suppressed paralysis (**Fig. 2.5A**) and motor neuron degeneration (**Fig. 2.5B**) compared to *ATXN3-CAG89* controls, only FEN showed an additive effect compared to *hlh-30::GFP; ATXN3-CAG89* controls. These data suggest that upregulation of HLH-30 and treatment of MJD model with FEN could be a novel neuroprotective approach to undertake in order to decrease the neuronal toxicity caused by expanded ATXN3.

### **CHEN, FEN and SULFA require *hlh-30* for their neuroprotective activities**

To determine if any of the five lead molecules required *hlh-30* for their neuroprotective activity and, in order to confirm if the link existing between *hlh-30* and the action of the compounds is due to a direct or indirect effect, *ATXN3-CAG89* worms were crossed with loss-of-function (LOF) mutant *hlh-30* worms. We observed that CHEN, FEN and SULFA required *hlh-30* for their activity as these compounds were unable to rescue motility deficits (**Fig. 2.6A**) and neurodegeneration (**Fig. 2.6B**) in *hlh-30(tm1978); ATXN3-CAG89* worms. Treatment with CYCLO or ALFA continued to rescue paralysis and neurodegeneration phenotypes in the absence of *hlh-30* (**Fig. 2.6**), suggesting a possible compensatory effect by other pathways. Also, we observed in the paralysis assays that *hlh-30(tm1978); ATXN3-CAG89* worms showed a slightly lower (but not significant) paralysis phenotype when compared to *ATXN3-CAG89* mutants, suggesting a possible rescue effect in our MJD model when *hlh-30* is absent (**Fig. 2.6A**). However, with the neurodegeneration assays, this hypothesis was rejected as we observed a slight increase (without showing significance) of neurodegeneration in *hlh-30(tm1978); ATXN3-CAG89* worms compared to *ATXN3-CAG89* mutants (**Fig. 2.6B**). These data show that the absence of *hlh-30* in our MJD model does not necessarily modify *ATXN3-CAG89* phenotypes, but confirm that CHEN, FEN and SULFA require *hlh-30* for their neuroprotective activities, as well as, a direct link between *hlh-30* and the action of these three compounds.

Finally, we tested treatment with the three compounds (CHEN, FEN and SULFA) and, observed that they failed to suppress motility phenotypes in *hlh-30(tm1978); ATXN3-CAG89* worms (**Fig. 2.7A**), while the triple molecule treatment provided robust suppression in *hlh-30::GFP; ATXN3-CAG89* worms (**Fig. 2.7B**). These results demonstrate a key role for *hlh-30* in suppression of mutant ATXN3 toxicity by small molecules.

## Discussion

By using our *ATXN3* transgenic worms, we performed a large comprehensive blind drug screen of 3942 molecules. This screen allowed us to identify five lead compounds that rescued the motor function, neurodegeneration and reduced longevity observed in our *ATXN3* mutant transgenic *C. elegans*. Besides finding five lead compounds, we also identified a new transcription factor related to *ATXN3* toxicity, TFEB/HLH-30. We also showed that chenodiol, fenbufen and sulfaphenazole, are dependent on this transcription factor for their neuroprotective activities in MJD.

Drug screening in *C. elegans*, a simple and easy-maintained model organism, is a popular tool to identify compounds, as well as pathways contributing to better understanding of the disease and development of possible therapies [18, 32-34]. In this study, we used this approach in order to find lead molecules able to rescue the locomotion deficit observed in our mutant *ATXN3*-CAG89 transgenics. The aim of this study was to identify molecules and pathways related to MJD as well as, potential compounds for drug development in the treatment of MJD. The drug library we screened contained many FDA-approved compounds allowing for rapid, potential translation to preclinical settings. Also, many of compounds in this library have been studied and tested in models for other neuropathologies such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease and ALS. The screening and other assays (paralysis, neurodegeneration and lifespan) allowed us to identify five lead compounds: alfacalcidol (ALFA), chenodiol (CHEN), cyclophosphamide (CYCLO), fenbufen (FEN) and sulfaphenazole (SULFA). With the heat map visualization, we were able to identify several chemical classes present in our Prestwick library, in which all five compounds belong: vitamin D derivatives, steroids, cyclophosphamides, benzenes and sulfonamides, respectively.

ALFA is known to be an active metabolite of vitamin D performing important functions in the regulation of calcium and bone metabolism [35]. Vitamin D hydroxylating enzymes and receptors are located on immune cells and in some key areas of the brain [36]. Epidemiological evidences demonstrated that deficiency of vitamin D is relevant to disease risk in multiple sclerosis (MS), Parkinson's disease (PD) and Alzheimer's disease (AD) [35, 37, 38]. Several studies done on neurodegenerative diseases demonstrated that low serum or plasma vitamin D levels bring to cognitive impairment, increased risk of dementia and, impaired motor functions [37, 39-42]. Also, in a study evaluating the mechanisms by which vitamin D influences aging in

*C. elegans*, it has been demonstrated that vitamin D promotes protein homeostasis, suppress protein insolubility and toxicity and, extend lifespan by specific stress response pathway genes [43]. Thus, these findings confirm the importance of keeping appropriate vitamin D serum levels and, could explain the reason why many age-related diseases are related with vitamin D deficiency [43]. Moreover, a perturbation of calcium-signalling in MJD cases has also been observed and as therapeutic perspectives, an improvement of the calcium homeostasis has been suggested [44]. Thereby, ALFA, being implicated in the calcium homeostasis, might be one of the reasons why this compound figures among the leads. As an off-target effect, the use of vitamin D could also reverse the oxidative stress damage to DNA and protects against neuroinflammation [45, 46]. Treatment with alfacalcidol could decrease the neuronal toxicity caused by expanded ATXN3, which induces high level of oxidative stress, DNA damage, disturbance in calcium signalling and, neuroinflammation in MJD patients [20, 44, 47, 48]. This compound could act on many different targets beneficial for MJD.

CHEN, also known as chenodeoxycholic acid, is a natural bile acid found in the body that dissolves the cholesterol that makes gallstones and inhibits its production in the liver and absorption in the intestine [49]. It has been noted that this compound displays also some off-target effects decreasing the neuronal toxicity. Indeed, it has been reported in a rat Alzheimer's disease model study that CHEN decreases the neurotoxicity and cognitive deterioration observed in this disease by activating the cAMP response element-binding protein (CREB), enhancing brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and, improving insulin sensitivity [49]. As for MJD, CHEN could be an interesting therapeutic approach to undertake in order to study these aspects as well. In this study, we showed a novel role for CHEN which figures among the leads. We have shown that CHEN requires *h1h-30*, a transcription factor related to the autophagy pathway, to complete its neuroprotective activities and decrease the neurotoxicity in our MJD model.

FEN is a non-steroidal anti-inflammatory drug predominantly used to treat inflammation. This compound prevents prostaglandin's production, which can cause inflammation by inhibiting cyclooxygenase (COX) [50]. FEN is used in Alzheimer's disease in order to prevent the inflammation observed in patients [51]. Several studies demonstrated the involvement of neuroinflammation in several neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease, amyotrophic lateral sclerosis, Huntington's disease and, MJD [52-57]. Using FEN as a therapeutic compound could have clinical benefits such as decreasing the

neuroinflammation in patients suffering from any of these neurodegenerative diseases. As an off-target effect, FEN also acts as an antioxidant. Indeed, this compound is able to scavenge reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrate species (RNS) [58]. An interesting target to study in our MJD model in which we have already demonstrated high level of oxidative stress [20]. In this study, we observed that FEN rescues phenotypes such as motility defects, neurodegeneration and reduced longevity in *ATXN3-CAG89* mutant worms. We also showed that FEN has high potential to rescue the motility deficit and neurodegeneration when TFEB/HLH-30 is overexpressed. This suggests that FEN could have beneficial and important effects on the autophagy pathway.

CYCLO, also known as cytophosphane, is an alkylating agent used in order to suppress the immune system, is an immunomodulator and, also a potent anti-inflammatory [59]. This compound has been used as a preventative drug in multiple sclerosis disease. It has been shown that CYCLO has the property to permeate the blood-brain barrier, has a good bioavailability in the central nervous system and by exhorting its immunomodulation and immunosuppression role, is able to stabilize and prevent the progression of this disease [59, 60]. This drug is also used in individuals with mild to moderate Alzheimer's disease in order to decrease side effects [61]. This molecule is able to restore the motility deficit and neurodegeneration and, enhance longevity in our MJD strain.

SULFA, finally, is a sulfonamide antibiotic that targets bacterial replication by inhibiting folate biosynthesis. It is also a selective inhibitor of the mammalian Cytochrome P450 isozyme CYP2C9 [62, 63]. This compound was also identified in a screen looking for molecules that block light-induced, degenerative loss of photoreceptors that occurs in age-related retinal degenerative diseases [64]. It has also been shown in a Parkinson disease's study that SULFA acts as a neuroprotective molecule by enhancing the longevity and normal dopaminergic neurons in their *C. elegans* model organism [63]. As an off-target effect, it has been shown that SULFA induces autophagy and protein kinase C (PKC) activations [65]. They have shown that the protection mediated by SULFA in their model was due to an increase of autophagy process [65]. It has also been shown the autophagy activation is associated with neuroprotection [66]. As in this study, we showed that SULFA is dependent on *hlh-30*, an important regulator of the autophagy process, for its neuroprotective activities. We also showed that this compound is able to prolong longevity, as well as suppress neurodegeneration and motility defects in *ATXN3* worms.

Autophagy is one of the main and important pathways allowing the degradation of abnormal protein aggregates. Disruption and impairment of this pathway could contribute to many neurodegenerative diseases such as MJD [67-74]. It has also been shown that the upregulation of autophagy is capable of reducing the level of toxic proteins, ameliorate signs of disease and also delay the disease progression in several neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease, Parkinson's diseases, polyglutamine diseases and amyotrophic lateral sclerosis [29]. Based on these findings, we investigated if an important regulator of autophagy process, TFEB/HLH-30, was involved in a model of MJD.

When TFEB/HLH-30 is overexpressed, we observed an increased level of *hlh-30::GFP* expression in our MJD mutants. Also, we observed a shift and increase of *hlh-30::GFP* expression during aging in our MJD mutants when treated with CHEN, FEN and SULFA. In the early stages (adulthood days two and three), the compounds tend to decrease the level of *hlh-30::GFP* expression in *ATXN3-CAG89* worms perhaps as an early protective response in order to bring back the homeostasis. But then, at later stages (adulthood day five), with aging, they tend to increase the expression of *hlh-30::GFP* in our MJD mutants in order to protect and decrease the toxicity induced by mutant poly-Q proteins. Indeed, alterations of autophagy levels during aging have been reported, and may be relevant to age-dependent neurodegeneration [75].

Also, it has been observed that *hlh-30::GFP* reporter present an increased level of fluorescence in the head (H), spermatecha (S) and tail (T) of adult animals. However, the reason explaining how this elevation could affect the GABAergic neurons (where *ATXN3* has been expressed in our transgenic MJD model) is due to the communication existing between cells during stress in order to augment coordination of an organism-wide stress response. Here, we suspect that proteotoxically stressed GABA neurons are communicating to the rest of the organism, something that we have previously reported for our MJD model in the context of ER stress [20].

*ATXN3-CAG89* worms overexpressing TFEB/HLH-30 showed a rescue of motility deficits and neurodegeneration. Indeed, overexpression of this protein in our MJD model showed an ability to alleviate these phenotypes caused by the expanded *ATXN3*. A similar profile was observed when these worms were treated with small molecules. The lead compounds, CHEN, FEN and SULFA rescued the locomotion defect and neurodegeneration in *ATXN3-CAG89* worms overexpressing TFEB/HLH-30 when compared to *ATXN3-CAG89* mutants. One compound, FEN, having additive effect, showed high potential in decreasing remarkably the

motor function and neurodegeneration (at adult day nine) in our mutant overexpressing TFEB/HLH-30 worms. Thus, a chemical-genetic approach could be a potential therapeutic strategy for MJD cases. These findings affirmed that TFEB/HLH-30 may be involved in ATXN3 phenotypes.

Finally, we demonstrated that CHEN, FEN and SULFA require *hlh-30* for their neuroprotective activities. Indeed, these compounds are dependent and directly linked on this transcription factor to restore MJD phenotypes such as motility defect and neurodegeneration. In the absence of this gene, no small molecule mediated rescue is observed in our mutants. However, we observed that ALFA and CYCLO are still both able to rescue motility deficits as well as neurodegeneration in our MJD mutants. This rescue might be due to some compensatory effects of other activated pathways. Also, we observed a slight, non-significant decrease of paralysis phenotypes in our MJD model in the absence of *hlh-30*, suggesting a possible rescue effect. However, in the neurodegeneration assays, this rescue effect was completely absent and, we rather observed a slight increase (not significant) of neurodegeneration in the absence of *hlh-30* in *ATXN3-CAG89* mutants. Based on these observations, we concluded that the absence of *hlh-30* might not being toxic, as expected, in our MJD model and, showed to have a more neutral effect contrary to its overexpression, where we observed a significant decrease of paralysis and neurodegeneration phenotypes. This neutral effect observed in the LOF *hlh-30* might be due to a compensatory effect of other autophagy genes present in *C. elegans*.

In summary, we conducted a high-throughput screen of 3942 compounds using a *C. elegans* model of MJD. This screen led to the identification of five lead compounds that could be promising candidates for the treatment of MJD. Among the leads, one compound, fenbufen, showed to be the most effective. Indeed, additional studies are required to extend these findings to mammalian models of MJD. However, from a practical perspective, fenbufen, being FDA approved, could be a novel neuroprotective molecule to investigate since it could be translated rapidly into clinical settings for MJD.

Also, in this study, we identified TFEB/HLH-30 as a new potential regulator of MJD pathology. However further investigation is required to better understand the roles of TFEB/HLH-30 and autophagy in the context of mutant *ATXN3* toxicity and MJD. Finally, the drug screening and the mutant *ATXN3* transgenic worms are valuable tools to advance MJD research, as the pathogenic mechanisms of disease are still not well understood. Our findings could guide future MJD



research, by validating these lead molecules and autophagy regulators in more advanced model organisms and eventually in humans.

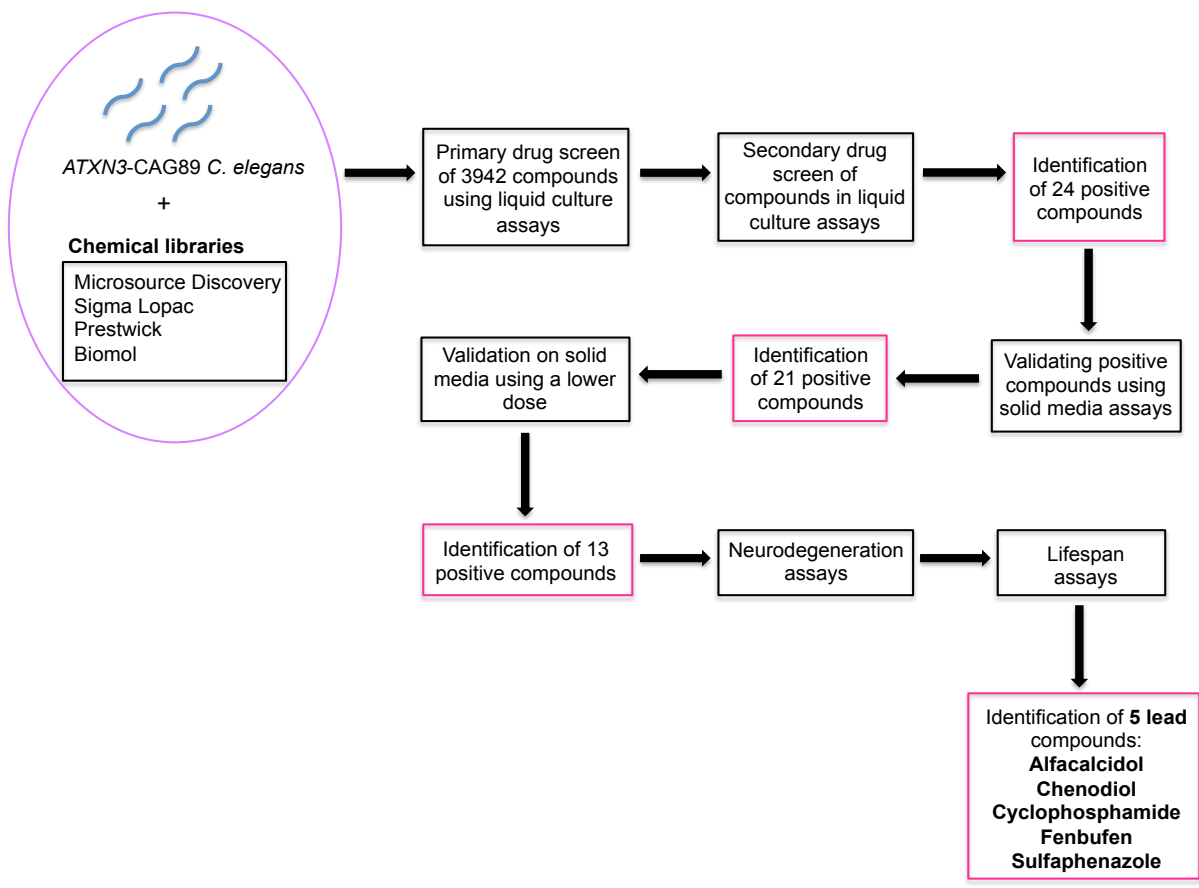


Figure 2.1

**Figure 2.1. Chemical-genetic screen in *ATXN3-CAG89* mutant transgenics.**

By using the *WMicroTracker* machine, 3942 compounds with 20  $\mu$ M concentration were screened in our MJD strain. These compounds were, from four companies: Microsource Discovery, Sigma Lopac, Prestwick and Biomol. Measurements were performed in triplicates and the average movement score was compared to the control (*ATXN3-CAG89* mutants in DMSO, no compound) and the average movement score of the whole plate. If the values were higher than the respective controls for a certain drug, then a secondary screen was performed to validate our observations. Candidates that increased significantly the swimming movement in the secondary screen were considered as positive hits. From this screen, we identified 24 positive compounds able to significantly correct the impaired movement phenotype of our MJD strain when compared to the controls. After paralysis, neurodegeneration and lifespan assays, we identified five lead compounds able to rescue all these phenotypes. The lead compounds are: alfacalcidol (ALFA), chenodiol (CHEN), cyclophosphamide (CYCLO), fenbufen (FEN) and sulfaphenazole (SULFA).

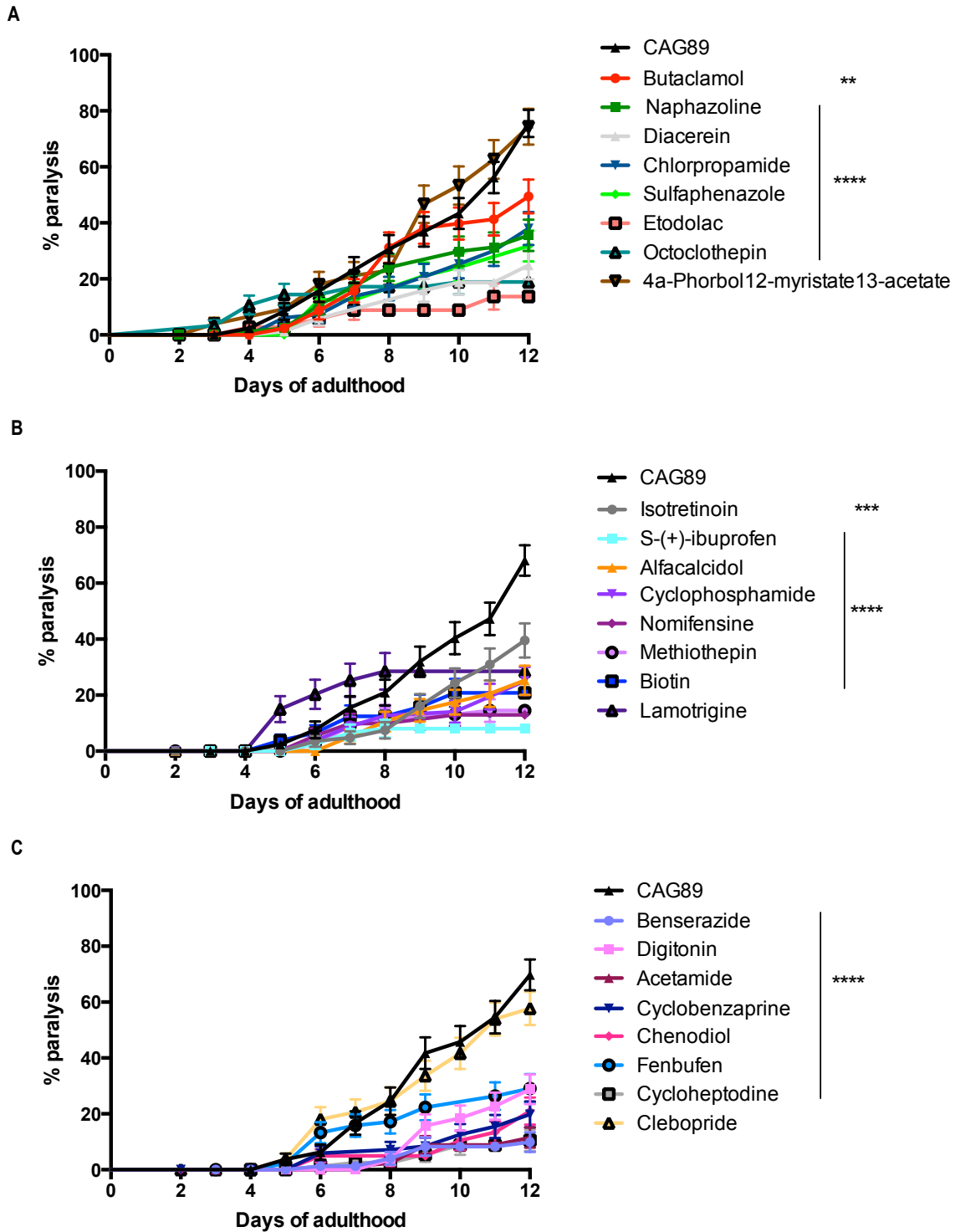


Figure 2.2

**Figure 2.2. Validation of the positive compounds on solid media assays.**

(A-C) The motor defect phenotype observed in *ATXN3*-CAG89 worms was significantly rescued when treated with (A) Butaclamol (\*\* $P < 0.01$ ) or, Naphazoline, Diacerein, Chlorpropamide, Sulfaphenazole, Etodolac, Octoclothebin (\*\*\*\* $P < 0.0001$  for all previous compounds), (B) Isotetinoin (\*\* $P < 0.001$ ), Ibuprofen, Alfacalcidol, Cyclophosphamide, Nomifensine, Methiothepin, Biotin (\*\*\*\* $P < 0.0001$  for all mentioned compounds), (C) Benserazide, Digitonin, Acetamide, Cyclobenzaprine, Chenodiol, Fenbufen and, Cycloheptadine (\*\*\*\* $P < 0.0001$  for all previous compounds) (by log-rank (Mantel-Cox) test, N= 90-100 per trial and, N=270-300 when all trials combined). No rescue of the locomotion defect is observed when the *ATXN3*-CAG89 worms were treated with Phorbol 12-myristate 12-acetate, Lamotrigine or Clebopride. The concentration of the compounds was tested at 20  $\mu$ M as in the liquid culture. This experiment was done 3 times.

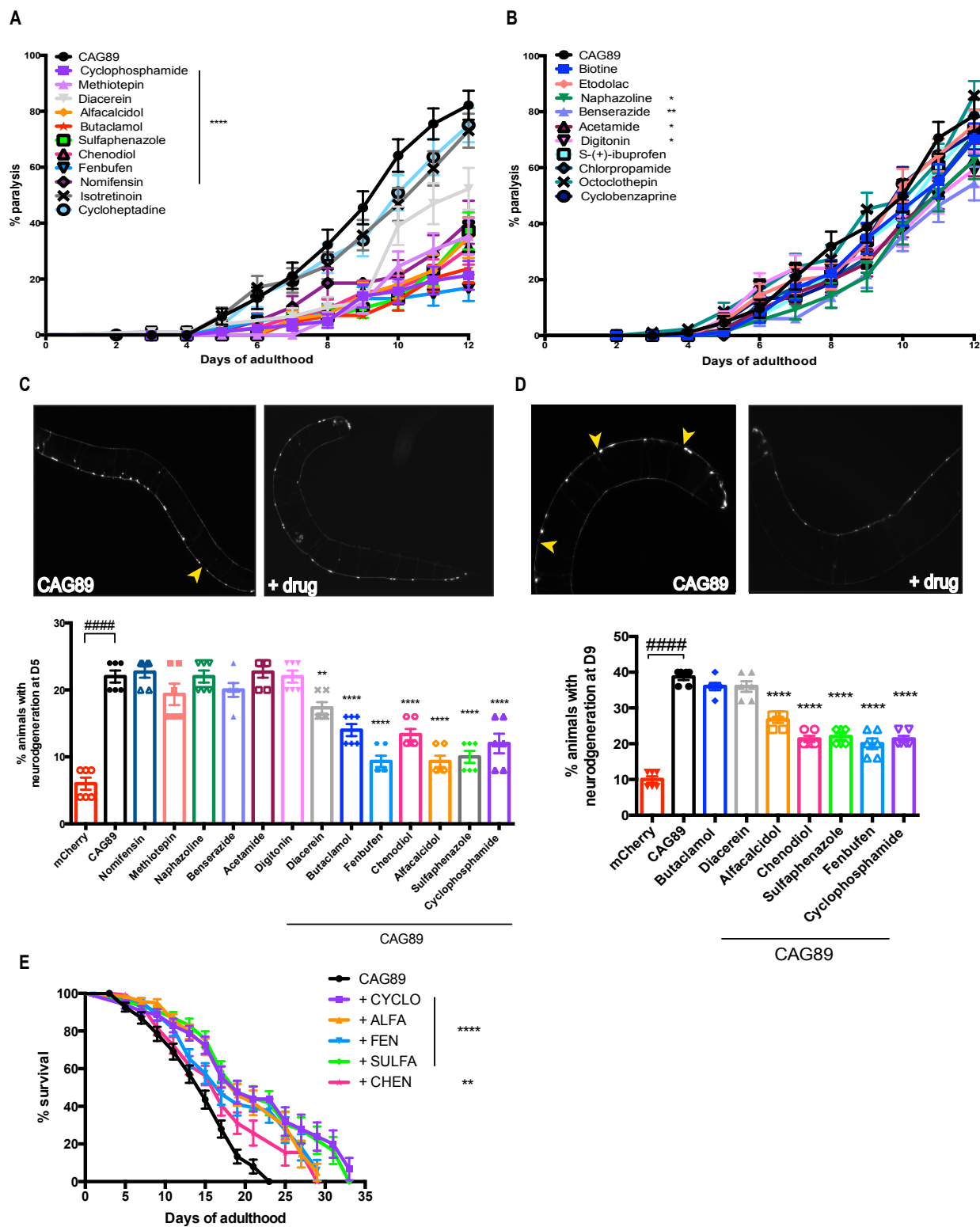


Figure 2.3

**Figure 2.3. Rescue of motility deficit, neurodegeneration and reduce longevity when *ATXN3-CAG89* worms are treated positive compounds at 2  $\mu$ M.**

**(A-B)** Mutant transgenic worms showed a rescue of locomotion impairment when treated with 2  $\mu$ M **(A)** Cyclophosphamide, Methiotepin, Diacerein, Alfacalcidol, Butaclamol, Sulfaphenazole, Chenodiol, Fenbufen or Nomifensin (\*\*\*\* $P < 0.0001$  for all the compounds), as well as, **(B)** Naphazoline (\* $P < 0.05$ ), Benserazide (\*\* $P < 0.01$ ), Acetamide or Chlorpropamide (\* $P < 0.05$  for both compounds) (by log-rank (Mantel-Cox) test,  $N = 90-100$  per trial and,  $N = 270-300$  when all trials combined). This experiment was replicated 3 times.

**(C-D)** Shown are representative photos of living, adult expressing *unc-47p::mCherry; ATXN3-CAG89* transgenic worms at day five and day nine of adulthood with or without drug. The concentration of drugs used for this experience is 2  $\mu$ M. Images are black and white. Arrows indicate gaps or breaks along neuronal processes.

**(C)** Images of the GABAergic motor neurons from an entire *unc-47p::mCherry; ATXN3-CAG89* transgenic worms at adulthood day five with or without drug.

Quantification of neurodegeneration in *unc-47p::mCherry; ATXN3-CAG89* worms at day five of adulthood. Significant neurodegeneration is observed in *unc-47p::mCherry; ATXN3-CAG89* transgenics when compared to the control, *unc-47p::mCherry* (##### $P < 0.0001$ ). Significant rescue of the neurodegeneration morphology was observed in *unc-47p::mCherry; ATXN3-CAG89* worms when treated with 2  $\mu$ M Diacerein (\*\* $P < 0.01$ ), Butaclamol, Fenbufen, Chenodiol, Alfacalcidol, Sulfaphenazole or Cyclophosphamide (\*\*\*\* $P < 0.0001$  for all the previous compounds) (by one-way ANOVA test,  $N = 150$  for each condition). These experiments were done 6 independent times ( $N = 25$  per trial for each condition).

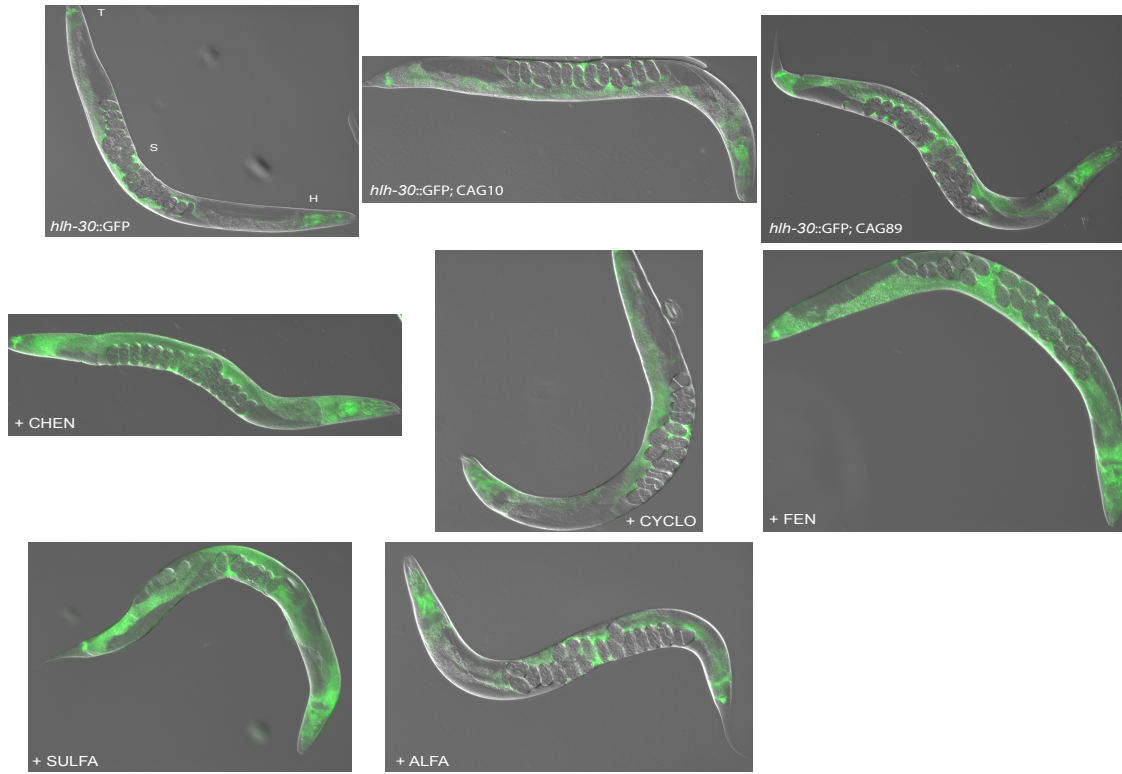
**(D)** Images of degenerating GABAergic motor neurons of *unc-47p::mCherry; ATXN3-CAG89* transgenic worms at adulthood day nine with or without drug.

Quantification of neurodegeneration in transgenic *unc-47p::mCherry; ATXN3-CAG89* worms at day nine of adulthood. Significant neurodegeneration is observed in *unc-47p::mCherry; ATXN3-CAG89* transgenics when compared to the control, *unc-47p::mCherry* (##### $P < 0.0001$ ). This neurodegeneration is rescued when *unc-47p::mCherry; ATXN3-CAG89* worms are treated with Fenbufen, Chenodiol, Alfacalcidol, Sulfaphenazole or Cyclophosphamide (\*\*\*\* $P < 0.0001$  for all compounds) (by one-way ANOVA test,  $N = 150$  for each condition). These experiments were repeated 6 times ( $N = 25$  per trial for each condition).

**(E)** Increased lifespan in *ATXN3-CAG89* worms when treated with 2  $\mu$ M CYCLO, ALFA, FEN or SULFA (\*\*\*\* $P < 0.0001$  for all four compounds) or, CHEN (\*\* $P < 0.01$ ) (by log-rank (Mantel-Cox) test) (N=300-360). The experiment was done 3 times.



A



B

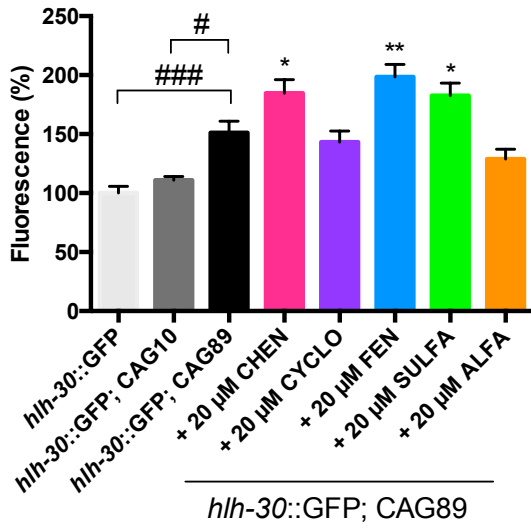


Figure 2.4

**Figure 2.4. Involvement of TFEB/HLH-30, a key regulator of the autophagy process in MJD.**

**(A)** Shown are representative photos of living, adult *hlh-30::GFP*, *hlh-30::GFP; ATXN3-CAG10* and *hlh-30::GFP; ATXN3-CAG89* transgenics at day five of adulthood. *hlh-30::GFP; ATXN3-CAG89* transgenics showed increase GFP expression compared to *hlh-30::GFP*, or *hlh-30::GFP; ATXN3-CAG10* controls (top panels). Treatment with 20  $\mu$ M CHEN, 20  $\mu$ M FEN or 20  $\mu$ M SULFA increased fluorescence of *hlh-30::GFP; ATXN3-CAG89* mutants. *hlh-30::GFP* reporter showed increase fluorescence in the head (H), spermatecha (S) and tail (T) of adult animals.

**(B)** Quantification of fluorescence of transgenics with or without treatment with compounds. An increased fluorescent signal was observed in *hlh-30::GFP; ATXN3-CAG89* worms compared to *hlh-30::GFP* or *hlh-30::GFP; ATXN3-CAG10* controls (#### $P < 0.001$  and # $P < 0.05$  respectively). A significant increased fluorescence was observed in *hlh-30::GFP; ATXN3-CAG89* mutants when treated with 20  $\mu$ M CHEN (\* $P < 0.05$ ), 20  $\mu$ M FEN (\*\* $P < 0.01$ ) or 20  $\mu$ M SULFA (\* $P < 0.05$ ) (by one-way ANOVA test, N=17-20 per trial for each condition). We observed no change in the fluorescence when *hlh-30::GFP; ATXN3-CAG89* mutants were treated with 20  $\mu$ M CYCLO or 20  $\mu$ M ALFA. These experiments were replicated for 3 times.

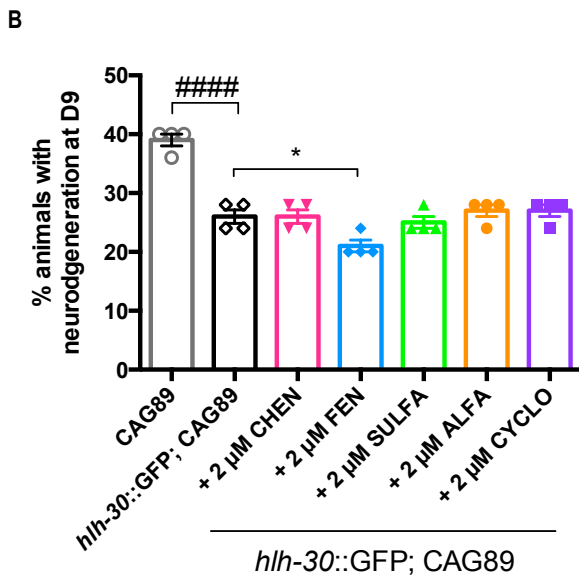
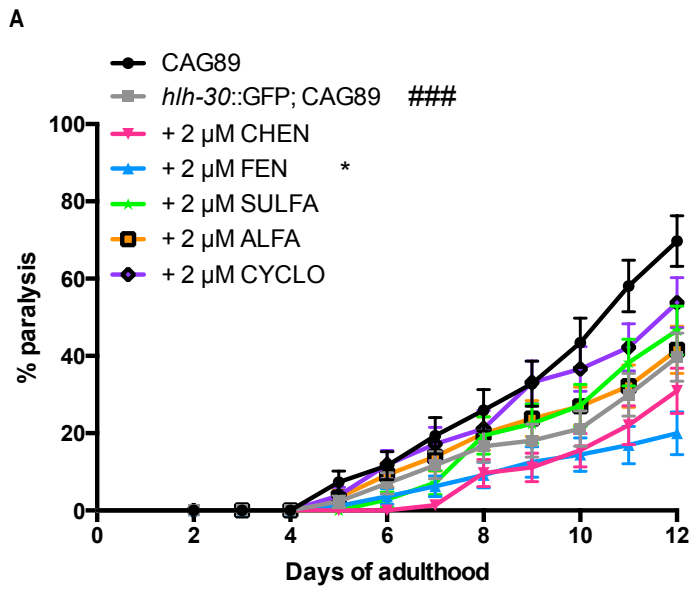


Figure 2.5

**Figure 2.5. Chemical-genetic modulation of *hlh-30* suppresses the neuronal toxicity observed in *ATXN3-CAG89* worms.**

**(A)** Decreased motility defect in *hlh-30::GFP*; *ATXN3-CAG89* worms when compared to the control, *ATXN3-CAG89* transgenics (#### $P < 0.001$ ). When *hlh-30::GFP*; *ATXN3-CAG89* worms are treated with 2  $\mu$ M CHEN, 2  $\mu$ M ALFA, 2  $\mu$ M SULFA, or 2  $\mu$ M CYCLO a similar profile to non treated worms is observed. Rather, a significant rescue of motility is observed in *hlh-30::GFP*; *ATXN3-CAG89* when treated with 2  $\mu$ M FEN ( $*P < 0.05$ ) (by log-rank (Mantel-Cox) test, N= 90-100 per trial and, N=270-300 when all trials combined). These experiments were replicated for 3 times.

**(B)** Quantification of neurodegeneration in *hlh-30::GFP*; (*unc-47p::mCherry*; *ATXN3-CAG89*) worms at day nine of adulthood.

Significant rescue of neurodegeneration in *hlh-30::GFP*; (*unc-47p::mCherry*; *ATXN3-CAG89*) worms was observed when compared to the control at adulthood day nine (##### $P < 0.0001$ ). Treatment of the worms with 2  $\mu$ M CHEN, 2  $\mu$ M ALFA, 2  $\mu$ M SULFA, or 2  $\mu$ M CYCLO showed no additional rescue when compared to untreated *hlh-30::GFP*; (*unc-47p::mCherry*; *ATXN3-CAG89*) worms. Treatment of *hlh-30::GFP*; (*unc-47p::mCherry*; *ATXN3-CAG89*) worms with 2  $\mu$ M FEN ( $*P < 0.05$ ) (by one-way ANOVA test, N=100 for each condition) showed a significant rescue of the neurodegeneration profile. These experiments were done 4 times.

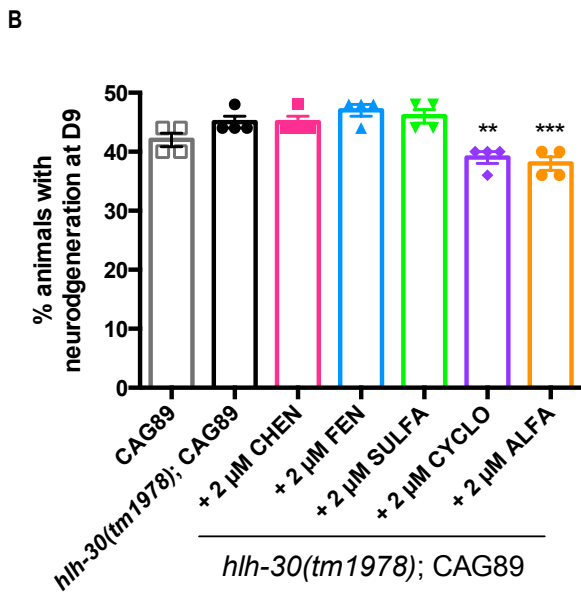
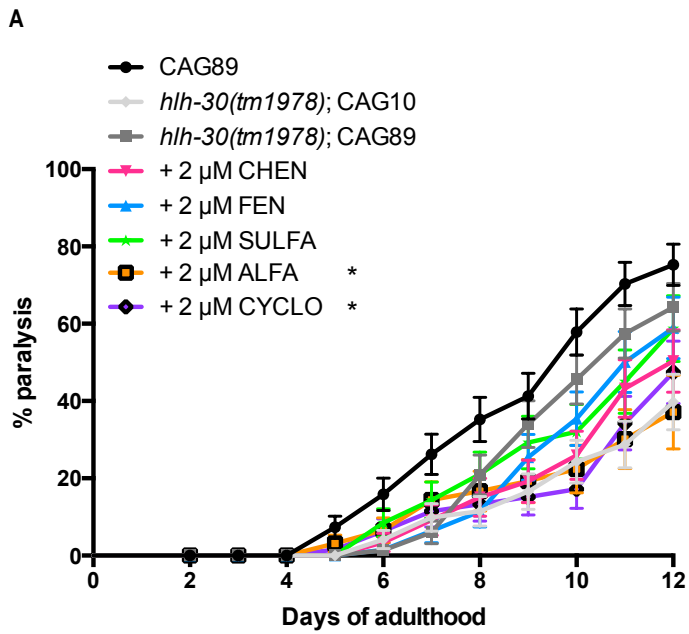


Figure 2.6

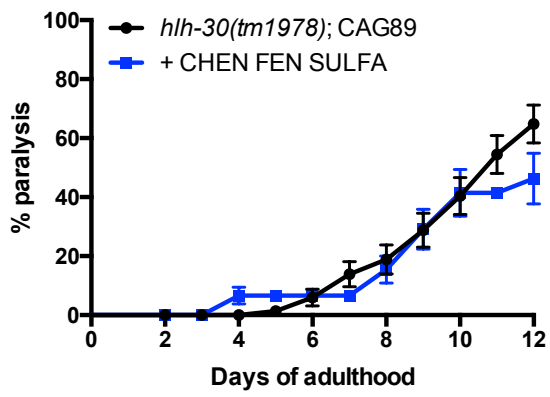
**Figure 2.6. CHEN, FEN and SULFA requires *hll-30* for their neuroprotective activities.**

**(A)** *hll-30(tm1978); ATXN3-CAG89* worms showed a similar paralysis phenotype than the control, *ATXN3-CAG89* mutants. When *hll-30(tm1978); ATXN3-CAG89* worms were treated with 2  $\mu$ M CHEN, 2  $\mu$ M FEN or 2  $\mu$ M SULFA, no rescue in the motility deficit was observed. Treatment with 2  $\mu$ M CYCLO or 2  $\mu$ M ALFA did rescue the motility defect ( $*P < 0.05$  for each compound) (by log-rank (Mantel-Cox) test, N= 90-100 per trial and, N=270-300 when all trials combined). These experiments were replicated for 3 times.

**(B)** Quantification of neurodegeneration in *hll-30(tm1978); (unc-47p::mCherry; ATXN3-CAG89)* worms at adulthood day nine.

No rescue of neurodegeneration was observed in *hll-30(tm1978); (unc-47p::mCherry; ATXN3-CAG89)* worms at adulthood day nine when treated with 2  $\mu$ M CHEN, 2  $\mu$ M FEN or 2  $\mu$ M SULFA. Significant rescue of neurodegeneration in these worms when treated with 2  $\mu$ M CYCLO ( $**P < 0.01$ ) or 2  $\mu$ M ALFA ( $***P < 0.001$ ) (by one-way ANOVA test, N=100 for each condition). These experiments were repeated 4 times.

A



B

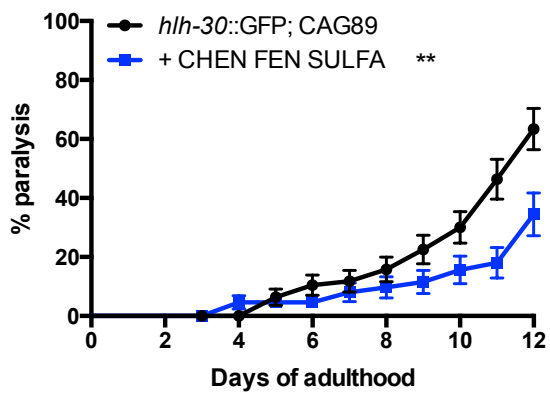


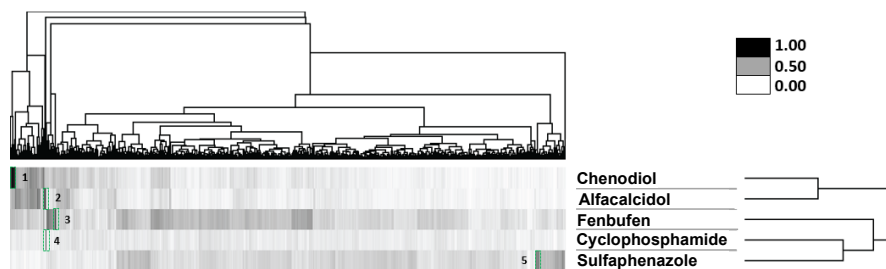
Figure 2.7

**Figure 2.7. Effect of the combination of the three *hllh-30* related compounds on MJD mutants.**

**(A)** No rescue of the locomotion impairment is observed in *hllh-30(tm1978); ATXN3-CAG89* worms when treated with the three compounds simultaneously (by log-rank (Mantel-Cox) test, N= 90-100 per trial and, N=270-300 when all trials combined). These experiments were replicated for 3 times.

**(B)** Significant rescue of the motility defect is observed in *hllh-30::GFP; ATXN3-CAG89* worms when treated with the combination of the three compounds (\*\* $P < 0.01$ ) (by log-rank (Mantel-Cox) test, N=270-300). These experiments were repeated 3 times.



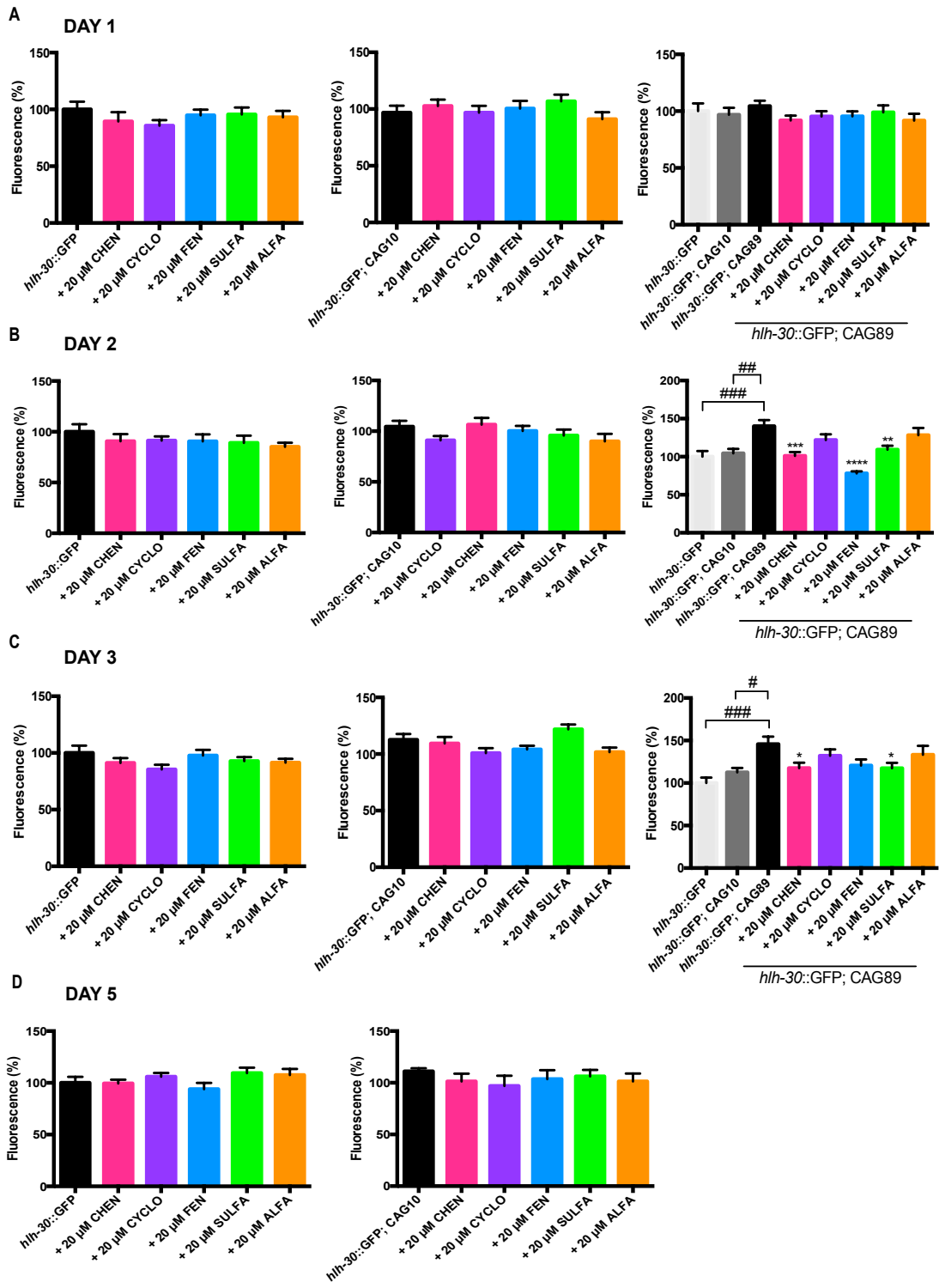


- 1. Steroids (1/16)
- 2. Vitamin D derivatives (1/2)
- 3. Benzenes (1/6)
- 4. Cyclophosphamides (1/2)
- 5. Sulfonamides (1/7)

Supplementary Figure 2.1

**Supplementary Figure 2.1. Heat map visualization of Tanimoto scores from the five hit compounds (y-axis) screened from the Prestwick library (x- axis).**

Using the Tanimoto score, the fingerprint similarity for each pair of compounds was measured. Tanimoto score (as indicated in the legend) has a value range from 0 to 1 representing the percentage of common features shared by two molecules. Chemicals from the same cluster share characteristics of a particular class of compounds. Hierarchical clustering was done based on Tanimoto scores. As demonstrated, molecules with similar structures are associated with similar functions or targets. From the five hit compounds in the Prestwick library, several chemical classes were more represented: vitamin D3 derivatives (\*\* $P = 0.0078$ ), cyclophosphamides (\*\* $P = 0.0078$ ), benzenes (\* $P = 0.0233$ ), and sulfonamides (\* $P = 0.0271$ ) representing ALFA, CYCLO, FEN and SULFA, respectively. All these chemical classes proved to be statistically overrepresented except, the steroids (ns;  $P = 0.0610$ ), such as CHEN. Enrichment for structural similarity of the members of the same cluster was probed using Fisher's exact test. Significance levels were set at rate p-value  $< 0.05$  that were considered hits or not hits out of the total number of the compounds in the interest library.



Supplementary Figure 2.2

**Supplementary Figure 2.2. The effect of the lead compounds on *hlh-30::GFP*, *hlh-30::GFP*; *ATXN3-CAG10* and *hlh-30::GFP*; *ATXN3-CAG89* at different stages of adulthood.**

**(A)** Quantification of fluorescence of *hlh-30::GFP*, *hlh-30::GFP*; *ATXN3-CAG10* and *hlh-30::GFP*; *ATXN3-CAG89* worms with or without treatment with compounds at adulthood day one. We observed no change of fluorescence when worms were treated with the lead compounds (by one-way ANOVA test, N=17-20 for each condition). These experiments were replicated for 3 times.

**(B)** Quantification of fluorescence of *hlh-30::GFP*, *hlh-30::GFP*; *ATXN3-CAG10* and *hlh-30::GFP*; *ATXN3-CAG89* worms with or without treatment with compounds at adulthood day two. We observed no change of fluorescence when *hlh-30::GFP* or *hlh-30::GFP*; *ATXN3-CAG10* worms were treated with the lead compounds (by one-way ANOVA test, N=17-20 for each condition).

An increased fluorescent signal was observed in *hlh-30::GFP*; *ATXN3-CAG89* worms compared to *hlh-30::GFP* or *hlh-30::GFP*; *ATXN3-CAG10* controls (####*P* < 0.001 and ###*P* < 0.01 respectively) at adulthood day two. A significant decreased fluorescence was observed in *hlh-30::GFP*; *ATXN3-CAG89* mutants when treated with 20  $\mu$ M CHEN (\*\*\**P* < 0.001), 20  $\mu$ M FEN (\*\*\*\**P* < 0.0001) or 20  $\mu$ M SULFA (\*\**P* < 0.01) (by one-way ANOVA test, N=17-20 for each condition). We observed no change in the fluorescence when *hlh-30::GFP*; *ATXN3-CAG89* mutants were treated with 20  $\mu$ M CYCLO or 20  $\mu$ M ALFA. These experiments were replicated for 3 times.

**(C)** Quantification of fluorescence of *hlh-30::GFP*, *hlh-30::GFP*; *ATXN3-CAG10* and *hlh-30::GFP*; *ATXN3-CAG89* worms with or without treatment with compounds at adulthood day three. We observed no change of fluorescence when *hlh-30::GFP* or *hlh-30::GFP*; *ATXN3-CAG10* worms were treated with the lead compounds (by one-way ANOVA test, N=17-20 for each condition).

An increased fluorescent signal was observed in *hlh-30::GFP*; *ATXN3-CAG89* worms compared to *hlh-30::GFP* or *hlh-30::GFP*; *ATXN3-CAG10* controls (####*P* < 0.001 and #*P* < 0.05 respectively) at adulthood day three. A significant decreased fluorescence was observed in *hlh-30::GFP*; *ATXN3-CAG89* mutants when treated with 20  $\mu$ M CHEN or 20  $\mu$ M SULFA (\**P* < 0.05 for both compounds) (by one-way ANOVA test, N=17-20 for each condition). We observed no change in the fluorescence when *hlh-30::GFP*; *ATXN3-CAG89* mutants were treated with 20  $\mu$ M

FEN, 20  $\mu$ M CYCLO or 20  $\mu$ M ALFA. These experiments were replicated for 3 times.

**(D)** Quantification of fluorescence of *hlh-30::GFP* and *hlh-30::GFP; ATXN3-CAG10* worms with or without treatment with compounds at adulthood day five. We observed no change of fluorescence when worms were treated with the lead compounds (by one-way ANOVA test, N=17-20 for each condition). These experiments were replicated for 3 times.

**Table S1:** Complete list of all drugs of the specific libraries tested in this study. A total of 3942 drugs from four different companies (Microsource Discovery, Sigma Lopac, Prestwick and Biomol).

*\*\* Disponible en ligne dans la section des matériaux supplémentaires du papier.*

**Table S2:** Raw movement score data for all drugs able to rescue the motility defect observed in *ATXN3-CAG89* mutant transgenic worms. These data are from the liquid culture screen obtained by the MicroTracker machine.

*\*\* Disponible en ligne dans la section des matériaux supplémentaires du papier.*

## **Abbreviations**

MJD: Machado-Joseph disease

SCA: Spinocerebellar ataxia

SCA3: Spinocerebellar ataxia Type 3

PD: Parkinson's disease

AD: Alzheimer's disease

ALS: Amyotrophic lateral sclerosis

ATXN3: Ataxin-3

TFEB: Transcription Factor EB

HLH-30: Helix-loop-helix 30

FDA: Food and Drug Administration



## **Acknowledgments**

We thank CGC, funded by NIH Office of Research Infrastructure Programs (P40 OD010440), which provided many of the *C. elegans* strains used in this study. A very special thanks to Dr. Guy Rouleau (Montreal Neurological Institute and Hospital, McGill University), Dr. Erik Jorgensen (University of Utah) and, Dr. Geraldine Seydoux (John Hopkins, Addgene plasmid 17253) for providing us the essentials to develop our transgenic lines. Special thanks to the cell imaging core facility of CRCHUM for confocal microscopy. A very special thanks to Sarah Peyrard for her technical assistance.

## **Funding**

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and, The Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) to J.A.P. Y.F.G received a doctoral fellowship from the Fonds de recherche du Québec – Santé (FRQS).

## **Conflict of Interest Statement**

*Disclosure statement:* The authors declare no conflict of interests.

## References

1. Schöls L, Bauer P, Schmidt T, Schulte T, Riess O. Autosomal dominant cerebellar ataxias: clinical features, genetics, and pathogenesis. *Lancet Neurol* 2004;35:291-304.
2. van de Warrenburg BP, Sinke RJ, Verschuuren-Bemelmans CC, et al. Spinocerebellar ataxias in the Netherlands: prevalence and age at onset variance analysis. *Neurology* 2002;585:702-8.
3. Da Silva JD, Teixeira-Castro A, Maciel P. From Pathogenesis to Novel Therapeutics for Spinocerebellar Ataxia Type 3: Evading Potholes on the Way to Translation. *Neurotherapeutics* 2019.
4. Xu Z, Tito AJ, Rui YN, Zhang S. Studying polyglutamine diseases in *Drosophila*. *Exp Neurol* 2015;274Pt A:25-41.
5. Matos CA, de Macedo-Ribeiro S, Carvalho AL. Polyglutamine diseases: the special case of ataxin-3 and Machado-Joseph disease. *Prog Neurobiol* 2011;951:26-48.
6. Teixeira-Castro A, Ailion M, Jalles A, et al. Neuron-specific proteotoxicity of mutant ataxin-3 in *C. elegans*: rescue by the DAF-16 and HSF-1 pathways. *Hum Mol Genet* 2011;2015:2996-3009.
7. Teixeira-Castro A, Jalles A, Esteves S, et al. Serotonergic signalling suppresses ataxin 3 aggregation and neurotoxicity in animal models of Machado-Joseph disease. *Brain* 2015;138Pt 11:3221-37.
8. Franca MC, Jr., D'Abreu A, Nucci A, Lopes-Cendes I. Muscle excitability abnormalities in Machado-Joseph disease. *Arch Neurol* 2008;654:525-9.
9. Bettencourt C, Santos C, Kay T, Vasconcelos J, Lima M. Analysis of segregation patterns in Machado-Joseph disease pedigrees. *J Hum Genet* 2008;5310:920-3.
10. Kawaguchi Y, Okamoto T, Taniwaki M, et al. CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nature genetics* 1994;83:221-8.
11. Takiyama Y, Oyanagi S, Kawashima S, et al. A clinical and pathologic study of a large Japanese family with Machado-Joseph disease tightly linked to the DNA markers on chromosome 14q. *Neurology* 1994;447:1302-8.
12. Lima L, Coutinho P. Clinical criteria for diagnosis of Machado-Joseph disease: report of a non-Azorena Portuguese family. *Neurology* 1980;303:319-22.
13. Maciel P, Costa MC, Ferro A, et al. Improvement in the molecular diagnosis of Machado-Joseph disease. *Archives of neurology* 2001;5811:1821-7.
14. Cummings CJ, Zoghbi HY. Fourteen and counting: unraveling trinucleotide repeat diseases. *Human molecular genetics* 2000;96:909-16.
15. Wang G, Ide K, Nukina N, et al. Machado-Joseph disease gene product identified in lymphocytes and brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;2332:476-9.
16. Shao J, Diamond MI. Polyglutamine diseases: emerging concepts in pathogenesis and therapy. *Human molecular genetics* 2007;16 Spec No. 2:R115-23.
17. Brenner S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 1974;771:71-94.

18. Schmeisser K, Fardghassemi Y, Parker JA. A rapid chemical-genetic screen utilizing impaired movement phenotypes in *C. elegans*: Input into genetics of neurodevelopmental disorders. *Exp Neurol* 2017;293:101-14.
19. Stiernagle T. Maintenance of *C. elegans*. *WormBook* 2006:1-11.
20. Fardghassemi Y, Tauffenberger A, Gosselin S, Parker JA. Rescue of ATXN3 neuronal toxicity in *Caenorhabditis elegans* by chemical modification of endoplasmic reticulum stress. *Dis Model Mech* 2017;1012:1465-80.
21. Pohl F, Teixeira-Castro A, Costa MD, et al. GST-4-Dependent Suppression of Neurodegeneration in *C. elegans* Models of Parkinson's and Machado-Joseph Disease by Rapeseed Pomace Extract Supplementation. *Front Neurosci* 2019;13:1091.
22. Vaccaro A, Tauffenberger A, Aggad D, et al. Mutant TDP-43 and FUS cause age-dependent paralysis and neurodegeneration in *C. elegans*. *PLoS One* 2012;72:e31321.
23. Veriepe J, Fossouo L, Parker JA. Neurodegeneration in *C. elegans* models of ALS requires TIR-1/Sarm1 immune pathway activation in neurons. *Nat Commun* 2015;6:7319.
24. Cooper JF, Van Raamsdonk JM. Modeling Parkinson's Disease in *C. elegans*. *J Parkinsons Dis* 2018;81:17-32.
25. Alexander AG, Marfil V, Li C. Use of *Caenorhabditis elegans* as a model to study Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases. *Front Genet* 2014;5:279.
26. Griffin EF, Caldwell KA, Caldwell GA. Genetic and Pharmacological Discovery for Alzheimer's Disease Using *Caenorhabditis elegans*. *ACS Chem Neurosci* 2017;812:2596-606.
27. Patten SA, Parker JA, Wen XY, Drapeau P. Simple animal models for amyotrophic lateral sclerosis drug discovery. *Expert Opin Drug Discov* 2016;118:797-804.
28. Patten SA, Aggad D, Martinez J, et al. Neuroleptics as therapeutic compounds stabilizing neuromuscular transmission in amyotrophic lateral sclerosis. *JCI Insight* 2017;222.
29. Djajadikerta A, Keshri S, Pavel M, et al. Autophagy Induction as a Therapeutic Strategy for Neurodegenerative Diseases. *J Mol Biol* 2019.
30. Lapierre LR, De Magalhaes Filho CD, McQuary PR, et al. The TFEB orthologue HLH-30 regulates autophagy and modulates longevity in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Commun* 2013;4:2267.
31. Denzel MS, Lapierre LR, Mack HID. Emerging topics in *C. elegans* aging research: Transcriptional regulation, stress response and epigenetics. *Mech Ageing Dev* 2019;177:4-21.
32. Kwok TC, Ricker N, Fraser R, et al. A small-molecule screen in *C. elegans* yields a new calcium channel antagonist. *Nature* 2006;4417089:91-5.
33. O'Reilly LP, Luke CJ, Perlmutter DH, Silverman GA, Pak SC. *C. elegans* in high-throughput drug discovery. *Adv Drug Deliv Rev* 2014;69-70:247-53.
34. Ikenaka K, Tsukada Y, Giles AC, et al. A behavior-based drug screening system using a *Caenorhabditis elegans* model of motor neuron disease. *Sci Rep* 2019;91:10104.
35. Koduah P, Paul F, Dorr JM. Vitamin D in the prevention, prediction and treatment of neurodegenerative and neuroinflammatory diseases. *EPMA J* 2017;84:313-25.
36. Eyles DW, Smith S, Kinobe R, Hewison M, McGrath JJ. Distribution of the vitamin D receptor and 1 alpha-hydroxylase in human brain. *J Chem Neuroanat* 2005;291:21-30.

37. Balion C, Griffith LE, Striffler L, et al. Vitamin D, cognition, and dementia: a systematic review and meta-analysis. *Neurology* 2012;7913:1397-405.
38. Munger KL, Levin LI, Hollis BW, Howard NS, Ascherio A. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. *JAMA* 2006;29623:2832-8.
39. Afzal S, Bojesen SE, Nordestgaard BG. Reduced 25-hydroxyvitamin D and risk of Alzheimer's disease and vascular dementia. *Alzheimers Dement* 2014;103:296-302.
40. Bischoff-Ferrari HA, Willett WC, Wong JB, et al. Fracture prevention with vitamin D supplementation: a meta-analysis of randomized controlled trials. *JAMA* 2005;29318:2257-64.
41. Peterson AL, Mancini M, Horak FB. The relationship between balance control and vitamin D in Parkinson's disease-a pilot study. *Mov Disord* 2013;288:1133-7.
42. Peterson AL, Murchison C, Zabetian C, et al. Memory, mood, and vitamin D in persons with Parkinson's disease. *J Parkinsons Dis* 2013;34:547-55.
43. Mark KA, Dumas KJ, Bhaumik D, et al. Vitamin D Promotes Protein Homeostasis and Longevity via the Stress Response Pathway Genes *skn-1*, *ire-1*, and *xbp-1*. *Cell Rep* 2016;175:1227-37.
44. Matos CA, de Almeida LP, Nobrega C. Machado-Joseph disease/spinocerebellar ataxia type 3: lessons from disease pathogenesis and clues into therapy. *J Neurochem* 2019;1481:8-28.
45. Haq SH, AlAfaleq NO, Johari RA. Vitamin D Treatment Reverses the Induced Oxidative Stress Damage to DNA. *Pak J Biol Sci* 2019;221:8-14.
46. Lima LAR, Lopes MJP, Costa RO, et al. Vitamin D protects dopaminergic neurons against neuroinflammation and oxidative stress in hemiparkinsonian rats. *J Neuroinflammation* 2018;151:249.
47. Chen YS, Hong ZX, Lin SZ, Harn HJ. Identifying Therapeutic Targets for Spinocerebellar Ataxia Type 3/Machado-Joseph Disease through Integration of Pathological Biomarkers and Therapeutic Strategies. *Int J Mol Sci* 2020;219.
48. Mendonca LS, Nobrega C, Tavino S, et al. Ibuprofen enhances synaptic function and neural progenitors proliferation markers and improves neuropathology and motor coordination in Machado-Joseph disease models. *Hum Mol Genet* 2019;2822:3691-703.
49. Bazzari FH, Abdallah DM, El-Abhar HS. Chenodeoxycholic Acid Ameliorates A $\beta$ 1-3-Induced Alzheimer's Disease Neurotoxicity and Cognitive Deterioration via Enhanced Insulin Signaling in Rats. *Molecules* 2019;2410.
50. Smith CE, Soti S, Jones TA, et al. Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs Are Caspase Inhibitors. *Cell Chem Biol* 2017;243:281-92.
51. Walker D, Lue LF. Anti-inflammatory and immune therapy for Alzheimer's disease: current status and future directions. *Curr Neuropharmacol* 2007;54:232-43.
52. Harry GJ, Kraft AD. Neuroinflammation and microglia: considerations and approaches for neurotoxicity assessment. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2008;410:1265-77.
53. Hirsch EC, Hunot S. Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? *Lancet Neurol* 2009;84:382-97.
54. Hofmann KW, Schuh AF, Saute J, et al. Interleukin-6 serum levels in patients with Parkinson's disease. *Neurochem Res* 2009;348:1401-4.

55. van der Burg JM, Bjorkqvist M, Brundin P. Beyond the brain: widespread pathology in Huntington's disease. *Lancet Neurol* 2009;88:765-74.
56. Evert BO, Vogt IR, Kindermann C, et al. Inflammatory genes are upregulated in expanded ataxin-3-expressing cell lines and spinocerebellar ataxia type 3 brains. *J Neurosci* 2001;2115:5389-96.
57. Raposo M, Bettencourt C, Ramos A, et al. Promoter Variation and Expression Levels of Inflammatory Genes IL1A, IL1B, IL6 and TNF in Blood of Spinocerebellar Ataxia Type 3 (SCA3) Patients. *Neuromolecular Med* 2017;191:41-5.
58. Costa D, Moutinho L, Lima JL, Fernandes E. Antioxidant activity and inhibition of human neutrophil oxidative burst mediated by arylpropionic acid non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Biol Pharm Bull* 2006;298:1659-70.
59. Duraes F, Pinto M, Sousa E. Old Drugs as New Treatments for Neurodegenerative Diseases. *Pharmaceuticals (Basel)* 2018;112.
60. Awad A, Stuve O. Cyclophosphamide in multiple sclerosis: scientific rationale, history and novel treatment paradigms. *Ther Adv Neurol Disord* 2009;26:50-61.
61. Aisen PS. The potential of anti-inflammatory drugs for the treatment of Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* 2002;15:279-84.
62. Granville DJ, Tashakkor B, Takeuchi C, et al. Reduction of ischemia and reperfusion-induced myocardial damage by cytochrome P450 inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;1015:1321-6.
63. Wang S, Zhang S, Xu C, et al. Chemical Compensation of Mitochondrial Phospholipid Depletion in Yeast and Animal Models of Parkinson's Disease. *PLoS One* 2016;1110:e0164465.
64. Chang Q, Berdyshev E, Cao D, et al. Cytochrome P450 2C epoxygenases mediate photochemical stress-induced death of photoreceptors. *J Biol Chem* 2014;28912:8337-52.
65. Huang C, Liu W, Perry CN, et al. Autophagy and protein kinase C are required for cardioprotection by sulfaphenazole. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010;2982:H570-9.
66. Sheng R, Zhang LS, Han R, et al. Autophagy activation is associated with neuroprotection in a rat model of focal cerebral ischemic preconditioning. *Autophagy* 2010;64:482-94.
67. Nah J, Yuan J, Jung YK. Autophagy in neurodegenerative diseases: from mechanism to therapeutic approach. *Mol Cells* 2015;385:381-9.
68. Nixon RA. The role of autophagy in neurodegenerative disease. *Nat Med* 2013;198:983-97.
69. Fujikake N, Shin M, Shimizu S. Association Between Autophagy and Neurodegenerative Diseases. *Front Neurosci* 2018;12:255.
70. Sittler A, Muriel MP, Marinello M, et al. Deregulation of autophagy in postmortem brains of Machado-Joseph disease patients. *Neuropathology* 2018;382:113-24.
71. Onofre I, Mendonca N, Lopes S, et al. Fibroblasts of Machado Joseph Disease patients reveal autophagy impairment. *Sci Rep* 2016;6:28220.
72. Herzog LK, Kevei E, Marchante R, et al. The Machado-Joseph disease deubiquitylase ataxin-3 interacts with LC3C/GABARAP and promotes autophagy. *Aging Cell* 2020;191:e13051.

73. Duarte-Silva S, Silva-Fernandes A, Neves-Carvalho A, et al. Combined therapy with m-TOR-dependent and -independent autophagy inducers causes neurotoxicity in a mouse model of Machado-Joseph disease. *Neuroscience* 2016;313:162-73.
74. Watchon M, Yuan KC, Mackovski N, et al. Calpain Inhibition Is Protective in Machado-Joseph Disease Zebrafish Due to Induction of Autophagy. *J Neurosci* 2017;3732:7782-94.
75. Schmeisser K, Parker JA. Nicotinamide-N-methyltransferase controls behavior, neurodegeneration and lifespan by regulating neuronal autophagy. *PLoS Genet* 2018;149:e1007561.
76. Simonetta SH, Golombek DA. An automated tracking system for *Caenorhabditis elegans* locomotor behavior and circadian studies application. *J Neurosci Methods* 2007;1612:273-80.
77. Burns AR, Luciani GM, Musso G, et al. *Caenorhabditis elegans* is a useful model for anthelmintic discovery. *Nat Commun* 2015;6:7485.
78. Volpatti JR, Endo Y, Knox J, et al. Identification of drug modifiers for RYR1-related myopathy using a multi-species discovery pipeline. *Elife* 2020;9.

## Chapitre 3.

### **Overexpression of FKH-2/FOXG1 is neuroprotective in a *C. elegans* model of Machado-Joseph disease**

Fardghassemi Y, Parker JA. (2020).

Overexpression of FKH-2/FOXG1 is neuroprotective in a *C. elegans* model of Machado-Joseph disease. *Experimental Neurology*, **337**,113544.

#### Contribution des auteurs:

Y.FG a accompli toutes les expériences, a analysé et assemblé les données, et a écrit le manuscrit (le brouillon original, les modifications/corrections et les réponses aux révisions).

J.A.P a supervisé le projet de recherche, a fourni toutes les ressources nécessaires, et a participé à la rédaction du manuscrit et les réponses aux révisions (modifications/corrections et révisions).

## **Overexpression of FKH-2/FOXG1 is neuroprotective in a *C. elegans* model of Machado-Joseph disease**

Yasmin Fardghassemi <sup>a,b</sup>, J. Alex Parker <sup>a,b,c\*</sup>

<sup>a</sup> *Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), 900 St-Denis Street, Montreal, Quebec H2X 0A9, Canada*

<sup>b</sup> *Department of Biochemistry, University of Montreal, 2900 Edouard Montpetit Blvd, Montreal, Quebec H3T 1J4, Canada*

<sup>c</sup> *Department of Neuroscience, University of Montreal, 2900 Edouard Montpetit Blvd, Montreal, Quebec H3T 1J4, Canada*

\*Corresponding author at:

Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), 900 St-Denis Street, Montreal, Quebec H2X 0A9, Canada.

*E-mail address:* [ja.parker@umontreal.ca](mailto:ja.parker@umontreal.ca) (J.A. Parker).



## **Summary statement**

Discovery of transcription factors modifying (enhancing or suppressing) phenotypes including motility defects, neurodegeneration and reduced longevity in a *C. elegans ATXN3* model for Machado-Joseph disease.

## Abstract

Machado-Joseph disease (MJD), also known as spinocerebellar ataxia type 3 (SCA3), is the most common form of dominantly inherited ataxia worldwide. This disease is caused by an expanded CAG repeat in the coding region of *ATXN3*. Due to our incomplete understanding of mechanisms and molecular pathways related to this disease, there are no therapies that successfully treat core MJD patients. Therefore, the identification of new candidate targets related to this disease is needed.

In this study, we performed a large-scale RNA interference (RNAi) screen of 387 transcription factor genes leading to the identification of several modifiers (suppressors and enhancers) of impaired motility phenotypes in a mutant *ATXN3* transgenic *C. elegans* model. We showed that inactivation of one particular gene, *fkh-2/FOXG1*, enhanced the motility defect, neurodegeneration and reduced longevity in our MJD models. Opposite to genetic inactivation, the overexpression of *fkh-2* rescued the impaired motility, shortened-lifespan, and neurodegeneration phenotypes of mutant *ATXN3* transgenics. We found that overexpression of FKH-2/FOXG1 in *ATXN3* mutant worms is neuroprotective.

Using our transgenic *ATXN3 C. elegans* models and the screening of an RNAi library, we gained insights into the pathways contributing to neurodegeneration, and found that FKH-2/FOXG1 has neuroprotective activity. These findings may aid the development of novel therapeutic interventions for MJD.

**Keywords**

Machado-Joseph disease

Neurodegenerative diseases

*Caenorhabditis elegans*

Ataxin-3

RNAi screening

Neuroprotective gene

## **Abbreviations**

MJD: Machado-Joseph disease

SCA: Spinocerebellar ataxia

SCA3: Spinocerebellar ataxia Type 3

ATXN3: Ataxin-3

FOXO: Forkhead box O

FKH-2: Forkhead transcription factor 2

FOXG1: Forkhead box G1

RNAi: RNA interference

NHR-66: Nuclear hormone receptor 66

## **Acknowledgments**

Some strains were provided by the CGC, which is funded by NIH Office of Research Infrastructure Programs (P40 OD010440). We thank CGC (Caenorhabditis Genetic Center). Also, we thank the *C. elegans* Gene Knockout Project at the Oklahoma Medical Research Foundation, which was part of the International *C. elegans* Gene Knockout Consortium, for providing and making available *fkh-2(ok683)* strain. A very special thanks to Dr. Guy Rouleau (Montreal Neurological Institute and Hospital, McGill University), Dr. Erik Jorgensen (University of Utah), and Dr. Geraldine Seydoux (John Hopkins) for providing us the essentials to develop our transgenic lines and, Dr. Michael M Francis (University of Massachusetts, Worcester MA) for providing us the mCherry transgenic strain. Special thanks to the cell imaging core facility of CRCHUM for confocal microscopy. And finally, a very special thanks to Sarah Peyrard for her technical assistance.

## **Funding**

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and, The Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) to J.A.P. Y.F.G received a doctoral fellowship from the Fonds de recherche du Québec – Santé (FRQS).

## **Declaration of interest**

The authors declare no conflict of interests.

## 1. Introduction

Machado-Joseph disease (MJD), also called spinocerebellar ataxia type 3 (SCA3), is a rare hereditary ataxia. This disease is considered to be the most common form of SCA worldwide (Schöls et al., 2004). It is more highly observed among people of Portuguese/Azorean descent with the highest prevalence in the Azorean island of Flores (1/239) (Bettencourt et al., 2008; Akcimen et al., 2020). MJD, a polyglutamine expansion disease, is a hereditary autosomal dominant neurodegenerative disease characterized mainly by ataxia, spasticity, and/or ocular movement abnormalities along with neurodegeneration in selective regions including the cerebellum, basal ganglia, brainstem and spinal cord (Teixeira-Castro et al., 2011a; Teixeira-Castro et al., 2015; Matos et al., 2011; Franca et al., 2008). This disease is caused by an unstable expansion of the cytosine-adenine-guanine (CAG) trinucleotide repeats within the coding region of the *ATXN3* gene, located on chromosome 14 (14q24.3-14q32.45) (Kawaguchi et al., 1994; Takiyama et al., 1994; Da Silva et al., 2019a; Lima and Coutinho, 1980; Matos et al., 2011; Xu et al., 2015; Da Silva et al., 2019b). The CAG repeat number in healthy individuals is between 10-51, whereas in MJD patients, this repeat is expanded to 55-87 (Maciel et al., 2001; Cummings and Zoghbi, 2000). The mutated *ATXN3* gene when translated contains an abnormal poly-Q tract within the ataxin-3 protein (Kawaguchi et al., 1994; Wang et al., 1997). This abnormal expansion in *ATXN3* gene leads to misfolding of ATXN3 inducing numerous harmful impacts and disrupting cellular homeostasis (Shao and Diamond, 2007; Da Silva et al., 2019a). However, the exact molecular pathways of the disease pathogenesis are still not so fully understood. This lack of knowledge hinders the development of clinical therapies to cure or attenuate the phenotypes associated with this disease.

To study and understand aspects of MJD, we turned to a simple animal model, *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*). *C. elegans* is especially well suited for neuroscience and neurobiology research, and has advanced our knowledge of the cellular and molecular pathways that underlie neurodegeneration (de Carlos Caceres et al., 2018) (Dimitriadi and Hart, 2010; Kaletta and Hengartner, 2006). This nematode is also a pragmatic model for genetic research due to its ease of genetic manipulation, it has a fully mapped genome, and the considerable number of

genetic homologs to vertebrates (60-80% of the *C. elegans* genes are homologous to humans) (Kaletta and Hengartner, 2006; de Carlos Caceres et al., 2018).

*C. elegans* is a model very well suited for large-scale genetic screening (Kern et al., 2018; Lejeune et al., 2012; Hamamichi et al., 2008; de Carlos Caceres et al., 2018). We previously showed that our transgenic *ATXN3* mutant worms presented motility defects along with progressive neurodegeneration and reduced longevity (Fardghassemi et al., 2017). Based on these findings, our goal for this study was to identify modifiers (suppressors and/or enhancers) of *ATXN3* toxicity in our *C. elegans* MJD model. To achieve this goal, we performed a blind RNAi screen of 387 transcription factors clones. This screen allowed us to identify a promising modifier gene, namely forkhead transcription factor 2 (*fkh-2/FOXG1*). Genetic knockdown or deletion of *fkh-2* enhanced toxicity in our *ATXN3* transgenic mutant worms by increasing motor-deficits and neurodegeneration phenotypes, as well as significantly reducing longevity. These findings suggest that that *fkh-2/FOXG1* may be protective against mutant *ATXN3* toxicity, perhaps contributing to MJD. Consistent with these notions, we observed that overexpression of *fkh-2* suppressed *ATXN3* toxicity, namely impaired motility, neurodegeneration and reduced lifespan phenotypes. This study identifies *fkh-2/FOXG1* as a modifier of *ATXN3* toxicity and a potential therapeutic target for MJD.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Nematode strains and maintenance

Standard methods of culturing and handling worms were used (Stiernagle, 2006). Worms were maintained on standard nematode growth media (NGM) plates streaked with OP50 *E. coli*. All strains were scored at 20°C. Strains obtained from the *Caenorhabditis* Genetics Center ((CGC), University of Minnesota, Minneapolis) for this study include: N2, OP185 *unc-119(ed3)* III; *wgls185* [*fkh-2-1::TY1::EGFP::3xFLAG(92C12)* + *unc-119(+)*], TU3311 *uIs60* [*unc-119p::YFP* + *unc-119p::sid-1*], and *fkh-2(ok683)*. Concerning *uIs34* [*Punc-47::mCherry*] transgene, this is a special gift we got from Michael M Francis (University of Massachusetts, Worcester MA). Other strains (*ATXN3* transgenic and crosses) used in this study were: *ATXN3-CAG89* which is (*unc-119(ed3)*; ttTi5605mosII; *xqIs351(unc-47p::ATXN3-CAG89; unc-119(+))*), (*unc-47p::mCherry; ATXN3-CAG89*), *ATXN3-CAG89; uIs60* [*unc-119p::YFP* + *unc-119p::sid-1*], (*unc-47p::mCherry; ATXN3-CAG89*); (*uIs60* [*unc-119p::YFP* + *unc-119p::sid-1*]), *ATXN3-CAG89; fkh-2(ok683)*, (*unc-47p::mCherry; ATXN3-CAG89*); *fkh-2(ok683)*, *ATXN3-CAG89; (unc-119(ed3)* III; *wgls185* [*fkh-2-1::TY1::EGFP::3xFLAG(92C12)* + *unc-119(+)*]), and (*unc-47p::mCherry; ATXN3-CAG89*); (*unc-119(ed3)* III; *wgls185* [*fkh-2-1::TY1::EGFP::3xFLAG(92C12)* + *unc-119(+)*]).

### 2.2. Transgenic *ATXN3* worms and plasmid constructs

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 (from Dr. Erik Jorgensen, University of Utah), the *unc-54* 3'UTR plasmid pCM5.37 (from Dr. Geraldine Seydoux, John Hopkins, Addgene plasmid 17253) and the destination vector pCFJ150 to create *unc-47p::ATXN3-CAG10* and *unc-47p::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 generated for each transgene and those showing behaving similarity were outcrossed and kept for further analysis. The strain used in this study include:



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

### 2.3. RNAi experiments

RNAi-treated *ATXN3-CAG89; uIs60 [unc-119p::YFP + unc-119p::sid-1]* worms were fed with *E. coli* (HT115) containing an empty vector (EV) or *E. coli* expressing dsRNA against the interest gene. *uIs60* represents an integrated array of *P<sub>unc-119</sub>sid-1* and *P<sub>unc-119</sub>yfp* expressing YFP and SID-1 in all neurones and, is hypersensitive neuronal RNAi by feeding (Calixto et al., 2010). *SID-1* is involved in RNA interference and double-stranded RNA transport (Whangbo et al., 2017). The RNAi clones were from the ORFeome RNAi library (Source BioScience, UK) and compared to empty vector (L4440). To confirm correct clones sequencing was performed. RNAi experiments were performed at 20°C. Synchronized worms were grown on NGM plates until adult day one and then, transferred on RNAi plates containing 1 mM isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) and 50 µg/mL ampicilline.

### 2.4. RNAi screen

The swimming activity of the nematodes was measured using a worm tracking machine (*WMicroTracker*, Phylum Tech) (Simonetta and Golombek, 2007). This machine is able to measure automatically the movement of the worms in liquid culture placed in a 96-well-microtiter plate for several hours. The apparatus makes use of two infrared light beams crossing each microtiter well from top to bottom, and a detector determines how often worms moving in the well interrupt the light rays. The signal was used to calculate a movement score, which is the amount of the worms moving in a fixed period of time. Briefly, worms were exposed from adult day one to adult day five on corresponding RNAi plates and then, were transferred into a 96-well-microtiter plate. Each well contained a final volume of 100 µL of M9 buffer (1M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1M NaCl, 1M MgSO<sub>4</sub>), and ~50 worms adult day five (obtained by synchronization (Fardghassemi et al., 2017)). The nematodes swimming movements were tracked for ten hours. Two independent screening experiments were completed in *ATXN3-CAG89; uIs60* worms in order to identify modifiers (suppressors and/or enhancers) involved in MJD. Measurements were performed in triplicates and the average movement score was compared to the untreated *ATXN3-CAG89; uIs60* mutants (EV control). If the values were higher than the control for a certain

RNAi, then a secondary screen was performed to validate our observations. Candidates that modified (suppressed and/or enhanced) significantly the swimming movement of *ATXN3-CAG89; uls60* worms in the secondary screen were considered as hit candidates and so, were investigated and validated on other type of approaches.

### 2.5. Paralysis assays on solid media

Worms were scored for paralysis from adult day one to adult day twelve as described previously (Fardghassemi et al., 2017). Briefly, 30 L4 worms (obtained by synchronization) were transferred to NGM plates and from adult day one to adult day twelve, were counted as paralysed if they failed to move after being prodded with a worm pick. Worms scored as dead if they failed to respond to tactile head stimulus. They were transferred to fresh plates every 2 days. All experiments were conducted at 20°C and, each condition was done in triplicates with 30 worms/plate.

### 2.6. Lifespan assays

Briefly, 40 L4 worms were transferred to NGM plates and tested every 2 days from adult day one until death. Worms were scored as dead if they failed to respond to tactile stimulus. Dead worms displaying internally hatched progeny, extruded gonads, or that crawled off the plate were excluded. All experiments were conducted at 20°C and, each condition was done in triplicates with 40 worms/plate.

### 2.7. Neurodegeneration assays

To visualize the neurons, we crossed the transgenic *ATXN3-CAG89* worms with an integrated reporter, *unc-47p::mCherry*, expressing the red fluorescent protein mCherry in GABAergic motor neurons (Petrash et al., 2013). For scoring of neuronal processes for gaps or breakages, worms were collected at adult day five and day nine for visualization of motor neurons processes *in vivo*. Worms were immobilized with 60% glycerol and mounted on slides with 2% agarose pads. mCherry was visualized at 595 nm using a Zeiss Axio Imager M2 microscope. The software used was AxioVs40 4.8.2.0. 150 worms were scored per condition for the neurodegeneration assays. Image processing was done with Adobe Photoshop. Student's *t*-test was used for statistical analysis.

## 2.8. *Statistics*

Movement scores over time were compared between different RNAi treatments using ANOVA test to determine significance. Paralysis and lifespan curves were generated and compared using the Log-rank (Mantel-Cox) test and, three independent experiments were done for each assay. For neurodegeneration, Student's *t*-tests were used and, six independent experiments were conducted. Prism (GraphPad Software) was used for all statistical analyses.

### 3. Results

#### 3.1. Genetic screen in *ATXN3* mutant RNAi sensitive *C. elegans*

It has been previously reported that *ATXN3* interacts and regulates several transcription factors and, in MJD cases, this regulation is impaired (Zou et al., 2019; Gao et al., 2019; Shi et al., 2018; Gao et al., 2015; Zeng et al., 2018; Araujo et al., 2011). Indeed, one of these studies has shown that *ATXN3* interacts with the forkhead box O (FOXO) transcription factor FOXO4 and, plays an important role in regulating the FOXO4-dependent antioxidant stress response, which is disrupted in MJD (Araujo et al., 2011). Based on these studies, we wanted to evaluate if we could make use of our transgenic *C. elegans* MJD models (Fardghassemi et al., 2017) to identify additional transcription factors contributing to *ATXN3* toxicity. As previously described (Fardghassemi et al., 2017), in order to create our transgenic MJD models, we used MoSCi transposon-mediated single-copy insertion into the genome (Frokjaer-Jensen et al., 2014), by expressing full-length human *ATXN3* cDNA in *C. elegans*. We expressed wild-type (*ATXN3*-CAG10) and mutant (*ATXN3*-CAG89) human *ATXN3* in the worm's 26 GABAergic motor neurons with the vesicular GABA transporter, *unc-47* promoter. We then performed a liquid-culture based screen of a library containing 387 transcription factor clones using a mutant *ATXN3* transgenic strain that also contained a RNAi-sensitizing transgene (strain *ATXN3*-CAG89; *uIs60* [*unc-119p::YFP* + *unc-119p::sid-1*]) (**Fig. 3.1, Table S1**). This screen was done by using an automated worm-tracking machine (*WMicroTracker*, Phylum Tech) able to measure the swimming activity of the worms for a fixed period of time (Simonetta and Golombek, 2007). The goal of this screen was to identify modifiers (suppressors and/or enhancers) potentially involved in MJD. This screen allowed us to identify 22 hit candidates able to significantly suppress or enhance the impaired motility phenotype (swimming activity) of *ATXN3*-CAG89; *uIs60* animals when treated with RNAi knockdown transcription factor clones comparatively to the untreated control *ATXN3*-CAG89; *uIs60* worms (empty vector (EV)) (**Fig. 3.1, Table S2**). These candidates were then evaluated by sequence validation and homology with human genes sequences. From these, 11 modifiers (2 suppressors and 9 enhancers) respecting these two parameters were kept for further analysis (**Fig. 3.1, Table S3, Suppl. Fig. 3.1**).

We next moved to confirm our findings by validating the modifiers using a solid-media approach (paralysis assays) in order to evaluate the effect of the modifiers on the motility phenotype of our MJD RNAi-sensitive worms. *ATXN3*-CAG89; *uIs60* animals were grown on

NGM plates and individually treated with RNAi against the 11 modifier genes. From these 11 putative modifiers, only 2 showed significant effects, as RNAi knockdown of either nuclear hormone receptor 66, *nhr-66* RNAi (T09A12.4 clone), or forkhead transcription factor 2, *fkh-2* RNAi (T14G12.4 clone), impaired the motility of *ATXN3*-CAG89; *uIs60* animals (**Fig. 3.2A, Suppl. Fig. 3.2**). None of the remaining 9 putative modifiers reached levels of statistical significance in the solid media assays (**Suppl. Fig. 3.2**). Also, we observed that on solid-media *fkh-2* RNAi (T14G12.4 clone) enhanced the motility defect in the MJD RNAi sensitive worms, contrary to the liquid culture in which it was acting as a suppressor (**Fig. 3.2A, Suppl. Fig. 3.2**). These disparities could be due to the inherent differences in screening in liquid culture versus solid media, where for example in the liquid culture assays the worms were exposed to dsRNA during five days, while on solid media RNAi treatment was conducted over a period of twelve days. An alternative may be to test if genetically deleting the putative modifier genes affects *ATXN3* toxicity.

Furthermore, we rescreened *fkh-2* and *nhr-66*, our two final hits, in liquid assay using the same methodology. We observed that RNAi against *nhr-66* increased, and *fkh-2* decreased the motility of *ATXN3*-CAG89; *uIs60* animals in liquid culture compared to empty vector (EV) control (**Suppl. Fig. 3.3**). Thus, multiple rounds of testing confirm that *fkh-2* and *nhr-66* are modifiers of *ATXN3* in *C. elegans*.

Finally, as we have previously shown that the expression of *ATXN3*-CAG89 is accompanied by progressive motor neuron degeneration (Fardghassemi et al., 2017), we investigated if either of the two transcription factors modified neurodegeneration. Indeed, we wanted to evaluate if any of these modifiers was able to enhance or suppress the neurodegeneration (gaps and/or breaks in motor neurones) observed previously in our MJD model. In order to be able to evaluate the neurodegeneration, we crossed *ATXN3*-CAG89 RNAi sensitive worms with an integrated reporter transgene, *unc-47p::mCherry*, expressing the red fluorescent protein mCherry in GABAergic motor neurons (Pettrash et al., 2013). We treated *unc-47p::mCherry*; *ATXN3*-CAG89; *uIs60* (*unc-119p::YFP* + *unc-119p::sid-1*) animals with either *fkh-2* and *nhr-66* RNAi and assayed for motor neuron degeneration at days five and nine of adulthood. We observed increased motor neuron degeneration in animals treated with *fkh-2* or *nhr-66* RNAi compared to EV controls (**Fig. 3.2B, C**). These data suggest that the toxicity in MJD transgenic worms is enhanced when *nhr-66* or *fkh-2* genes are silenced.

### 3.2. *fkh-2/FOXG1* is specific to MJD and, required in lifespan in *ATXN3-CAG89* transgenics

Next we wanted to know if the enhancement of motility defects by *fkh-2* and *nhr-66* was specific to animals expressing mutant *ATXN3-CAG89*. Thus we treated *uIs60* [*unc-119p::YFP* + *unc-119p::sid-1*] worms with *fkh-2* or *nhr-66* RNAi and observed that *nhr-66* RNAi significantly enhanced motility defects in *uIs60* animals compared to *fkh-2* RNAi animals or EV controls (**Fig. 3.3A**). These data suggest that *nhr-66* RNAi may non-specifically enhance motility defects, while the enhancer effects of *fkh-2* RNAi may be specific to *ATXN3-CAG89*.

Also, as forkhead box proteins have been linked to longevity (Tuteja and Kaestner, 2007b; Tuteja and Kaestner, 2007a), we wanted to know if *fkh-2/FOXG1* knockdown had any effect on the lifespan of our MJD model. We observed that RNAi against *fkh-2* led to a significant decrease of lifespan in *ATXN3-CAG89* RNAi-sensitive animals compared to EV controls (**Fig. 3.3B**). These data suggest that *fkh-2/FOXG1* might have a protective role against *ATXN3* toxicity.

### 3.3. *fkh-2/FOXG1* deletion increases paralysis and neurodegeneration phenotypes, and reduce longevity in MJD worms

Following the toxic effects caused by RNAi knockdown of *fkh-2* on MJD worms, we wanted to evaluate the motility and neurodegeneration phenotypes in our *ATXN3-CAG89* worms when crossed with *fkh-2* genetic loss-of-function (LOF) strain. We observed increased motility defects (**Fig. 3.4A**), as well as, motor neuron degeneration at days five and nine of adulthood (**Fig. 3.4B, C**) in *ATXN3-CAG89; fkh-2(ok683)* worms when compared to *ATXN3-CAG89* transgenics. Also, we observed a shorter lifespan in *ATXN3-CAG89; fkh-2(ok683)* worms when compared to *ATXN3-CAG89* mutants (**Fig. 3.4D**). These data confirm the conclusions drawn from the genetic knockdown of *fkh-2* experiments and, suggest that *fkh-2/FOXG1* could be potentially be a neuroprotective gene in the context of MJD.

### 3.4. Overexpression of *fkh-2/FOXG1* is neuroprotective in *ATXN3-CAG89* transgenics

RNAi knockdown of *fkh-2* results in enhancement of motility deficits, neurodegeneration as well as reduced lifespan in *ATXN3-CAG89* transgenics, thus we hypothesized that *fkh-2* has a neuroprotective role. One way to test this notion is by increasing the expression of *fkh-2* in *ATXN3-CAG89* animals. Thus we made use of transgenic strain OP185 expressing full-length

*fkh-2*, *wgIs185* [*fkh-2-1::TY1::EGFP::3xFLAG(92C12)* + *unc-119(+)*] (Sarov et al., 2006; Gerstein et al., 2010), referred to here as *fkh-2(OE)* and crossed it to our *ATXN3-CAG89* animals. We observed that *ATXN3-CAG89; fkh-2(OE)* animals displayed a lower rate of progressive paralysis compared to *ATXN3-CAG89* transgenic controls (**Fig. 3.5A**). Furthermore, *ATXN3-CAG89; fkh-2(OE)* animals showed less degeneration of motor neurons at adulthood days five and nine when compared to the control *ATXN3-CAG89* transgenics (**Fig. 3.5B,C**). Finally, *ATXN3-CAG89; fkh-2(OE)* animals had longer lifespans than *ATXN3-CAG89* worms (**Fig. 3.5D**). Altogether, these data suggest that increased expression of *fkh-2/FOXP1* may be neuroprotective, and mitigates several deleterious phenotypes associated with mutant *ATXN3-CAG89*.

## 4. Discussion

Genetic screening in *C. elegans*, a simple and easy-maintained model organism, is a popular and effective tool to identify molecular and cellular pathways contributing to a better understanding of the disease and development of possible therapies (Schmeisser et al., 2017; Kwok et al., 2006; O'Reilly et al., 2014; Ikenaka et al., 2019; Hamamichi et al., 2008). In this study, we used this approach in order to find genes involved in MJD. The aim of this study was to identify novel modifiers, suppressors and/or enhancers, related to this neurodegenerative disease. We performed an RNAi screen of 387 transcription factors by using a *C. elegans* model for MJD that led to the identification of *fkh-2/FOXG1* as a potential neuroprotective gene. Genetic knockdown or deletion of *fkh-2* worsened motility phenotypes, enhanced neurodegeneration and reduced longevity in mutant *ATXN3* transgenics. Consistent with a putative neuroprotective role, the overexpression of *fkh-2* rescued negative phenotypes caused by mutant *ATXN3*, including neurodegeneration as well as motility and lifespan deficits. The overexpression of *fkh-2* stabilizes the neurones and regulates the toxic destabilizing effect caused by mutant *ATXN3*-CAG89 mutant worms.

The *C. elegans* genome encodes 15 forkhead transcription factors (Hope et al., 2003), and a previous study using a different *C. elegans* model for *ATXN3*, showed that DAF-16 (ortholog of human FOXO (forkhead box O)), suppressed of mutant ataxin-3 aggregation and neuronal dysfunction in their MJD model (Teixeira-Castro et al., 2011b). The transcription factor RNAi library we used for our initial screen contains 12 of the 15 *C. elegans* forkhead transcription factor genes (including *daf-16*) but only *fkh-2* emerged as a modifier in our screen.

*fkh-2* is an ortholog of human forkhead box G1 (*FOXG1*). The *FOXG1* protein has repressor activity and mutations in the *FOXG1* are associated with causing *FOXG1* syndrome, a rare disorder characterized mainly by impaired development and structural brain abnormalities (Florian et al., 2012). It has been shown that when *FOXG1* is mutated, series of complications are observed, such as dysregulation of excitatory and inhibitory neurons differentiations, alteration of dendritogenesis and neuronal plasticity, abnormal cortico-cortical connections, brain anomalies and movement disorders (Wong et al., 2019). *FOXG1* has an impact on neurogenesis and, is involved in signalling pathways that are important in neurodevelopment, promotes proliferation, survival and differentiation of neurons or other cell types (Wong et al., 2019). In *C. elegans*, *fkh-*



2 is involved in several processes including neuronal differentiation and is required for the proper development of certain chemosensory neurons and dendritic structures (Hope et al., 2003), but little is known about its genetic interactions. In a study done in yeast, it has been shown that *FKH1* and *FKH2* genes are implicated in stress resistance and survival in response to severe caloric restriction. Indeed, deletions of *FKH1* and *FKH2* impair normal lifespan and stress resistance, while overexpression of these genes extend lifespan and augment cellular stress responses (Postnikoff et al., 2012). We observed an analogous situation for *fkh-2*, but here in the context of deleterious phenotypes linked to the expression of mutant ATXN3. Our present work suggests that the role of *fkh-2* in modulating cellular stress responses may be evolutionarily conserved. Furthermore, the putative neuroprotective activity of *fkh-2* in *C. elegans* suggests that FOXG1 may be a therapeutic target for MJD.

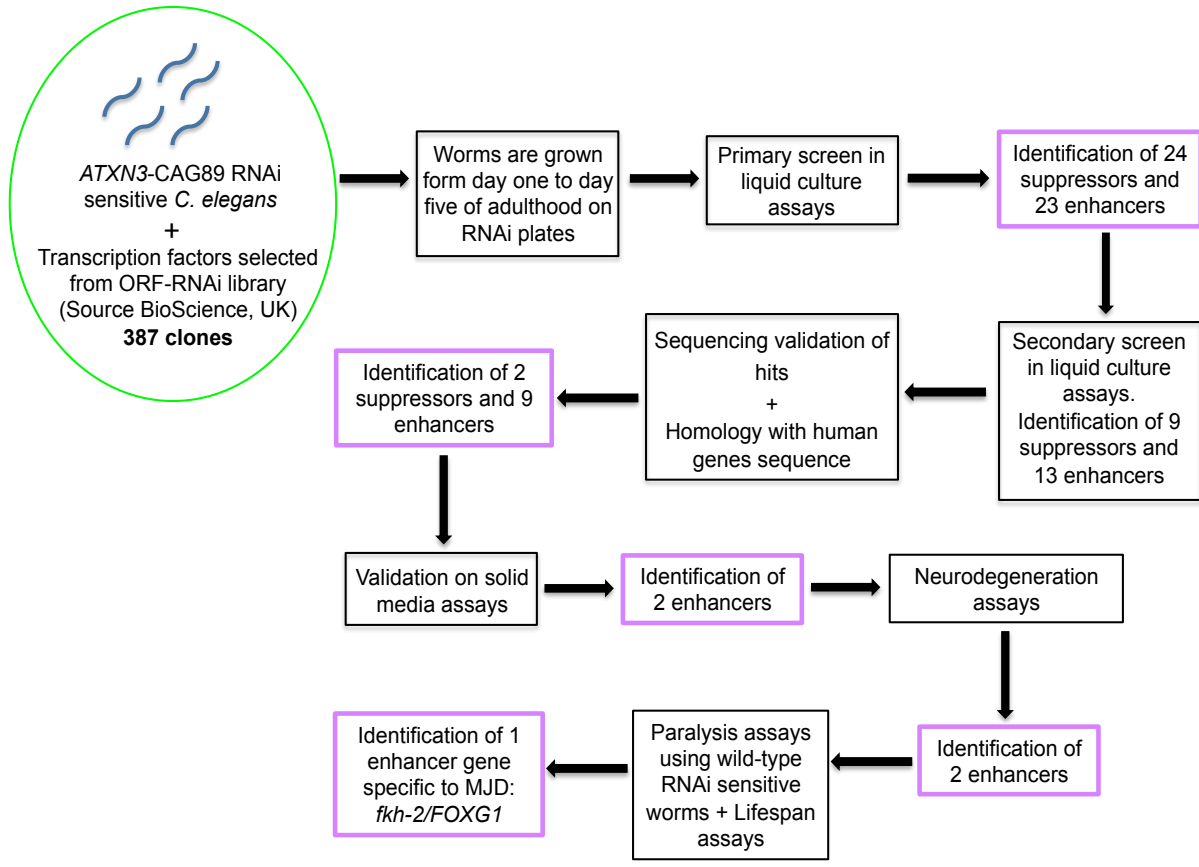
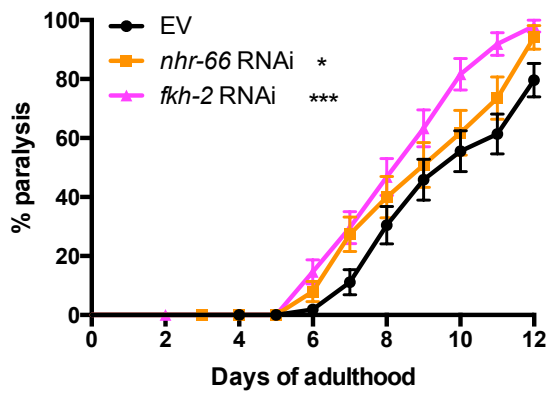


Figure 3.1

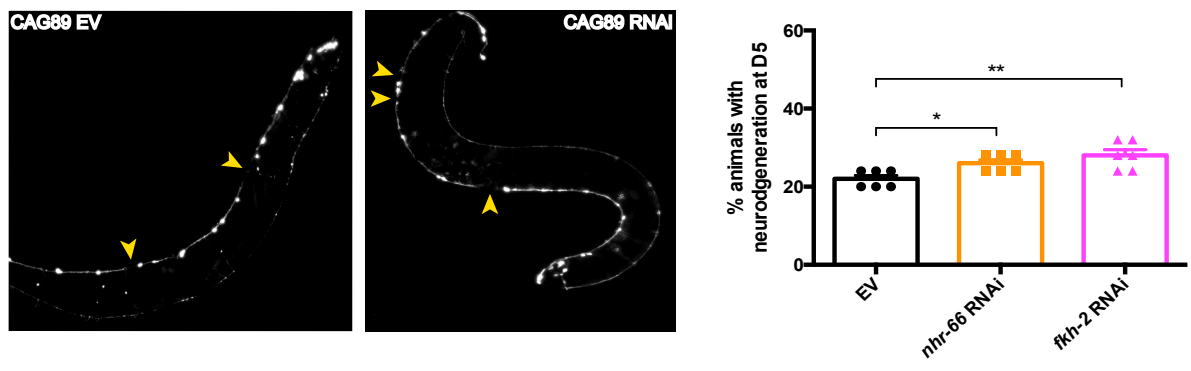
**Figure 3.1. Genetic screen in *ATXN3-CAG89* mutant RNAi sensitive worms.**

We screened 387 clones (all transcription factors from ORF-RNAi library (Source Bioscience, UK)) in *ATXN3-CAG89; uIs60 [unc-119p::YFP + unc-119p::sid-1]* mutants (*uIs60* express YFP and SID-1 in all neurons and, is an hypersensitive neuronal RNAi strain by feeding (Calixto et al., 2010)) by using the *WMicroTracker* machine. Worms were grown on normal NGM plates until adult day one and then, transferred on RNAi plates until adulthood day five to be then transferred for the screening. Controls used were N2 wild-type worms and *ATXN3-CAG89* RNAi sensitive mutants untreated (EV). The primary screen allowed us to identify from the 387 candidates, 47 modifiers (24 suppressors and 23 enhancers) having the capacity to significantly modify the swimming movement of *ATXN3-CAG89* RNAi sensitive mutants. These modifiers were then subject for a secondary screen (using the same methodology than the primary screen). From this screen, we identified 22 modifiers (9 suppressors and 13 enhancers) able to significantly enhance or suppress the impaired movement phenotype observed in *ATXN3-CAG89; uIs60* transgenics. Movement scores over time were compared between different RNAi treatments (two independent experiments) using ANOVA test to determine significance. From the 22 candidates obtained from the screen, only 11 showed sequence validation and homology with human genes sequences and so, were kept for the following experiments. After numerous assays (sequencing of clones, homology with human sequences, paralysis, neurodegeneration and lifespan) we identified the transcription factor gene, *fkh-2/FOXG1* as a modifier of *fkh-2*.

A



B



C

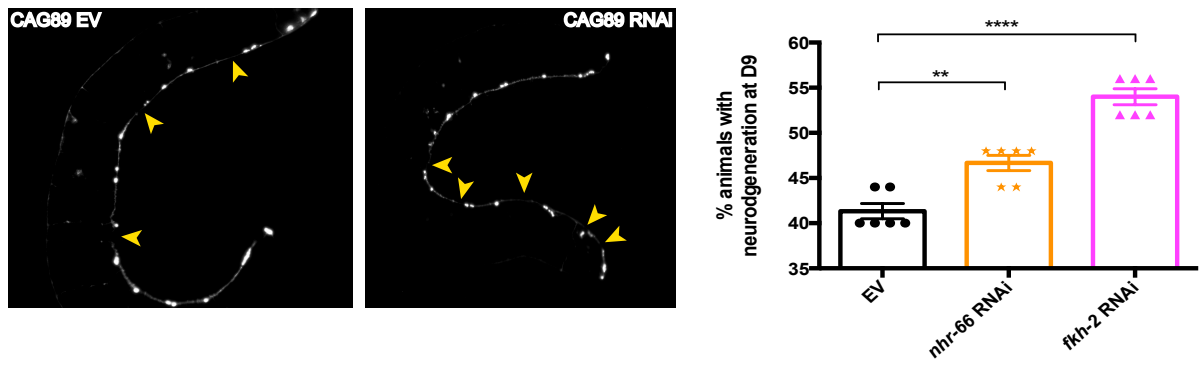


Figure 3.2

**Figure 3.2. *nhr-66* RNAi and *fkh-2* RNAi enhance motility defects and the neurodegeneration phenotypes in the MJD worms.**

**(A)** The motor deficit phenotype observed in *ATXN3*-CAG89 RNAi sensitive worms (*ATXN3*-CAG89; *uls60* [*unc-119p*::YFP + *unc-119p*::*sid-1*]) was significantly enhanced when treated with *nhr-66* RNAi (\**P* < 0.05) or, *fkh-2* RNAi (\*\*\**P* < 0.001) when compared to the control (EV) (by log-rank (Mantel-Cox) test, N=270-300). These experiments were replicated for 3 times.

**(B-C)** Shown are representative photos of living, adult expressing (*unc-47p*::mCherry; *ATXN3*-CAG89); *uls60* [*unc-119p*::YFP + *unc-119p*::*sid-1*] untreated worms (CAG89 EV) and (*unc-47p*::mCherry; *ATXN3*-CAG89); *uls60* [*unc-119p*::YFP + *unc-119p*::*sid-1*] treated worms with either *fkh-2* and *nhr-66* RNAi (CAG89 RNAi) at day five and day nine of adulthood. Images are in black and white. Arrows indicate gaps or breaks along neuronal processes.

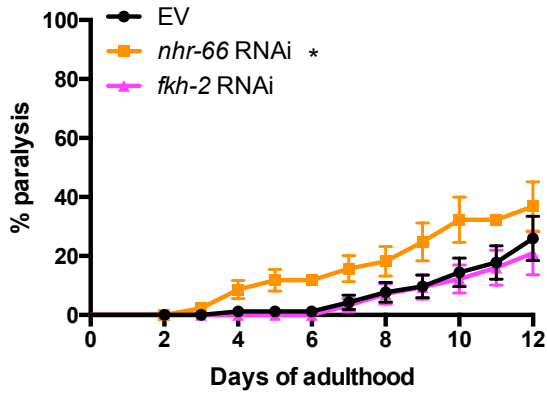
**(B)** Images of the GABAergic motor neurons from an entire (*unc-47p*::mCherry; *ATXN3*-CAG89); *uls60* [*unc-119p*::YFP + *unc-119p*::*sid-1*] untreated worms (CAG89 EV) and (*unc-47p*::mCherry; *ATXN3*-CAG89); *uls60* [*unc-119p*::YFP + *unc-119p*::*sid-1*] treated mutants with either *fkh-2* and *nhr-66* RNAi (CAG89 RNAi) at adulthood day five.

Quantification of neurodegeneration in (*unc-47p*::mCherry; *ATXN3*-CAG89); *uls60* [*unc-119p*::YFP + *unc-119p*::*sid-1*] worms at day five of adulthood. Significant increase of the neurodegeneration is observed in *unc-47p*::mCherry; *ATXN3*-CAG89 RNAi sensitive worms when treated with *nhr-66* RNAi (\**P* < 0.05) or *fkh-2* RNAi (\*\**P* < 0.01) comparatively to the untreated *unc-47p*::mCherry; *ATXN3*-CAG89 RNAi sensitive worms (EV) (by Student's *t*-test, N=150 for each condition). These experiments were repeated 6 independent times.

**(C)** Images of degenerating GABAergic motor neurons of (*unc-47p*::mCherry; *ATXN3*-CAG89); *uls60* [*unc-119p*::YFP + *unc-119p*::*sid-1*] untreated worms (CAG89 EV) and (*unc-47p*::mCherry; *ATXN3*-CAG89); *uls60* [*unc-119p*::YFP + *unc-119p*::*sid-1*] treated animals with either *fkh-2* and *nhr-66* RNAi (CAG89 RNAi) at adulthood day nine.

Quantification of neurodegeneration in *unc-47p*::mCherry; *ATXN3*-CAG89 RNAi sensitive worms at day nine of adulthood. Neurodegeneration was enhanced in *unc-47p*::mCherry; *ATXN3*-CAG89 RNAi sensitive worms when treated with *nhr-66* RNAi (\*\**P* < 0.01) or *fkh-2* RNAi (\*\*\**P* < 0.0001) comparatively to the untreated *unc-47p*::mCherry; *ATXN3*-CAG89 RNAi sensitive worms (EV) (by Student's *t*-test, N=150 for each condition). These experiments were repeated 6 times.

A



B

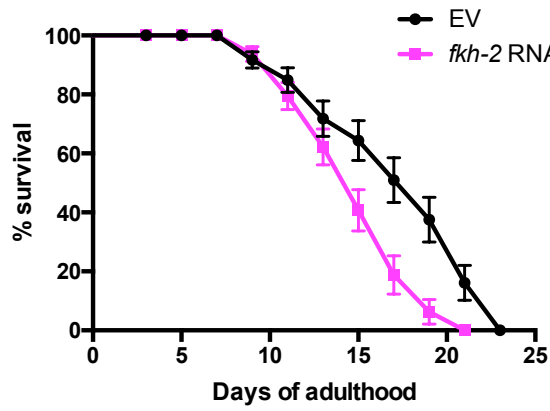


Figure 3.3

**Figure 3.3. *fkh-2/FOXG1* is specific to MJD and required for longevity in *ATXN3* mutants.**

**(A)** *uls60* [*unc-119p::YFP* + *unc-119p::sid-1*] worms treated with *nhr-66* RNAi showed enhanced motility defects ( $*P < 0.05$ ) compared to EV controls. Worms treated with *fkh-2* RNAi were statistically indistinguishable from EV controls (log-rank (Mantel-Cox) test, N=270-300). These experiments were repeated 3 times.

**(B)** Decreased lifespan in *ATXN3*-CAG89 RNAi sensitive worms treated with *fkh-2* RNAi ( $**P < 0.01$ ) compared to EV controls (log-rank (Mantel-Cox) test) (N=300-360). The experiment was repeated 3 times.

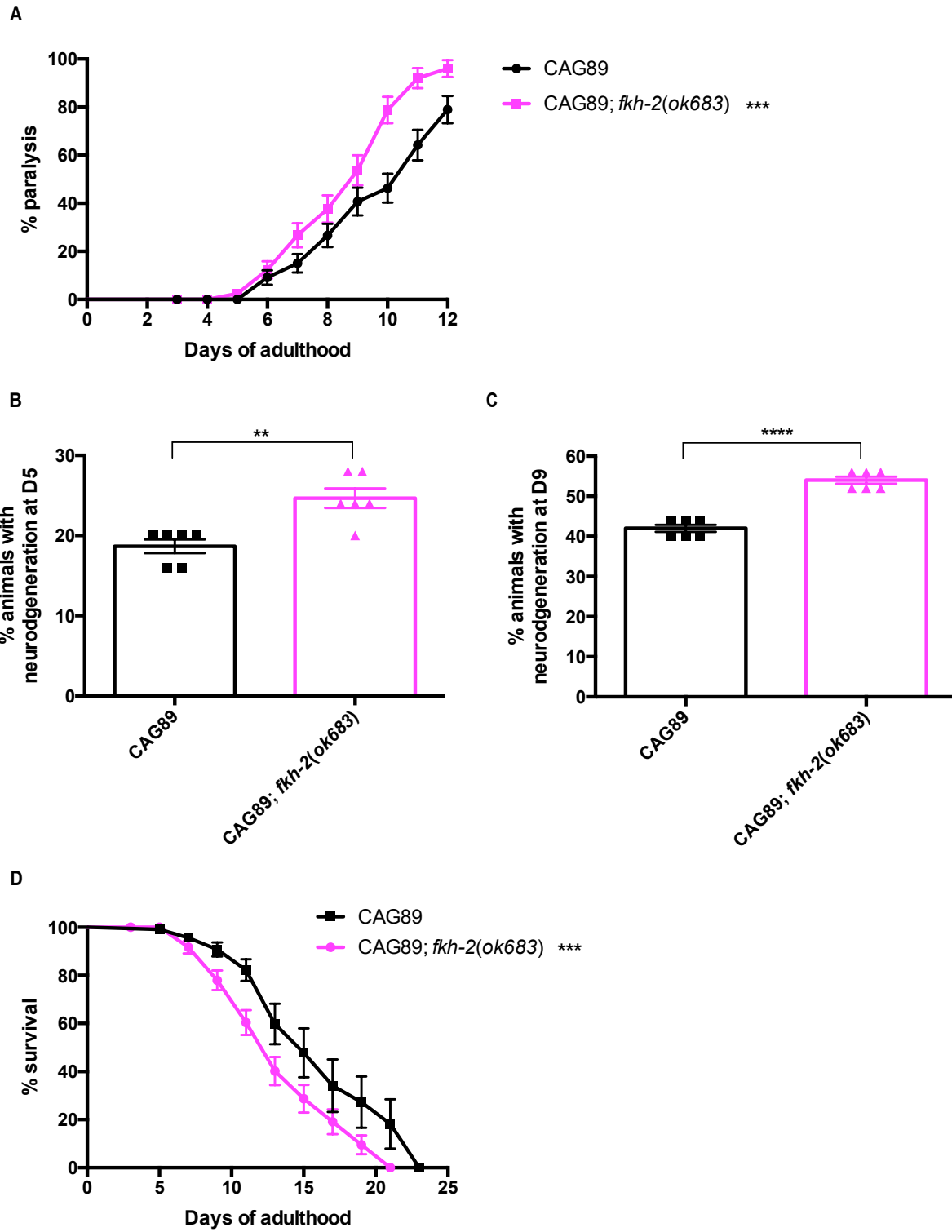


Figure 3.4



**Figure 3.4. *fkh-2* LOF enhances motility and neurodegeneration phenotypes in the MJD worms.**

**(A)** The motor deficit phenotype observed in *ATXN3-CAG89; fkh-2(ok683)* worms was significantly enhanced ( $***P < 0.001$ ) when compared to the control (by log-rank (Mantel-Cox) test, N=270-300). These experiments were replicated for 3 times.

**(B)** Quantification of neurodegeneration in (*unc-47p::mCherry; ATXN3-CAG89; fkh-2(ok683)*) worms at day five of adulthood. Significant increase of the neurodegeneration is observed in (*unc-47p::mCherry; ATXN3-CAG89; fkh-2(ok683)*) worms ( $**P < 0.01$ ) when compared to control *unc-47p::mCherry; ATXN3-CAG89* transgenics (by Student's *t*-test, N=150 for each condition). These experiments were repeated 6 independent times.

**(C)** Quantification of neurodegeneration in (*unc-47p::mCherry; ATXN3-CAG89; fkh-2(ok683)*) worms at day nine of adulthood. Significant neurodegeneration in (*unc-47p::mCherry; ATXN3-CAG89; fkh-2(ok683)*) worms ( $****P < 0.0001$ ) when compared to *unc-47p::mCherry; ATXN3-CAG89* animals (by Student's *t*-test, N=150 for each condition). These experiments were repeated 6 times.

**(D)** Decreased lifespan in *ATXN3-CAG89; fkh-2(ok683)* worms ( $***P < 0.001$ ) when compared to *ATXN3-CAG89* transgenics (log-rank (Mantel-Cox) test) (N=300-360). The experiment was repeated 3 times.

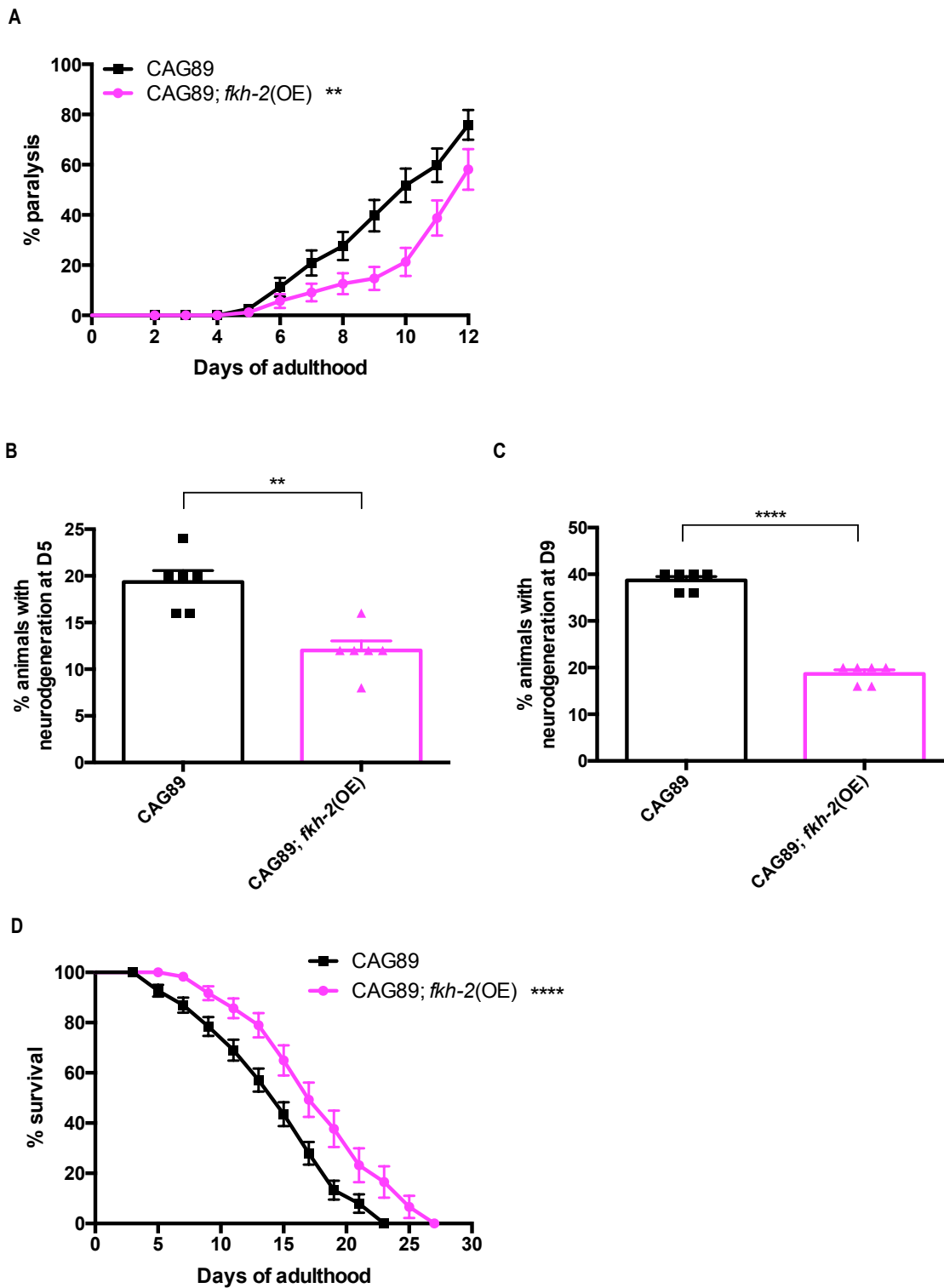


Figure 3.5

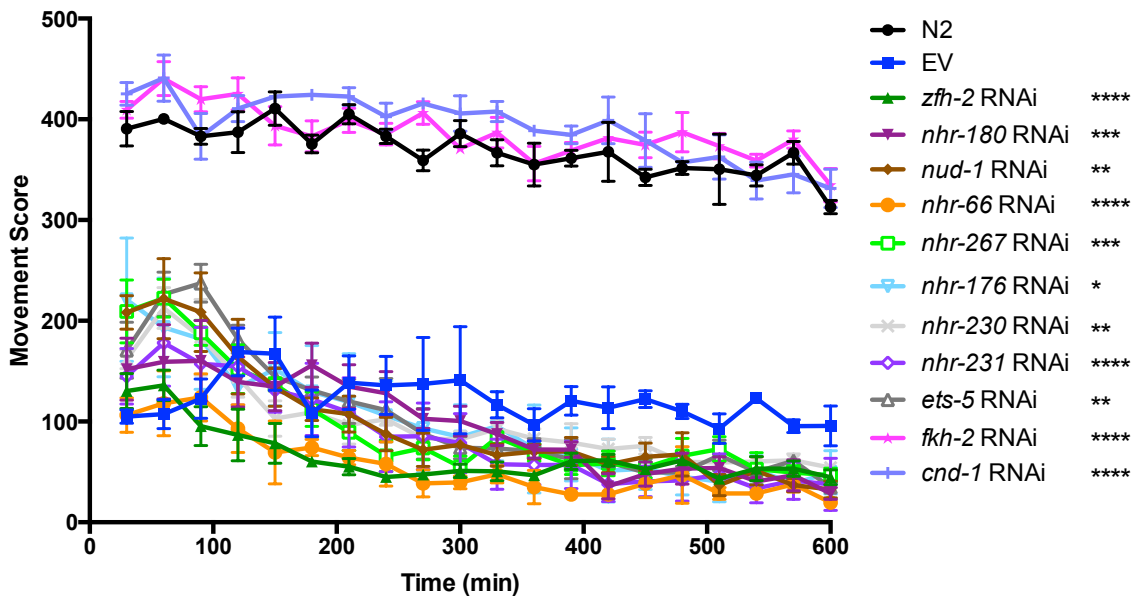
**Figure 3.5. Overexpression of *fkh-2* decreases the neuronal toxicity in *ATXN3-CAG89* worms.**

**(A)** Decreased motility defects in *ATXN3-CAG89*; *fkh-2*(OE) worms compared to the control *ATXN3-CAG89* transgenics (\*\* $P < 0.01$ ) (by log-rank (Mantel-Cox) test, N=270-300). These experiments were replicated 3 times.

**(B)** Quantification of neurodegeneration in (*unc-47p::mCherry*; *ATXN3-CAG89*); *fkh-2*(OE) worms at day five of adulthood. Significant rescue of neurodegeneration phenotype was observed in (*unc-47p::mCherry*; *ATXN3-CAG89*); *fkh-2*(OE) worms when compared to *unc-47p::mCherry*; *ATXN3-CAG89* transgenics at adulthood day five (\*\* $P < 0.01$ ) (by Student's *t*-test, N=150 for each condition). These experiments were repeated 6 independent times.

**(C)** Quantification of neurodegeneration in (*unc-47p::mCherry*; *ATXN3-CAG89*); *fkh-2*(OE) worms at adult day nine. Significant suppression of neurodegeneration was observed in (*unc-47p::mCherry*; *ATXN3-CAG89*); *fkh-2*(OE) worms when compared to *unc-47p::mCherry*; *ATXN3-CAG89* animals at adulthood day nine (\*\*\*\* $P < 0.0001$ ) (Student's *t*-test, N=100 for each condition). These experiments were done 6 times.

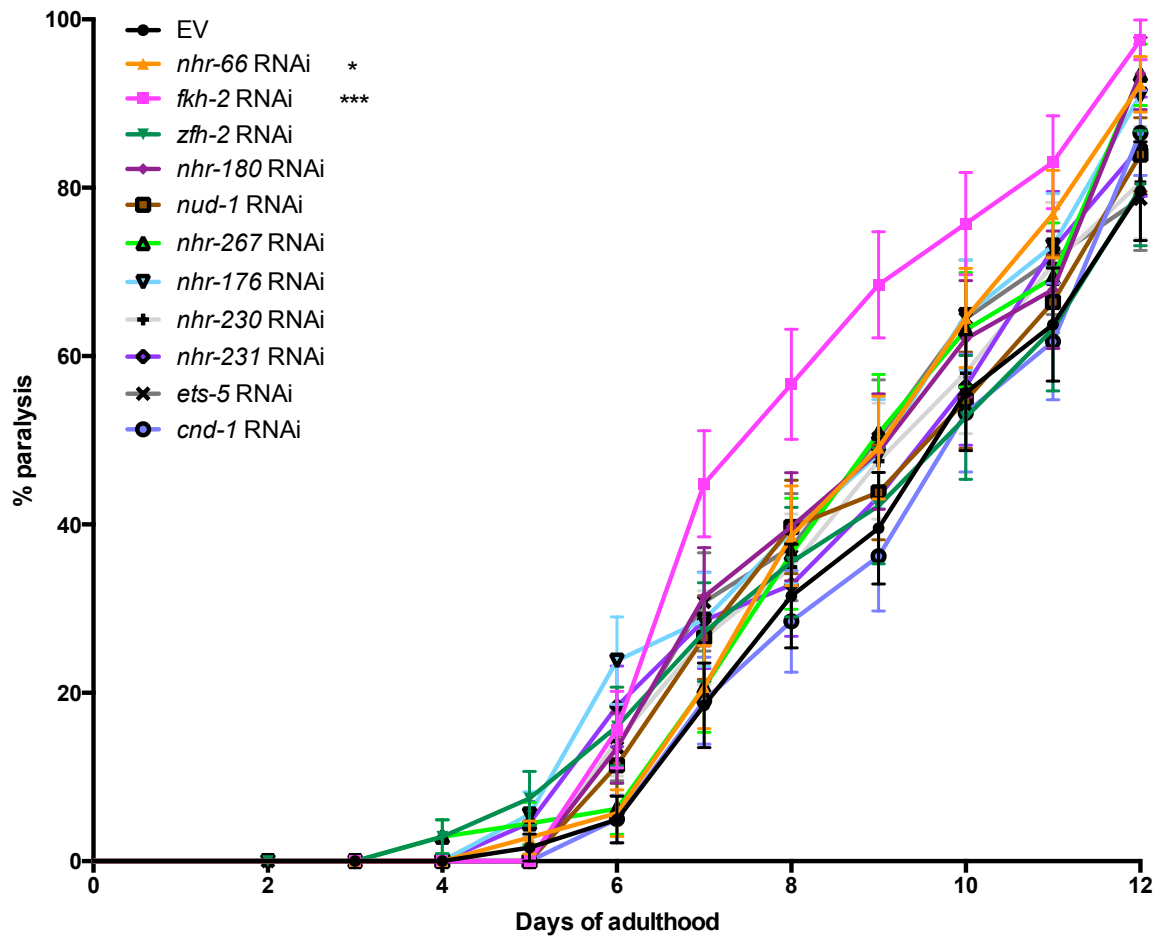
**(D)** Increased lifespan in *ATXN3-CAG89*; *fkh-2*(OE) worms (\*\*\*\* $P < 0.0001$ ) when compared to *ATXN3-CAG89* controls (by log-rank (Mantel-Cox) test) (N=300-360). The experiment was repeated 3 times.



Supplementary Figure 3.1

**Supplementary Figure 3.1. Hit candidates from the screen.**

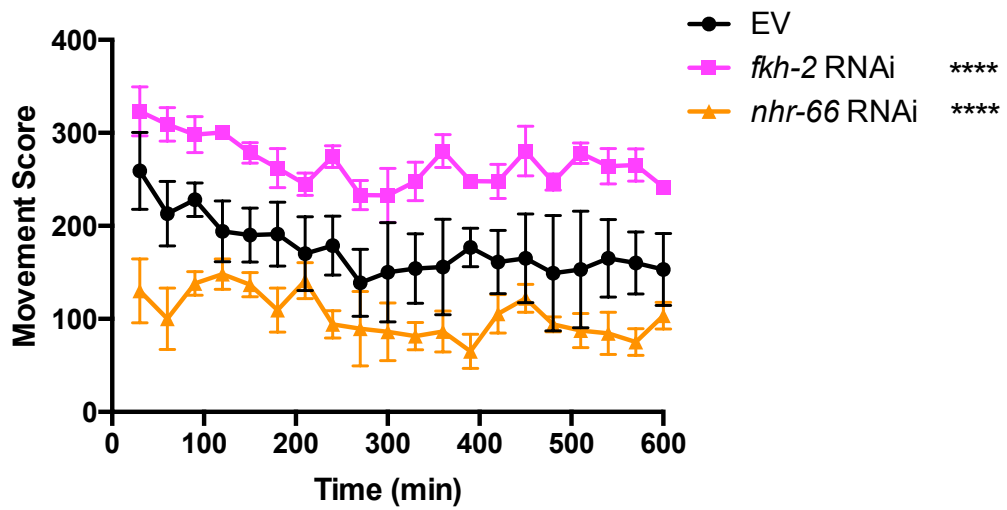
Movement scores of *ATXN3*-CAG89 RNAi sensitive worms treated with the 11 modifiers, 2 suppressors and 9 enhancers, at adult day five. *zfh-2* RNAi (\*\*\*\* $P < 0.0001$ ), *nhr-180* RNAi (\*\*\* $P < 0.001$ ), *nud-1* RNAi (\*\* $P < 0.01$ ), *nhr-66* RNAi (\*\*\*\* $P < 0.0001$ ) *nhr-267* RNAi (\*\*\* $P < 0.001$ ), *nhr-176* RNAi (\* $P < 0.05$ ), *nhr-230* RNAi (\*\* $P < 0.01$ ), *nhr-231* RNAi (\*\*\*\* $P < 0.0001$ ) and, *ets-5* RNAi (\*\* $P < 0.01$ ) enhanced the motility deficit in *ATXN3*-CAG89 RNAi sensitive worms. *fkh-2* RNAi (\*\*\*\* $P < 0.0001$ ) and *cnd-1* RNAi (\*\*\*\* $P < 0.0001$ ) suppressed the locomotion defect in *ATXN3*-CAG89 RNAi sensitive worms. Controls for this experiment were N2 wild-type worms and *ATXN3*-CAG89 RNAi sensitive mutants untreated (EV).



Supplementary Figure 3.2

**Supplementary Figure 3.2. Validation of screening hits on solid media assays.**

The locomotion defect phenotype observed in *ATXN3*-CAG89 RNAi sensitive worms was significantly increased when treated with *nhr-66* RNAi (\* $P < 0.05$ ) or, *fkh-2* RNAi (\*\*\* $P < 0.001$ ) comparatively to untreated *ATXN3*-CAG89 RNAi sensitive worms (EV) (log-rank (Mantel-Cox) test, N=270-300). We observed no significant difference between *ATXN3*-CAG89 RNAi sensitive worms treated with the nine other modifiers and untreated worms (EV).



Supplementary Figure 3.3



**Supplementary Figure 3.3. Rescreening of the two final hits, *nhr-66* and *fkh-2***

Movement scores of *ATXN3*-CAG89 RNAi sensitive worms treated with *nhr-66* RNAi (\*\*\*\* $P < 0.0001$ ), acting as an enhancer, and *fkh-2* RNAi (\*\*\*\* $P < 0.0001$ ), acting as a suppressor, when compared to untreated worms (empty vector (EV)) at adult day five. Controls for this experiment were *ATXN3*-CAG89 RNAi sensitive mutants untreated (EV).

**Table S1**

List of the transcription factor clones (Source BioScience)				
ZC123.3	ZK909.4	C29F9.13	C45E5.6	R11G11.1
F54A5.1	T27A1.6	E02H9.8	C17H12.9	R11G11.2
C45E1.1	ZC204.2	C48D5.1	ZK381.3	R11G11.12
D1007.1	F45C12.3	F34D10.5	F33D4.1	C14C6.4
C04F1.3	F45C12.2	C28A5.4	C26B2.3	ZK488.1
F56H1.2	F45C12.15	C38D4.6	C26B2.4	ZK488.2
C32F10.6	F42G2.6	F26A1.2	T09A12.4	ZK488.4
C27A12.5	K12H6.1	F21H11.3	C09G9.7	F48G7.3
F26B1.7	K08A2.b	C34E10.7	ZC410.1	F31F4.12
T23H2.1	F19B10.9	W03A3.1	H22D14.1	R13D11.8
K10D3.3	C17A2.1	F40H6.4	F14A5.1	C38C3.9
C01H6.5	C17A2.8	C16A3.7	K01H12.3	Y46H3d.b
F55D12.3	C49D10.2	F31E3.1	C28D4.1	F16B4.9
F55D12.4	C49D10.6	ZK418.1	H27C11.1	ZK697.2
ZK265.4	C49D10.9	B0280.8	F32B6.1	F44C8.9
F52B5.4	K10G6.1	H14A12.4	C04G2.7	Y5H2B.h
D1081.2	B0286.5	C07H6.7	F01D4.6	F44C8.2
K02B12.1	ZK177.10	R13A5.5	C08F8.8	F44C8.3
F43G9.11	F10C1.5	ZK652.5	F54D1.4	F44C8.4
W10D5.1	F40H3.4	C08C3.1	C29E6.5	F44C8.5
C17E4.6	K06A1.4	C08C3.3	ZK829.5	F44C8.6
C36F7.1	K06A1.1	C30A5.7	B0564.10	F44C8.10
Y67A6A.2	F31E8.3	C13G5.1	Y62E10B.b	F41B5.9
K10C3.6	F21D12.1	T16H12.4	F13G11.1	F44C8.11
T23H4.2	F18A1.2	ZK1128.4	Y51H4A.o	T27B7.1
F52F12.6	F49E12.6	T07C4.2	Y51H4A.p	T27B7.2
C25A1.2	F28C6.1	T07C4.6	Y116A8C.18	T27B7.3
C25A1.11	F28C6.2	F43D9.5	C49C3.5	T27B7.4
ZC247.3	C34C6.8	M142.4	Y41D4B_930.a	T27B7.5
R13H8.1	T24H10.1	Y66A7A.8	Y41D4B_930.c	F15E11.7
C27C7.3	T23G7.1	C24H11.3	Y59E9_120.a	T24A6.8
ZK1025.6	E02H1.7	Y75B8A.1	Y67D8A_386.b	T24A6.11
ZK1025.9	Y53C12B.5a	Y75B8A.2	Y69A2A_7278.l	T27C4.4
Y53C10A.3	Y53C12C.1	Y111B2D.e	R02C2.4	F47C10.1
Y53C10A.12	F26C11.2	F53A2.4	F33E11.1	F47C10.3
F41D3.3	R53.3	C37G2.5	ZK6.1	F47C10.4
F41D3.1	F27E5.2	C05G6.1	ZK6.2	F47C10.7
C47F8.2	C07E3.5	F55A8.1	ZK6.4	C17E7.5
C47F8.8	C07E3.6	F52C12.5	ZK6.5	C17E7.6
T09E11.2	R06F6.6	C37F5.1	T01G6.4	C17E7.7
T15D6.6	F40F8.5	C09G12.1	M02H5.c	T20C7.a
E03H4.6	C47G2.2	F28F9.1	M02H5.d	T05B4.2
E03H4.13	Y57A10B.4	F36A4.14	M02H5.e	R02D1.1
C54C8.1	Y38E10A.f	R11E3.5	T01G6.6	T28F12.2a
Y26D4A.1	W01D2.2	T28H11.4	T01G6.7	K03B4.3
Y71A12C.1	H10E21.3	F26D12.b	T01G6.8	T19H12.8

**Table S1- Continuation**

<b>List of the transcription factors clones (Source BioScience)</b>			
C10G8.7	F55B12.1	Y116F11A.zz4	
T09D3.4	F09F3.10	F38A6.1	F54F7.1
C24G6.4	R10D12.2	F38A6.3	T08D10.1
F44E7.8	F58E10.2	R04A9.5	C49F5.4
F17A9.6	F58E10.5	ZK1193.5	F17A2.5
F44C4.2	ZC376.4	K06A9.2	T24D3.1
K11G9.4	F56A12.1	ZK380.1	T18D3.2
C33G8.8	C15H11.8	C36C9.2	T18D3.7
C33G8.9	ZK1037.5	T26C11.5	F16H9.2
C33G8.12	ZK1037.4	T26C11.1	C02B4.2
VC5.5	R08H2.9	T26C11.6	T07C5.2
C03G6.10	C06B8.1	F56E3.4	T07C5.3
C03G6.12	K06B4.1	K09C4.5	C02B4.2
C03G6.8	K06B4.5	C12D12.5	T07C5.2
C54F6.9	K06B4.6	C02F12.5	T07C5.3
F19F10.1	K06B4.7	T14G12.4	T07C5.4
F19F10.5	K06B4.8	ZC64.3	T07C5.5
C12D5.2	K06B4.10	ZC64.4	F11C1.6
C12D5.8	F57A10.5	F48D6.1	K03A11.3
D1014.9	T26E4.8	C52B9.2	C29F7.5
T19A5.5	F54B8.2	C07A12.1	K11E4.5
T19A5.4	T06C12.7	C07A12.3	K02B9.4
F59E11.8	F35E8.12	F16H11.5	F16B12.8
F59E11.10	C06C6.5	C39E6.4	F28H6.2
F59E11.11	F36G9.12	C42D8.4	C37E2.5
C25E10.1	F14H3.11	W01C8.2	K04C1.3
F44A2.4	T13F3.2	T13C5.4	H01A20.1
F58E6.10	T13F3.3	F22A3.5	C27C12.6
F57A8.5	F57G8.6	F22A3.1	C18B12.3
Y22F5A.1	F36D3.2	C25B8.6	C33A11.4
F29F11.5	T03E6.3	C56E10.1	T27A8.2
T19B10.11	Y32B12B.6	C56E10.4	R09G11.2
H12C20.3	Y70C5C.6	F46C8.5	
W05E10.3	F09C6.8	T01B10.4	
R07B7.13	F09C6.9	R07B1.1	
R07B7.14	Y102A5C.18	F44A6.2	
R07B7.15	ZK218.6	C33D3.1	
C13C4.1	Y17D7B.1	F14F3.1	
C13C4.2	C54E10.5	F11A1.3	
C34D1.1	Y17D7A.1	F58A3.1	
C34D1.2	Y17D7A.2	ZK455.6	
C26E1.3	Y80D3A.g	H05G16.1	
C50B6.8	Y39B6B.d	C40H5.5	

**Table S1.**

Complete list of all transcription factor clones used in this study. A total of 387 clones (from ORF-RNAi library (Source BioScience, UK)) were screened in our MJD RNAi sensitive mutant worms.

**Table S2**

<b>List of candidates from the screens</b>	
<b>Suppressors</b>	<b>Enhancers</b>
C25A1.11	<b>ZC123.3</b>
C47F8.8	<b>F31F4.12</b>
F45C12.3	ZK177.10
C17A2.1	F18A1.2
C49D10.2	Y53C12B.5a
C49D10.6	<b>F53A2.4</b>
<b>C07E3.5</b>	<b>T09A12.4</b>
Y38E10A.f	<b>C09G9.7</b>
<b>C34E10.7</b>	<b>H22D14.1</b>
T07C4.6	<b>F13G11.1</b>
<b>Y75B8A.2</b>	F47C10.4
<b>T14G12.4</b>	C17E7.7
ZK488.2	F44E7.8
<b>C17E7.6</b>	ZK1037.4
<b>Y39B6B.d</b>	<b>F14H3.11</b>
T01G6.8	<b>Y102A5C.18</b>
C33D3.1	C54E10.5
H01A20.1	<b>Y17D7B.1</b>
<b>K04C1.3</b>	<b>Y17D7A.1</b>
<b>T24D3.1</b>	T26C11.5
T07C5.3	<b>C42D8.4</b>
C33A11.4	<b>F44A6.2</b>
<b>T27A8.2</b>	H05G16.1
T18D3.2	

**Table S2.**

List of modifiers (24 suppressors and 23 enhancers) obtained from the primary screen of 387 transcription factor clones in our MJD RNAi sensitive worms. The bold character clones (9 suppressors and 13 enhancers) represent the hit candidates from the secondary screen.

**Table S3**

<b>List of hit candidates to be confirmed on paralysis assays</b>			
<b>Suppressors</b>		<b>Enhancers</b>	
<b>Clones</b>	<b>Genes</b>	<b>Clones</b>	<b>Genes</b>
C34E10.7	<i>cnd-1</i>	ZC123.3	<i>zfh-2</i>
T14G12.4	<i>fkf-2</i>	F31F4.12	<i>nhr-180</i>
		F53A2.4	<i>nud-1</i>
		T09A12.4	<i>nhr-66</i>
		H22D14.1	<i>nhr-267</i>
		F14H3.11	<i>nhr-176</i>
		Y17D7A.1	<i>nhr-230</i>
		Y17D7B.1	<i>nhr-231</i>
		C42D8.4	<i>ets-5</i>

**Table S3.**

List of the 11 hit modifiers from the screen to be confirmed on paralysis assays. These modifiers from the screen were hit candidates that showed sequence validation and homology with human genes sequences. Clone and gene names are represented for each candidate.



## References

- Akcimen, F., Martins, S., Liao, C., Bourassa, C. V., Catoire, H., Nicholson, G. A., Riess, O., Raposo, M., Franca, M. C., Vasconcelos, J., Lima, M., Lopes-Cendes, I., Saraiva-Pereira, M. L., Jardim, L. B., Sequeiros, J., Dion, P. A., Rouleau, G. A., 2020. Genome-wide association study identifies genetic factors that modify age at onset in Machado-Joseph disease. *Aging (Albany NY)*. 12.
- Araujo, J., Breuer, P., Dieringer, S., Krauss, S., Dorn, S., Zimmermann, K., Pfeifer, A., Klockgether, T., Wuellner, U., Evert, B. O., 2011. FOXO4-dependent upregulation of superoxide dismutase-2 in response to oxidative stress is impaired in spinocerebellar ataxia type 3. *Hum Mol Genet.* 20, 2928-2941.
- Bettencourt, C., Santos, C., Kay, T., Vasconcelos, J., Lima, M., 2008. Analysis of segregation patterns in Machado-Joseph disease pedigrees. *J Hum Genet.* 53, 920-923.
- Calixto, A., Chelur, D., Topalidou, I., Chen, X., Chalfie, M., 2010. Enhanced neuronal RNAi in *C. elegans* using SID-1. *Nat Methods.* 7, 554-559.
- Cummings, C. J., Zoghbi, H. Y., 2000. Fourteen and counting: unraveling trinucleotide repeat diseases. *Hum Mol Genet.* 9, 909-916.
- Da Silva, J. D., Teixeira-Castro, A., Maciel, P., 2019a. From Pathogenesis to Novel Therapeutics for Spinocerebellar Ataxia Type 3: Evading Potholes on the Way to Translation. *Neurotherapeutics*.
- Da Silva, J. D., Teixeira-Castro, A., Maciel, P., 2019b. From Pathogenesis to Novel Therapeutics for Spinocerebellar Ataxia Type 3: Evading Potholes on the Way to Translation. *Neurotherapeutics.* 16, 1009-1031.
- de Carlos Caceres, I., Porto, D. A., Gallotta, I., Santonicola, P., Rodriguez-Cordero, J., Di Schiavi, E., Lu, H., 2018. Automated screening of *C. elegans* neurodegeneration mutants enabled by microfluidics and image analysis algorithms. *Integr Biol (Camb)*. 10, 539-548.
- Dimitriadi, M., Hart, A. C., 2010. Neurodegenerative disorders: insights from the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Neurobiol Dis.* 40, 4-11.
- Fardghassemi, Y., Tauffenberger, A., Gosselin, S., Parker, J. A., 2017. Rescue of ATXN3 neuronal toxicity in *Caenorhabditis elegans* by chemical modification of endoplasmic reticulum stress. *Dis Model Mech.* 10, 1465-1480.
- Florian, C., Bahi-Buisson, N., Bienvenu, T., 2012. FOXG1-Related Disorders: From Clinical Description to Molecular Genetics. *Mol Syndromol.* 2, 153-163.
- Franca, M. C., Jr., D'Abreu, A., Nucci, A., Lopes-Cendes, I., 2008. Muscle excitability abnormalities in Machado-Joseph disease. *Arch Neurol.* 65, 525-529.
- Frokjaer-Jensen, C., Davis, M. W., Sarov, M., Taylor, J., Flibotte, S., LaBella, M., Pozniakovsky, A., Moerman, D. G., Jorgensen, E. M., 2014. Random and targeted transgene insertion in *Caenorhabditis elegans* using a modified Mos1 transposon. *Nat Methods.* 11, 529-534.
- Gao, R., Chakraborty, A., Geater, C., Pradhan, S., Gordon, K. L., Snowden, J., Yuan, S., Dickey, A. S., Choudhary, S., Ashizawa, T., Ellerby, L. M., La Spada, A. R., Thompson, L. M., Hazra, T. K., Sarker, P. S., 2019. Mutant huntingtin impairs PNKP and ATXN3, disrupting DNA repair and transcription. *Elife.* 8.
- Gao, R., Liu, Y., Silva-Fernandes, A., Fang, X., Paulucci-Holthausen, A., Chatterjee, A., Zhang, H. L., Matsuura, T., Choudhary, S., Ashizawa, T., Koeppe, A. H., Maciel, P., Hazra, T.

- K.Sarkar, P. S., 2015. Inactivation of PNKP by mutant ATXN3 triggers apoptosis by activating the DNA damage-response pathway in SCA3. *PLoS Genet.* 11, e1004834.
- Gerstein, M. B., Lu, Z. J., Van Nostrand, E. L., Cheng, C., Arshinoff, B. I., Liu, T., Yip, K. Y., Robilotto, R., Rechtsteiner, A., Ikegami, K., Alves, P., Chateigner, A., Perry, M., Morris, M., Auerbach, R. K., Feng, X., Leng, J., Vielle, A., Niu, W., Rhrissorrakrai, K., Agarwal, A., Alexander, R. P., Barber, G., Brdlik, C. M., Brennan, J., Brouillet, J. J., Carr, A., Cheung, M. S., Clawson, H., Contrino, S., Dannenberg, L. O., Dernburg, A. F., Desai, A., Dick, L., Dose, A. C., Du, J., Egelhofer, T., Ercan, S., Euskirchen, G., Ewing, B., Feingold, E. A., Gassmann, R., Good, P. J., Green, P., Gullier, F., Gutwein, M., Guyer, M. S., Habegger, L., Han, T., Henikoff, J. G., Henz, S. R., Hinrichs, A., Holster, H., Hyman, T., Iniguez, A. L., Janette, J., Jensen, M., Kato, M., Kent, W. J., Kephart, E., Khivansara, V., Khurana, E., Kim, J. K., Kolasinska-Zwierz, P., Lai, E. C., Latorre, I., Leahey, A., Lewis, S., Lloyd, P., Lochovsky, L., Lowdon, R. F., Lubling, Y., Lyne, R., MacCoss, M., Mackowiak, S. D., Mangone, M., McKay, S., Mecnas, D., Merrihew, G., Miller, D. M., 3rd, Muroyama, A., Murray, J. I., Ooi, S. L., Pham, H., Phippen, T., Preston, E. A., Rajewsky, N., Ratsch, G., Rosenbaum, H., Rozowsky, J., Rutherford, K., Ruzanov, P., Sarov, M., Sasidharan, R., Sboner, A., Scheid, P., Segal, E., Shin, H., Shou, C., Slack, F. J., et al., 2010. Integrative analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome by the modENCODE project. *Science.* 330, 1775-1787.
- Hamamichi, S., Rivas, R. N., Knight, A. L., Cao, S., Caldwell, K. A., Caldwell, G. A., 2008. Hypothesis-based RNAi screening identifies neuroprotective genes in a Parkinson's disease model. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105, 728-733.
- Hope, I. A., Mounsey, A., Bauer, P., Aslam, S., 2003. The forkhead gene family of *Caenorhabditis elegans*. *Gene.* 304, 43-55.
- Ikenaka, K., Tsukada, Y., Giles, A. C., Arai, T., Nakadera, Y., Nakano, S., Kawai, K., Mochizuki, H., Katsuno, M., Sobue, G., Mori, I., 2019. A behavior-based drug screening system using a *Caenorhabditis elegans* model of motor neuron disease. *Sci Rep.* 9, 10104.
- Kaletta, T., Hengartner, M. O., 2006. Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. *Nat Rev Drug Discov.* 5, 387-398.
- 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. *Nat Genet.* 8, 221-228.
- Kern, A., Spang, N., Huesmann, H., Behl, C., 2018. Novel Modulators of Proteostasis: RNAi Screen of Chromosome I in a Heat Stress Paradigm in *C. elegans*. *Cells.* 7.
- Kwok, T. C., Ricker, N., Fraser, R., Chan, A. W., Burns, A., Stanley, E. F., McCourt, P., Cutler, S. R., Roy, P. J., 2006. A small-molecule screen in *C. elegans* yields a new calcium channel antagonist. *Nature.* 441, 91-95.
- Lejeune, F. X., Mesrob, L., Parmentier, F., Bicep, C., Vazquez-Manrique, R. P., Parker, J. A., Vert, J. P., Tourette, C., Neri, C., 2012. Large-scale functional RNAi screen in *C. elegans* identifies genes that regulate the dysfunction of mutant polyglutamine neurons. *BMC Genomics.* 13, 91.
- Lima, L., Coutinho, P., 1980. Clinical criteria for diagnosis of Machado-Joseph disease: report of a non-Azorena Portuguese family. *Neurology.* 30, 319-322.
- Maciel, P., Costa, M. C., Ferro, A., Rousseau, M., Santos, C. S., Gaspar, C., Barros, J., Rouleau, G. A., Coutinho, P., Sequeiros, J., 2001. Improvement in the molecular diagnosis of Machado-Joseph disease. *Arch Neurol.* 58, 1821-1827.

- Matos, C. A., de Macedo-Ribeiro, S., Carvalho, A. L., 2011. Polyglutamine diseases: the special case of ataxin-3 and Machado-Joseph disease. *Prog Neurobiol.* 95, 26-48.
- O'Reilly, L. P., Luke, C. J., Perlmutter, D. H., Silverman, G. A., Pak, S. C., 2014. *C. elegans* in high-throughput drug discovery. *Adv Drug Deliv Rev.* 69-70, 247-253.
- Petrash, H. A., Philbrook, A., Haburcak, M., Barbagallo, B., Francis, M. M., 2013. ACR-12 ionotropic acetylcholine receptor complexes regulate inhibitory motor neuron activity in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci.* 33, 5524-5532.
- Postnikoff, S. D., Malo, M. E., Wong, B., Harkness, T. A., 2012. The yeast forkhead transcription factors fkh1 and fkh2 regulate lifespan and stress response together with the anaphase-promoting complex. *PLoS Genet.* 8, e1002583.
- Sarov, M., Schneider, S., Pozniakovski, A., Roguev, A., Ernst, S., Zhang, Y., Hyman, A. A., Stewart, A. F., 2006. A recombineering pipeline for functional genomics applied to *Caenorhabditis elegans*. *Nat Methods.* 3, 839-844.
- Schmeisser, K., Fardghassemi, Y., Parker, J. A., 2017. A rapid chemical-genetic screen utilizing impaired movement phenotypes in *C. elegans*: Input into genetics of neurodevelopmental disorders. *Exp Neurol.* 293, 101-114.
- Schöls, L., Bauer, P., Schmidt, T., Schulte, T., Riess, O., 2004. Autosomal dominant cerebellar ataxias: clinical features, genetics, and pathogenesis. *Lancet Neurol.* 3, 291-304.
- Shao, J., Diamond, M. I., 2007. Polyglutamine diseases: emerging concepts in pathogenesis and therapy. *Hum Mol Genet.* 16 Spec No. 2, R115-123.
- Shi, Z., Chen, J., Zhang, X., Chu, J., Han, Z., Xu, D., Gan, S., Pan, X., Ye, J., Cui, X., 2018. Ataxin-3 promotes testicular cancer cell proliferation by inhibiting anti-oncogene PTEN. *Biochem Biophys Res Commun.* 503, 391-396.
- Simonetta, S. H., Golombek, D. A., 2007. An automated tracking system for *Caenorhabditis elegans* locomotor behavior and circadian studies application. *J Neurosci Methods.* 161, 273-280.
- Stiernagle, T., 2006. Maintenance of *C. elegans*. *WormBook.* 1-11.
- Takiyama, Y., Oyanagi, S., Kawashima, S., Sakamoto, H., Saito, K., Yoshida, M., Tsuji, S., Mizuno, Y., 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.
- 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., Maciel, P., 2011a. Neuron-specific proteotoxicity of mutant ataxin-3 in *C. elegans*: rescue by the DAF-16 and HSF-1 pathways. *Hum Mol Genet.* 20, 2996-3009.
- Teixeira-Castro, A., Ailion, M., Jalles, A., Brignull, H. R., Vilaça, J. L., Dias, N., Rodrigues, P., Oliveira, J. F., Neves-Carvalho, A., Morimoto, R. I., Maciel, P., 2011b. Neuron-specific proteotoxicity of mutant ataxin-3 in *C. elegans*: rescue by the DAF-16 and HSF-1 pathways. *Hum Mol Genet.* 20, 2996-3009.
- Teixeira-Castro, A., Jalles, A., Esteves, S., Kang, S., da Silva Santos, L., Silva-Fernandes, A., Neto, M. F., Briemann, R. M., Bessa, C., Duarte-Silva, S., Miranda, A., Oliveira, S., Neves-Carvalho, A., Bessa, J., Summavielle, T., Silverman, R. B., Oliveira, P., Morimoto, R. I., Maciel, P., 2015. Serotonergic signalling suppresses ataxin 3 aggregation and neurotoxicity in animal models of Machado-Joseph disease. *Brain.* 138, 3221-3237.
- Tuteja, G., Kaestner, K. H., 2007a. Forkhead transcription factors II. *Cell.* 131, 192.
- Tuteja, G., Kaestner, K. H., 2007b. SnapShot: forkhead transcription factors I. *Cell.* 130, 1160.

- Wang, G., Ide, K., Nukina, N., Goto, J., Ichikawa, Y., Uchida, K., Sakamoto, T., Kanazawa, I., 1997. Machado-Joseph disease gene product identified in lymphocytes and brain. *Biochem Biophys Res Commun.* 233, 476-479.
- Whangbo, J. S., Weisman, A. S., Chae, J., Hunter, C. P., 2017. SID-1 Domains Important for dsRNA Import in *Caenorhabditis elegans*. *G3 (Bethesda)*. 7, 3887-3899.
- Wong, L. C., Singh, S., Wang, H. P., Hsu, C. J., Hu, S. C., Lee, W. T., 2019. FOXG1-Related Syndrome: From Clinical to Molecular Genetics and Pathogenic Mechanisms. *Int J Mol Sci.* 20.
- Xu, Z., Tito, A. J., Rui, Y. N., Zhang, S., 2015. Studying polyglutamine diseases in *Drosophila*. *Exp Neurol.* 274, 25-41.
- Zeng, L., Zhang, D., McLoughlin, H. S., Zalon, A. J., Aravind, L., Paulson, H. L., 2018. Loss of the Spinocerebellar Ataxia type 3 disease protein ATXN3 alters transcription of multiple signal transduction pathways. *PLoS One.* 13, e0204438.
- Zou, H., Chen, H., Zhou, Z., Wan, Y., Liu, Z., 2019. ATXN3 promotes breast cancer metastasis by deubiquitinating KLF4. *Cancer Lett.* 467, 19-28.

## Chapitre 4. Discussion

### 4.1. Criblages

#### 4.1.1. Criblage pharmacologique

Pour le projet principal de cette thèse, présenté au Chapitre 2, un criblage pharmacologique non biaisé rapide de 3942 molécules, en provenance de quatre librairies différentes, majoritairement approuvées par la FDA, a été réalisé en milieu liquide. Cette approche a été utilisée afin de trouver des molécules étant capables de prévenir la neurotoxicité et de restaurer les phénotypes pathologiques observés dans les vers transgéniques mutants *ATXN3-CAG89*.

Suite aux criblages en milieu liquide, 24 molécules se démarquant des autres ont été sélectionnées, d'après les critères suivants : avoir la capacité d'améliorer significativement le déficit locomoteur des vers en milieu liquide, être approuvées par la FDA, avoir l'habileté à traverser la barrière hématoencéphalique, favorisant ainsi son emploi pour traiter des troubles cérébraux, et favorablement, avoir été utilisées pour d'autres maladies neuropathologiques. Une fois les molécules d'intérêt sélectionnées, les expériences de criblage ont été poursuivies par : (1) la validation des molécules en milieu solide sur des pétris NGM («*Nematode Growth Medium*»), par des tests de paralysie; (2) la détermination d'une concentration optimale, par des courbes de dose-réponse, en milieu solide, pour les molécules à restaurer le défaut de la motilité des vers MMJ; et (3) des tests de neurodégénérescence et de longévité. Collectivement, ces tests ont permis d'identifier cinq composés neuroprotecteurs dans notre modèle MMJ étant capables de restaurer le défaut de la motilité, de prévenir la neurodégénérescence et d'augmenter la longévité avec une concentration de 2  $\mu\text{M}$  : l'alfacalcidol (ALFA), le chenodiol (CHEN), le cyclophosphamide (CYCLO), le fenbufen (FEN) et le sulfaphénazole (SULFA). Les classes chimiques auxquelles appartient chacun de ces composés sont, respectivement, des dérivés de vitamines D, des stéroïdes, des cyclophosphamides, des benzènes et des sulfonamides. L'appartenance de ces composés à diverses classes chimiques, avec des fonctions et des structures chimiques différentes, confirme la perturbation et la dérégulation de plusieurs voies de signalisation et mécanismes en cas de MMJ. Aussi, cela permet de constater que la pathogenèse

de cette maladie peut être atténuée et traitée à travers plusieurs voies par différentes catégories de composés, possédant chacun divers rôles possibles dans le système.

#### **4.1.2. Criblage de modificateurs génétiques à base d'ARNi**

Pour cette seconde partie du projet, présenté au Chapitre 3, un criblage en milieu liquide à base d'ARNi d'une librairie contenant 387 clones de facteurs de transcription a été employé. Cette approche a été entreprise afin de trouver des gènes modificateurs, des suppresseurs et/ou des augmentateurs, impliqués dans la pathogenèse de la MMJ.

À la suite des criblages en milieu liquide, 22 candidats capables de significativement modifier la locomotion des vers mutants *ATXN3-CAG89*, soit à restaurer le défaut de la motilité ou à l'empirer, ont été identifiés. Ces candidats ont été ensuite sujets à une validation de séquençage et à une évaluation quant à leur homologie avec les séquences des gènes humains. Ainsi, 11 candidats se démarquant des autres quant à leur habileté à modifier la locomotion des vers MMJ et représentant une homologie avec les gènes humains ont été retenus. Les expériences de criblage ont été poursuivies par : (1) la validation des 11 candidats identifiés en milieu solide; et (2) des tests de paralysie, de neurodégénérescence, de spécificité et de longévité avec les vers MMJ *knock-down* des gènes d'intérêt. Suite aux expériences de validation en milieu solide par des tests de paralysie, seulement deux candidats parmi les 11 identifiés ont démontré des effets modificateurs quant au défaut de la motilité chez les vers mutants MMJ. En effet, les neuf autres candidats, contrairement aux criblages effectués en milieu liquide, n'ont présenté aucun impact sur le phénotype de la motilité évalué en milieu solide. Par conséquent, ils ont été non priorisés et éliminés de la liste des modificateurs potentiels pour la MMJ pour la continuation du projet. Toutefois, il est à noter que cette élimination ne signifie pas nécessairement que ces derniers sont de mauvais candidats pour la MMJ, ou encore des résultats faux positifs ou hors cibles. Pour les criblages en milieu liquide, les vers sont traités pendant cinq jours, alors que pour les tests de paralysie en milieu solide, les traitements durent pendant 12 jours. Ceci-dit, il est possible que les candidats éliminés possèdent un impact sur les vers mutants MMJ à un âge plus tôt et qu'ensuite, avec le vieillissement, dépendamment de leurs interactions, leurs activités soient neutralisées par des effets compensatoires d'autres gènes ou voies de signalisation. Aussi, il se pourrait qu'avec le vieillissement, ils ne possèdent plus d'effet sur la motilité, mais plutôt sur d'autres phénotypes. Par conséquent, il serait intéressant à d'abord effectuer des tests de spécificité sur les candidats

éliminés et ensuite, pour ceux démontrant un effet spécifique à la MMJ, étudier d'autres phénotypes, tels que la longévité, l'agrégation ou même leur impact en présence de divers types de stress sur les vers mutants MMJ. De plus, ces 11 candidats identifiés par le criblage, étant non priorités pour la MMJ, peuvent toutefois être des candidats potentiels à considérer et à tester pour d'autres maladies à expansion de poly-Q.

Collectivement, ces essais ont identifié *fkf-2* («*forkhead 2*») comme un nouveau gène impliqué dans la MMJ. En effet, son *knock-down* a démontré une aggravation des phénotypes observés dans les vers transgéniques mutants *ATXN3-CAG89*, suggérant ainsi sa présence nécessaire en cas de MMJ.

#### **4.1.3. Limites et avantages des expériences à base d'ARNi**

Chez le modèle *C. elegans*, il est possible de réaliser des expériences à base d'ARNi en exprimant l'ARN double-brin du gène d'intérêt dans la nourriture bactérienne des vers. Cependant, les neurones de ce modèle démontrent une résistance à l'ARNi par alimentation bactérienne, résultant ainsi en une faible pénétrance de la suppression ARNi dans les neurones, posant un problème dans notre cas, où notre modèle transgénique exprime *ATXN3* dans les neurones GABAergiques (479-481). Heureusement, diverses stratégies ont été développées afin de contrer ce problème en augmentant la sensibilité des neurones à l'ARNi, par l'expression neuronale du gène *sid-1*, gène impliqué dans l'ARNi et le transport de l'ARN double-brin (482). En effet, la souche utilisée pour cette partie du projet était une souche ARNi hypersensible aux neurones, exprimant *SID-1* dans les neurones, et favorisant une augmentation de l'importation neuronale de l'ARN double-brin de la source bactérienne permettant ainsi une introduction de l'ARN double-brin spécifiquement dans les neurones (482,483). Chez les humains, il serait également possible de réaliser une suppression génique en délivrant des virus adéno-associés ou des vecteurs lentiviraux conçus, exprimant des ARNsh ou des miARN artificiels spécifiques, dans des régions précises du système nerveux affecté chez les patients atteints de la pathologie, telles que le cervelet en cas de MMJ par exemple (207,214,484-487). Enfin, outre la souche employée, d'autres limitations sont à considérer lorsqu'un criblage à base d'ARNi est effectué, incluant une altération possible de la sensibilité et de la spécificité, l'obtention des effets hors cible nécessitant des tests de validation, et parfois des difficultés à passer d'une cible génétique à un mécanisme ou une voie de signalisation (488). Quelques approches existent pour contrer certaines de ces limites.

En effet, afin de valider les résultats obtenus par des expériences à base d'ARNi, il est possible de les confirmer en effectuant des croisements avec les gènes d'intérêt et d'évaluer ensuite leurs phénotypes. Également, une autre méthode possible pour déterminer la spécificité des résultats est de traiter des vers transgéniques sensibles à l'ARNi (sauvages) avec le clone d'intérêt, et ensuite observer leurs phénotypes. Cela permet de confirmer que les effets observés du candidat sélectionné ne sont spécifiques qu'aux vers mutants. Entre autres, ces deux approches suggérées ont été toutes les deux employées dans le second projet de cette thèse afin de valider l'exactitude et la spécificité des résultats obtenus par des expériences à base d'ARNi. D'abord, nous avons traité des vers transgéniques sensibles à l'ARNi avec les clones d'intérêt, et évalué la spécificité des candidats identifiés aux vers mutants MMJ par des tests de paralysie. Ensuite, l'exactitude des résultats obtenus par les expériences à base d'ARNi a été validée, en croisant les vers mutants MMJ avec des vers KO *fkh-2*, par des tests de paralysie, de neurodégénérescence et de longévité. Même en ayant des limites, il est important de noter que cette méthode possède aussi plusieurs avantages. Entre autres, lorsqu'un croisement est effectué, selon les fonctions du gène d'intérêt, des probabilités quant aux vers à développer des problèmes neurodéveloppementaux et ainsi, influencer leurs phénotypes lors du vieillissement, sont présentes. Toutefois, par des expériences à base d'ARNi, lorsque les vers sont traités à partir de leur premier jour adulte, ces possibilités sont éliminées, étant donné que ce stade est déjà complété. De plus, parfois, il est impossible d'effectuer des croisements entre les gènes, dus à plusieurs raisons, dont l'indisponibilité d'une souche ou encore, les positions chromosomiques des gènes. C'est alors que l'emploi des expériences à base d'ARNi devient pertinent. Également, cette approche est d'une grande efficacité pour des criblages génétiques, car elle permet d'évaluer un grand nombre de gènes rapidement. Ainsi, il s'agit d'une approche efficace et bénéfique, mais comme toute méthode, il faut rester vigilant et attentif aux limites.

#### **4.1.4. Limites et avantages de la technique du criblage employé**

Comme mentionné auparavant dans cette thèse, les criblages pharmacologiques et des modificateurs génétiques, en milieu liquide, ont tous les deux été effectués à partir de la machine WMicroTracker (Phylum Tech) (395). Cette approche comporte plusieurs avantages, incluant la capacité de la machine à cribler un grand nombre de molécules, à enregistrer automatiquement le mouvement des vers, la rapidité à obtenir des résultats (seulement en quelques heures), et requiert



des manipulations expérimentales relativement simples. Cependant, comme toute approche, elle comporte aussi quelques limites. Entre autres, comme la machine ne possède pas la capacité de différencier les vers, le même ver peut passer plusieurs fois par les rayons, et son mouvement est enregistré à chaque fois. De plus, la validation des résultats obtenus par cette approche avec une autre méthode telle que l'évaluation du mouvement des vers en milieu solide, par des tests de paralysie, sur des pétris NGM, est essentielle afin d'éliminer toute possibilité d'artéfact, des effets hors cible ou encore, des résultats faussement positifs. Le criblage en milieu liquide n'est effectué que pendant quelques heures, contrairement aux tests de paralysie, où les vers sont exposés aux molécules pendant douze jours consécutifs.

Il existe aussi d'autres méthodes de criblage en milieu liquide telles que la macroscopie, la microscopie automatisée, et le lecteur de microplaque. La macroscopie permet une évaluation de la locomotion et de la morphologie des vers, mais il s'agit d'une approche de criblage à faible débit. Quant aux deux autres méthodes, elles permettent des criblages à haut débit, mais comme il s'agit d'approches basées sur la quantification du niveau de la fluorescence, elles requièrent l'utilisation de vers fluorescents, tel que les vers fluorescents à gène rapporteur (392). Il existe également le système de surveillance cellulaire xCelligence, méthode automatisée à haut débit en milieu liquide permettant l'évaluation de la motilité des vers, modèle similaire au WMicroTracker. Cependant, comme il s'agit d'un système initialement conçu pour l'évaluation de la motilité des parasites, une optimisation du système est nécessaire afin de l'adapter pour l'évaluation de la motilité et de la viabilité du modèle *C. elegans* (489). Une autre approche efficace est la microfluidique. Cette méthode implique des écoulements de fluides à l'échelle de micron, permettant des débits, des gradients de concentrations et des taux de cisaillement précis et contrôlables, entre autres, applicables et bénéfiques pour des échantillons ou des volumes de réactifs de petites tailles ou miniaturisés (490). Dû à son système d'imagerie et de criblage automatisés à haut débit, le temps nécessaire à étudier chacun des vers est considérablement réduit. De plus, il s'agit d'une méthode avec une haute sensibilité. Cette approche permet des criblages de mutants, des bibliothèques pharmacologiques et génétiques à base d'ARNi, des évaluations du comportement sensoriel et de la locomotion, et des études d'ablation au laser et de la régénération nerveuse (491-500). Selon les intérêts de la recherche, l'immobilisation et imagerie, des études métaboliques, des tris de vers, des analyses de comportement, la microchirurgie, ou encore des criblages, divers type d'appareils de microfluidique existent (501).

Entre autres, dans notre laboratoire, nous optimisons présentement cette approche afin de mener des études sur l'évaluation de la régénération nerveuse, mais aussi, possiblement, des études plus approfondies quant à l'étude du phénotype de la neurodégénérescence dans les vers *C. elegans*. Comme il s'agit également d'une approche efficace pour des criblages de libraires pharmacologiques et génétiques, et est sensible et rapide, elle serait aussi une bonne approche à considérer et à optimiser pour des criblages, afin d'éventuellement l'employer en parallèle ou plutôt en alternative à notre système actuel de criblage en milieu liquide. Toutefois, il s'agit d'une méthode compliquée à optimiser et à s'adapter quant à son utilisation au départ. Ceci-dit, pour l'instant, le temps de l'optimiser et à se familiariser quant à son utilisation, la meilleure approche pour effectuer des criblages en milieu liquide est notre système actuel, l'appareil WMicroTracker.

Également, comme toute autre approche, des probabilités d'obtenir de faux négatifs existent aussi pour les criblages. Dû à plusieurs facteurs, incluant le promoteur utilisé, le phénotype évalué, le temps d'exposition et de traitement des vers mutants, la concentration des composés, la quantité du clone dans le milieu, le système de criblage utilisé ou encore plein d'autres facteurs, il est possible de passer à côté des candidats potentiels. Le criblage en milieu liquide est une technique efficace, elle permet d'obtenir des résultats rapidement, et c'est une approche de choix à employer pour des librairies contenant un grand nombre d'éléments. Peu importe la méthode employée, la possibilité d'obtenir des faux négatifs est toujours existante. Cependant, il est possible de jumeler la méthode utilisée avec une autre en parallèle. Une approche possible à utiliser est le logiciel WormLab. Ce logiciel permet une imagerie automatisée et une analyse quantitative du comportement des vers en évaluant divers paramètres, incluant la vitesse, l'amplitude, la longueur d'onde, la direction, des inversions, des enchevêtrements, etc. Toutefois, même s'il s'agit d'une méthode informative, elle possède plusieurs limites : le temps d'analyse est très long, la machine est incapable d'analyser tous les vers, elle effectue parfois des sélections et aussi, souvent le même ver est évalué plusieurs fois. Ceci-dit, par ces limites, surtout le temps qu'elle requiert pour les analyses, son emploi en tant que méthode complémentaire pour des criblages des librairies contenant des centaines ou des milliers de molécules ou des clones d'ARNi, n'est donc pas un choix logique à entreprendre. Également, rien ne garantit qu'avec cette stratégie proposée, moins de résultats faux négatifs et positifs sont obtenus. Avant de nous décider d'utiliser ce système de criblage en particulier, une

étude approfondie quant aux limites et avantages de toutes les autres méthodes de criblage a été effectuée. Parmi toutes, notre système actuel était le meilleur, dû entre autre à sa grande efficacité et sa rapidité à acquérir des résultats consistants. Également, il est à noter que, pour les projets de cette thèse, pour diminuer les chances de passer à côté des candidats potentiels, nous avons comparé la moyenne du mouvement des vers traités avec les candidats compte tenu de deux différentes moyennes : la moyenne du mouvement des vers contrôles, mais aussi, la moyenne générale du mouvement des vers pour toute la plaque de 96 puits, permettant ainsi une meilleure sélection des composés ayant présenté un impact significatif sur le mouvement des vers mutants MMJ. Pour éliminer l'option de faux négatifs, il n'existe donc pas vraiment de méthode en particulier, car pas seulement un, mais de nombreux facteurs peuvent les influencer. La liste de candidats potentiels obtenus n'est pas seulement influencée par la technique de criblage utilisée, mais aussi, par plusieurs autres facteurs, incluant le promoteur utilisé, la taille de l'expansion de poly-Q, les phénotypes évalués et la concentration des composés. En effet, il se pourrait que, par l'expression du gène *ATXN3* dans d'autres neurones sous un autre promoteur, l'évaluation d'autres phénotypes chez les vers mutants MMJ, par exemple, l'agrégation, ou encore l'utilisation d'une plus petite ou plus grande concentration, une liste différente de candidats potentiels pour la MMJ que celle des projets de cette thèse aurait été obtenue. Comme tout projet de recherche, les découvertes réalisées peuvent se différer grandement dépendamment des décisions d'approches entreprises au départ du projet, faisant ainsi de la science un domaine sans fin.

## **4.2. Facteurs de transcription identifiés**

### **4.2.1. HLH-30/TFEB dans la MMJ**

Comme mentionné dans les sections précédentes, une fonction conservée pour HLH-30 dans l'autophagie chez le modèle *C. elegans*, une capacité pour ce facteur de transcription à réguler et à moduler cette voie, et une association entre la voie autophagique et la MMJ ont été rapportées dans plusieurs études. En nous appuyant sur ces points, nous avons aussi voulu investiguer si un lien existe entre la MMJ et HLH-30/TFEB, régulateur majeur de la voie autophagie-lysosomale, si sa surexpression favorise une atténuation des phénotypes observés

dans notre modèle MMJ, et si l'action neuroprotectrice des composés identifiés lui en est dépendante.

#### ***4.2.2.1. Implication de HLH-30/TFEB et l'action des composés identifiés sur son expression***

Afin de déterminer si HLH-30/TFEB est impliqué dans la MMJ, nous avons croisé les vers transgéniques mutants *ATXN3-CAG89* avec une souche transgénique fluorescente à gène rapporteur surexprimant *hll-30*. L'utilisation des vers fluorescents exprimant des gènes rapporteurs est une approche efficace permettant de cibler divers changements dans le système des vers. Ainsi, une fois le croisement terminé, une quantification du niveau de la fluorescence des vers à divers stades adultes, jours un, deux, trois et cinq, traités et non traités avec les composés identifiés, a été réalisée afin de déterminer le niveau d'expression de HLH-30. Aucune différence au niveau de la fluorescence n'a été observée au jour adulte un pour les vers traités et non traités, suggérant probablement une absence de perturbation de la voie autophagique à ce stade avec l'expression de HLH-30 restant intacte. Ensuite, aux jours adultes deux, trois et cinq, une augmentation du niveau de la fluorescence et donc une augmentation d'expression de HLH-30 a été rapportée pour les vers transgéniques mutants, lorsque comparés avec les contrôles, proposant un possible stress et une possible altération de la voie autophagique en réponse à la toxicité produite par la protéine ATXN3 mutante.

C'est alors que nous avons étudié l'activité des composés identifiés sur l'expression de HLH-30. Lorsque les vers mutants MMJ ont été traités avec CHEN, FEN et SULFA, aux jours adultes deux et trois, une diminution du niveau d'expression pour HLH-30, et inversement, au jour adulte cinq, une augmentation de son niveau d'expression ont été observées. Ces observations suggèrent que dans les premiers stades, aux jours adultes deux et trois, les trois composés, comme réponse protectrice au stress autophagique, tendent à ramener l'homéostasie dans le système, car au stade précoce, une activation excessive de certaines voies, incluant la voie autophagique, peut être néfaste pour l'organisme (502). De plus, à ces stades, comme une activation pour d'autres voies et mécanismes est déclenchée par le système, n'étant pas encore épuisés par les protéines poly-Q mutantes, une activation excessive de certaines voies peut altérer leur fonction et causer des effets toxiques, expliquant entre autres la réponse protectrice de ces composés à diminuer l'expression de HLH-30. Ensuite, ces mêmes composés, au jour adulte cinq, avec le vieillissement des vers, tendent à augmenter l'expression de HLH-30 donnant une

protection à l'organisme et diminuant l'effet toxique induit par les protéines poly-Q mutantes, ayant épuisées divers mécanismes et voies, incluant l'autophagie, dans le système. Cette transition peut être en partie expliquée par le phénomène de vieillissement. En effet, avec le vieillissement, une altération de plusieurs voies, telles que la voie autophagique, et une augmentation des agrégats protéiques et de la neurotoxicité ont été rapportées (502). De plus, il ne faut pas oublier que ces composés possèdent aussi d'autres fonctions. Outre leur possible implication dans la voie autophagique, ils peuvent aussi réguler et moduler en parallèle d'autres voies et mécanismes. Ceci dit, le traitement des vers mutants avec ces composés semble poser aucun problème qu'il soit employé à un stade précoce ou tardif, étant donné qu'ils parviennent à moduler leur voie cible selon les besoins et l'état du système, comme observé par la modulation du niveau d'expression de HLH-30 à divers jours. Une expérience fort intéressante à réaliser serait de commencer le traitement des vers mutants à un stade plus tardif, par exemple au jour adulte cinq ou sept plutôt qu'au jour adulte un, et effectuer une évaluation de leur motilité (tests de paralysie). Par cette expérience, il serait possible de voir si là aussi, lors d'un traitement tardif, les composés possèdent une activité neuroprotectrice significative et s'ils sont toujours aussi ou même plus efficaces à restaurer ce phénotype que lorsqu'ils sont traités à partir de leur premier jour adulte. Ces expériences devraient être évaluées sur d'autres organismes modèles tels que les souris, avant d'être évaluées en essais cliniques, pour connaître le meilleur stade de traitement. Même situation pour les patients atteints de la MMJ, il serait intéressant d'évaluer en essais cliniques des traitements pharmacologiques sur des patients symptomatiques à divers stades, précoce, intermédiaire et tardif, et évaluer ainsi leur efficacité, par exemple sur le principal symptôme de la MMJ, l'ataxie. Les observations obtenues démontrent donc une implication de HLH-30/TFEB dans la MMJ, et suggèrent aussi une possibilité quant à l'induction de l'autophagie médiée par l'activation de HLH-30/TFEB dans notre modèle MMJ. Cependant, afin de répondre à cette possibilité, des investigations supplémentaires concentrées sur le processus de la voie autophagique, incluant une quantification du niveau des autophagosomes et des autolysosomes dans les vers MMJ, et des croisements ou des expériences ARNi avec des gènes cibles de HLH-30/TFEB impliqués dans le processus de l'autophagie, tels que *sqst-1/p62*, adaptateur de cargo autophagique permettant le recrutement des substrats ubiquitinés dans les autophagosomes, et *lgg-1/LC3*, impliqué dans la sélection des substrats et de la formation des autophagosomes, sont nécessaires (503-505). Entre autres, plusieurs études effectuées sur

diverses maladies neurodégénératives ont rapporté une atténuation des phénotypes associée à la neurotoxicité de la pathologie par l'induction de la voie autophagique médiée par l'activation de TFEB, appuyant davantage l'hypothèse émise pour la MMJ (278,433,506-511).

En nous basant sur des études antérieures démontrant des effets bénéfiques d'une surexpression de TFEB quant à la clairance intracellulaire de l'agrégation protéique et à une amélioration des phénotypes associés à plusieurs maladies neurodégénératives (506,508-511), nous avons décidé d'étudier l'effet de cette surexpression dans notre modèle MMJ. Une surexpression de HLH-30/TFEB a démontré une restauration des phénotypes du défaut de la motilité et de la neurodégénérescence dans les vers mutants *ATXN3-CAG89*, proposant une possible prévention de la toxicité liée à la MMJ par l'activation de HLH-30/TFEB. De plus, un profil similaire a aussi été observé chez les vers mutants traités, à l'exception d'un des composés, FEN, démontrant un effet additif quant à la restauration de ces phénotypes associés à la MMJ. Ces observations suggèrent qu'il est possible de prévenir les phénotypes associés à la MMJ par une activation de HLH-30/TFEB, mais aussi, tout simplement, par l'utilisation du composé FEN, composé neuroprotecteur qui semble accomplir son action par l'activation de ce facteur de transcription, le proposant ainsi comme une approche potentielle possible pour diminuer la toxicité observée avec la MMJ.

#### ***4.2.2.2. Identification des composés dépendants et indépendants de HLH-30/TFEB***

Afin d'évaluer si l'action protectrice des composés identifiés était dépendante et directement associée à HLH-30/TFEB, les vers mutants MMJ ont été croisés avec des vers *hlh-30 knock-out*. Nous avons démontré que les composés CHEN, FEN et SULFA ont la nécessité de la présence du gène *hlh-30* pour accomplir leur rôle neuroprotecteur. En effet, en l'absence de ce gène, ces composés n'étaient plus en mesure de restaurer les phénotypes du défaut de la motilité et de la neurodégénérescence, confirmant ainsi leur dépendance et leur association directe à HLH-30/TFEB pour acheminer leur activité neuroprotectrice. Cependant, à l'opposé, les composés ALFA et CYCLO, même en l'absence de ce gène, étaient capables de restaurer ces phénotypes, résultant en une indépendance de leur action neuroprotectrice à ce gène. Par conséquent, l'habileté de ces composés à diminuer et à prévenir les phénotypes observés dans notre modèle MMJ est due à d'autres voies et mécanismes empruntés dans le système, nécessitant des investigations futures. Contrairement aux attentes, *hlh-30 knock-out* dans notre

modèle transgénique MMJ a montré un effet plutôt neutre que toxique. En effet, sa surexpression réduit significativement les phénotypes de la paralysie et de la neurodégénérescence, tandis que son *knock-out* n'a présenté aucun effet significatif sur les vers mutants MMJ. Ceci pourrait être dû entre autres aux effets compensatoires d'autres gènes autophagiques clés tels que *atg-18/WIP12*, *atg-10/ATG10*, *sqst-1/p62*, *lgg-1/LC3*, neutralisant ainsi l'effet de *hh-30* lors de la MMJ. Il est aussi possible que les composés ALFA et CYCLO acheminent leur rôle neuroprotecteur par le biais d'un de ces gènes, étant des gènes essentiels quant au processus de l'autophagie. Par conséquent, évaluer d'abord l'effet des composés sur ces gènes avant de passer à d'autres voies pourrait être une stratégie efficace. Afin d'évaluer cette hypothèse, un croisement entre les vers mutants MMJ et des vers KO des gènes autophagiques clés mentionnées devrait être réalisé, suivi par une évaluation des phénotypes du défaut de la motilité et de la neurodégénérescence. Comme il s'agit de gènes essentiels à la voie autophagique, leur KO devrait normalement aggraver ces phénotypes dans les vers mutants MMJ, s'il n'y a pas une intervention des effets compensatoires d'autres gènes. Une fois ces évaluations accomplies, les vers doivent être traités avec les composés ALFA et CYCLO afin de déterminer si leur action neuroprotectrice est dépendante ou pas à un de ces gènes. Si une restauration des phénotypes du défaut de la motilité et de la neurodégénérescence est observée, cela voudrait alors dire que leur action est indépendante aux gènes évalués en cas de MMJ. Mais au contraire, s'il y a une absence de restauration, c'est alors qu'une association entre leur action neuroprotectrice et le gène autophagique en question est effectuée.

#### ***4.2.2.3. Fonctions générales des composés et leurs mécanismes d'action possibles dans la MMJ***

Comme mentionné auparavant, les composés neuroprotecteurs identifiés incluent ALFA, CHEN, CYCLO, SULFA et FEN. Les cinq composés identifiés étaient approuvés par la FDA et capables de passer la barrière hématoencéphalique, facilitant ainsi leur utilisation pour le traitement des troubles cérébraux, employés pour d'autres neuropathologies. De plus, ces composés sont démarqués significativement des autres à améliorer les phénotypes associés à notre modèle MMJ, incluant le défaut de la motilité, la neurodégénérescence et la longévité réduite à une concentration optimale de 2  $\mu$ M.

Le composé ALFA est connu en tant que métabolite actif de la vitamine D (son analogue) avec des fonctions importantes dans la régulation de la balance calcique et du métabolisme osseux (512). Il a été démontré qu'une carence en vitamine D peut causer plusieurs maladies neurodégénératives, incluant la sclérose en plaques, la MP et la MA (512-514). Dans une étude réalisée avec le modèle *C. elegans*, il a également été rapporté que le métabolisme de la vitamine D est conservé entre les nématodes et les mammifères (515). De plus, le traitement des vers avec la vitamine D s'est avéré favoriser l'homéostasie protéique et augmenter la longévité, suggérant le maintien d'un niveau approprié de la vitamine D dans le système essentiel pour entre autres prévenir le vieillissement et les maladies liées à l'âge (515). La vitamine D est également impliquée dans le processus de la réparation des dommages à l'ADN lors d'un stress oxydatif, et dans la prévention de la neuroinflammation (516,517). Ce n'est pas pour rien que ce composé a figuré parmi les meilleurs candidats en cas de MMJ. En effet, comme mentionné précédemment, la protéine ATXN3 mutante provoque plusieurs altérations dans le système, incluant entre autres la production d'un niveau élevé de stress oxydatif, des dommages à l'ADN, et une dérégulation de la voie calcique, des perturbations pouvant être possiblement corrigées par l'utilisation du composé ALFA, analogue de la vitamine D. Par ailleurs, comme déjà démontré, la protéine ATXN3 mutante se lie à IP<sub>3</sub>R1 et provoque la libération de calcium, augmente le flux calcique et ainsi, en raison de la surcharge du niveau de calcium dans le système et une dérégulation de cette voie, plusieurs effets néfastes sont produits (340,341). Ceci dit, comme la vitamine D est impliquée dans l'homéostasie de la voie calcique, et qu'une perturbation au niveau de la signalisation de cette voie a été rapportée en cas de la MMJ, il est probable que l'action protectrice du composé ALFA soit dépendante à cette voie. Pour évaluer cette hypothèse, il serait possible de croiser les vers mutants MMJ avec des vers mutants KO pour le gène *itr-1/ITPR1* («*Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Type 1*»), et de les traiter avec le composé ALFA, similairement aux expériences effectuées pour HLH-30/TFEB au Chapitre 2. Par ces expériences, il serait possible à déterminer si l'action protectrice du composé ALFA est dépendante ou pas de la voie calcique.

Concernant le composé CHEN, ou acide chénodésoxycholique, il s'agit d'un des acides biliaires principaux synthétisés par le foie. Il est le produit catabolique obtenu par le métabolisme du cholestérol suite à diverses étapes enzymatiques (518). Il agit en tant que molécule de stéroïde amphipathique favorisant la perméation à travers les membranes biologiques et possède des effets



anti-inflammatoires (519-522). Son rôle est de dissoudre le cholestérol, à inhiber sa production dans le foie et son absorption par l'intestin, permettant ainsi entre autres une diminution de la formation des calculs biliaires (523). Par ailleurs, lorsqu'il est utilisé en tant que molécule pharmacologique, il permet de diminuer la saturation en cholestérol de la bile, et par conséquent cela peut favoriser la dissolution progressive des calculs biliaires du cholestérol (524). Il a également été rapporté que le traitement d'un modèle transgénique de rat pour la MA avec CHEN a permis de diminuer la neurotoxicité et la détérioration cognitive en activant la protéine CREB, en augmentant le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF) et en favorisant la signalisation de la voie de l'insuline (523). Comme déjà identifié pour la protéine ATXN3 à interagir avec des régulateurs impliqués dans la voie IIS et dans le processus de la transcription, ces découvertes peuvent également être évaluées dans notre modèle *C. elegans* MMJ, en les croisant avec des gènes clés impliqués dans ces processus tels que *daf-16/FOXO*, *daf-2/IGF1R* et *crh-1/CREB* (127,174,175,375). Une fois les vers croisés, une évaluation des phénotypes associés à nos vers MMJ, tels que le défaut de la motilité, de la neurodégénérescence et de la longévité réduite devrait être entreprise. Il est utile d'évaluer ce dernier phénotype dans cette situation, car les gènes d'intérêt y sont impliqués dans sa régulation (525-527). Comme résultats, un KO de *daf-16/FOXO* et *crh-1/CREB* dans les vers mutants MMJ devraient démontrer une aggravation du défaut de la motilité, de la neurodégénérescence et de la longévité réduite. Toutefois, pour ce qui est du gène *daf-2/IGF1R*, selon ses fonctions dans la voie IIS et ses actions sur la longévité, un KO pourrait au contraire avoir des effets bénéfiques et permettre ainsi une restauration de ces phénotypes. Comme prochaine étape, il faudrait traiter ces vers avec le composé CHEN pour déterminer si son action neuroprotectrice est due à son implication dans cette voie ou pas en cas de MMJ. Également, selon les gènes auxquels l'action neuroprotectrice de CHEN en est dépendante, des croisements entre les vers mutants MMJ et des vers surexprimant ces gènes devront être accomplis afin d'identifier l'effet de cette surexpression sur notre modèle MMJ, mais aussi, si un effet additif existe pour le composé CHEN lorsqu'un de ces gènes est surexprimé. Dans cette thèse, une nouvelle action a été identifiée pour le composé CHEN. En effet, nous avons démontré que CHEN requiert HLH-30/TFEB pour compléter ses activités neuroprotectrices et diminuer la neurotoxicité dans notre modèle MMJ. Ainsi, un rôle neuroprotecteur et une implication possible de ce composé dans la voie autophagique, en condition de la MMJ, ont été établis. Entre autres, en condition pathologique, il a été démontré

que les acides biliaires, incluant l'acide chénodésoxycholique (CHEN), provoquent une diminution de l'expression et du recrutement de Rab7 aux autophagosomes, petite GTPase avec un rôle critique dans le trafic membranaire, entraînant ainsi une altération dans la fusion des autophagosomes-lysosomes et une diminution importante du flux autophagique dans les hépatocytes d'un modèle de souris (528). Ceci dit, dans notre modèle *C. elegans* MMJ, il se pourrait aussi qu'une altération existe à ce niveau et ainsi, le traitement avec CHEN permet une amélioration et une augmentation des fusions entre les autophagosomes et les lysosomes. Pour répondre à cette hypothèse, une inhibition génétique des gènes impliqués dans ces processus, tel que *rab-7/Rab7*, *lgg-1/LC3*, *lgg-2/LC3* et *vps-39/VPS39* (« *Vacuolar Protein Sorting factor 39* ») peut être entreprise (529-531), suivie par une évaluation des phénotypes associés à notre modèle MMJ, incluant le défaut de la motilité et de la neurodégénérescence. Pour les gènes étant impliqués dans la MMJ, leur KO devrait se traduire par une aggravation de ces phénotypes. Suite à cela, ces vers devront être traités avec le composé CHEN afin de déterminer si son action neuroprotectrice en est dépendante ou pas aux gènes impliqués dans ces processus autophagiques. Si une absence de restauration des phénotypes évalués est observée, c'est alors que l'action du composé en est dépendante aux gènes en question. De plus, il serait intéressant d'évaluer l'effet d'une surexpression de ses gènes dans notre modèle MMJ. Il est également possible de quantifier le nombre d'autophagosomes et d'autolysosomes présents dans les vers MMJ, par la microscopie à fluorescence, en les croisant avec des vers fluorescents à gène rapporteur exprimant *lgg-1/LC3* (505).

Le composé CYCLO, ou cytophosphane, est un agent alkylant employé pour traiter divers types de tumeurs, figurant parmi les plus efficaces des médicaments antinéoplasiques (532). Il peut être également utilisé en tant qu'immunosuppresseur, immunomodulateur et/ou anti-inflammatoire puissant (533,534). Son utilisation dans la maladie de la sclérose en plaques a permis de ralentir la progression de la maladie en raison de son rôle d'immunomodulateur et d'immunosuppresseur (535). Ce composé est également utilisé pour des individus atteints d'une MA légère à modérée, entraînant une amélioration de la cognition (536). D'après les expériences de criblage réalisées dans notre modèle MMJ, ce composé a figuré parmi les candidats potentiels avec une capacité à réduire considérablement le défaut de la motilité, la neurodégénérescence et à favoriser une extension de la durée de vie chez les vers mutants MMJ. Toutefois, son action neuroprotectrice s'est avérée indépendante au facteur de transcription HLH-30/TFEB nécessitant

ainsi des investigations supplémentaires quant à son mécanisme d'action en cas de MMJ. En raison de ses fonctions, il se pourrait qu'il y ait en jeu une implication de la voie de signalisation p38-MAPK (« *Mitogen-activated protein kinase* »), activée en condition de stress. Cependant, il est à noter que le système immunitaire des vers *C. elegans* est limité comparativement à celui des mammifères. En effet, ils sont dépourvus d'un système immunitaire adaptatif et plusieurs facteurs impliqués dans le système immunitaire inné sont aussi manquants, mais ils possèdent tout de même plusieurs voies de signalisation conservées, incluant entre autres la voie de MAPK et les facteurs de transcription FOXO (537). Une activation de la voie de signalisation p38-MAPK, une voie essentielle à la biosynthèse des pro-inflammatoires cytokines, a provoqué une neurotoxicité importante dans plusieurs maladies neurodégénératives, incluant la MA, la SLA, la MP et la MH (538-541). Il serait également intéressant de déterminer s'il y a une activation et une implication de cette voie dans la neurotoxicité produite dans notre modèle MMJ. Pour y répondre, une inhibition génétique des gènes de la voie de signalisation p38-MAPK devrait être effectuée dans les vers MMJ, suivie d'une évaluation quant aux phénotypes du défaut de la motilité et de la neurodégénérescence. Si une restauration de ces phénotypes est observée, cela veut donc dire que cette voie est activée et est impliquée dans la neurotoxicité produite dans les vers MMJ. Ensuite, ces vers doivent être traités avec le composé CYCLO pour déterminer si son action neuroprotectrice est due à son implication dans cette voie immunitaire ou pas. Afin de s'assurer qu'il agit bien en tant qu'inhibiteur, des croisements entre les vers MMJ et des vers surexprimant les gènes lui étant dépendants devront également être entrepris.

Le composé SULFA est un antibactérien sulfonamide inhibant l'enzyme DHPS (« *dihydropteroate synthase* »), une enzyme impliquée dans la synthèse des folates. Les sulfonamides sont des bactériostatiques; ils inhibent la croissance et la multiplication des bactéries, sans toutefois les tuer (542). Une susceptibilité à cet antibiotique a été rapportée entre autres pour le microorganisme *E. coli* pour la souche K-12 (543). Ce composé est également un inhibiteur sélectif de l'isozyme CYP2C9 du cytochrome P450 chez les mammifères, enzyme impliquée dans le métabolisme des xénobiotiques, tels que les médicaments, et des composés endogènes, incluant les hormones stéroïdes et les acides gras (544-546). Par ailleurs, il a été démontré que ce composé parvient à inhiber l'action de CYP2C9 dans le stress oxydatif induit par l'acide linoléique, un acide gras essentiel, et les effets pro-inflammatoires et athérogènes dans des cellules endothéliales vasculaires (547). Le génome de *C. elegans* encode un grand nombre

de membres de la famille du cytochrome P450. Ils sont impliqués dans ce modèle dans divers processus, incluant le maintien d'une composition saine en gras, des activités xénobiotiques, le métabolisme des composés endogènes et exogènes, tels que l'oméga-3 et des acides gras, et le stockage et la régulation des lipides (548-553). Dans une étude effectuée sur la MP chez le modèle *C. elegans*, une augmentation de la durée de vie et une augmentation des neurones dopaminergiques en santé ont été observées suite au traitement des vers avec le composé SULFA, suggérant ainsi ce composé comme étant neuroprotecteur dans leur modèle développé pour la MP (545). Aussi, après avoir effectué un alignement de la séquence protéique de CYP2C9 humaine dans les données de protéines pour le *C. elegans*, le résultat cyp-33C11 est sorti; un homologue de l'isozyme CYP2J2 chez les mammifères, une enzyme oxygénase impliquée dans le métabolisme des xénobiotiques, dans la synthèse du cholestérol, des stéroïdes et des lipides, et dans le métabolisme de l'acide arachidonique (acide gras) en acides époxyicosatriénoïques (545,554). Un rôle dans l'activation de PKC et dans l'autophagie a également contribué au composé SULFA lors d'une cardioprotection, suggérant cette protection à la suite de son activité à induire l'autophagie selon l'activation de PKC (555). Cette étude appuie les découvertes présentées dans cette thèse où l'activité neuroprotectrice de SULFA en cas de MMJ s'est avérée dépendante au facteur de transcription HLH-30/TFEB, qui peut aussi être activé et induire l'autophagie par entre autres PKC. Par conséquent, une fonction neuroprotectrice et une implication possible de ce composé dans la voie autophagique, en condition de la MMJ, ont été confirmées. Basé sur ses fonctions, il se pourrait que ce composé soit impliqué dans la fusion des autophagosomes-lysosomes et/ou dans l'exocytose des lysosomes. Tout comme pour CHEN, afin d'étudier ses possibilités, des inhibitions génétiques avec des gènes spécifiques impliqués dans ces processus peuvent être entreprises dans les vers MMJ, suivies par un traitement avec le composé SULFA et une évaluation des phénotypes associés à notre modèle MMJ, tels que le défaut de la motilité et de la neurodégénérescence. Aussi, similairement à CHEN, une quantification des autophagosomes et des autolysosomes peuvent être réalisés suite au croisement des vers MMJ avec des vers fluorescents à gène rapporteur *lgg-1/LC3*.

Finalement, le composé FEN est un anti-inflammatoire non stéroïdien principalement utilisé pour traiter l'inflammation. Il empêche la production de la prostaglandine qui peut provoquer une inflammation, par l'inhibition de la cyclooxygénase (COX) (556). Une neuroinflammation a été observée dans diverses maladies neurodégénératives, incluant la MA, la

MP, la MH, la SLA et la MMJ (344,557-563). Ainsi, l'utilisation du composé FEN pourrait être un traitement bénéfique à employer afin de réduire cette inflammation. De plus, une fonction en tant qu'antioxydant a aussi été rapportée pour ce composé, démontrant une capacité à éliminer les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et les espèces réactives de nitrate (RNS) (564). Par ailleurs, il s'agit d'une cible intéressante à évaluer dans notre modèle MMJ, étant donné qu'un niveau élevé du stress oxydatif a déjà été identifié dans ces vers (42). Il serait pertinent de traiter les vers MMJ avec ce composé et d'évaluer si une diminution du stress oxydatif peut être provoquée. Dans la présente thèse, nous avons démontré que le composé FEN possède une efficacité à restaurer les phénotypes du défaut de la motilité, de la neurodégénérescence, et de la longévité réduite dans notre modèle MMJ dépendamment à HLH-30/TFEB. Un effet additif pour ce composé quant à la réduction des phénotypes du déficit moteur et de la neurodégénérescence a également été identifié lors d'une surexpression de HLH-30/TFEB dans les vers MMJ. D'après son action si bénéfique et efficace, il est possible que ce composé puisse avoir un rôle à toutes les étapes du processus de l'autophagie tout en stimulant et en induisant la formation des autophagosomes et en augmentant le flux autophagique dans le système. De plus, il serait aussi intéressant d'étudier dans notre modèle MMJ, en présence et en absence du composé FEN, l'effet d'une inhibition et d'une surexpression génétique de la protéine kinase PMK-1/p38-MAPK, impliquée entre autres dans l'induction de la cyclooxygénase (COX2) et étant considérée comme une cible potentielle pour l'inflammation chez les mammifères (565,566). Enfin, basé sur ces découvertes prometteuses, il serait d'une grande pertinence de confirmer l'action du FEN sur des modèles mammifères MMJ. Si les résultats s'avèrent rester positifs dans les futurs essais précliniques, comme ce composé est déjà approuvé par la FDA, sa transition rapide est possible pour des essais cliniques.

#### **4.2.2. FKH-2/FOXG1 dans la MMJ**

##### ***4.2.2.1. Inhibition et surexpression génétiques***

Suite à l'identification du gène *fkh-2* par le criblage à base d'ARNi, nous avons voulu confirmer les effets observés lors d'un *knock-down* de ce gène aussi en condition de *knock-out*. Par conséquent, les vers transgéniques mutants *ATXN3-CAG89* ont été croisés avec des vers *fkh-2* KO. Tout comme lors d'un *knock-down*, le KO de ce gène a également provoqué une aggravation des phénotypes associés à notre modèle MMJ. Effectivement, en l'absence de ce

gène, les vers mutants MMJ ont démontré une augmentation du défaut de la motilité, de la neurodégénérescence et une réduction de la longévité.

Nous avons ensuite voulu évaluer l'effet d'une surexpression du gène *fkh-2* dans notre modèle MMJ. Inversement à ses *knock-down* et KO, une surexpression de ce gène s'est montré être neuroprotectrice. Elle a permis d'améliorer significativement tous les phénotypes mentionnés : une amélioration du défaut de la motilité, une réduction de la neurodégénérescence, et une extension de la durée de vie des vers mutants MMJ, résultant ainsi en la diminution de la neurotoxicité causée par l'expansion de poly-Q dans la protéine ATXN3 mutante. Dans une étude effectuée sur la levure, lors d'un KO des gènes *FKH1* et *FKH2*, des altérations au niveau de la résistance au stress et une longévité réduite, et à l'inverse, lors de leur surexpression, une amélioration des réponses au stress cellulaire et une augmentation de la durée de vie ont été observées, proposant ces gènes comme régulateurs de la durée de vie et de la réponse au stress (567). Évalué également dans notre modèle *C. elegans* MMJ, l'effet d'un *knock-out* ou d'une surexpression de *fkh-2* sur divers types de stress, tels que le stress oxydatif et le stress du RE, serait aussi une approche à considérer. Pour évaluer le stress oxydatif dans ces vers, l'utilisation de la dichlorofluorescéine diacétate, une sonde sensible employée pour détecter le peroxyde intracellulaire et le stress oxydatif, peut être une approche intéressante à entreprendre, comme déjà utilisée dans des travaux antérieurs pour la quantification du stress oxydatif dans les vers mutants MMJ (42). Pour la quantification du stress du RE, il est possible de croiser les vers mutants MMJ KO et surexprimant le gène *fkh-2* avec des vers transgéniques à gène rapporteur *hsp-4::GFP*. Le gène *hsp-4* encode pour la protéine HSP70/BiP (« *Immunoglobulin heavy chain-binding protein* »), chaperon régulateur clé des fonctions du RE (568,569). Lorsqu'il y a un stress au niveau du RE, ce chaperon est activé et est détecté par une émission de la fluorescence verte. Ainsi, par cette approche, il serait possible de déterminer si une inhibition ou une surexpression du gène *fkh-2* dans notre modèle MMJ est capable d'éliminer ou de prévenir le stress du RE, et aussi possiblement de déterminer un nouveau rôle pour ce gène dans la modulation du stress du RE.

#### **4.2.2.2. Mécanismes d'action possibles**

Les connaissances sur le gène *fkh-2* sont très limitées. Par conséquent, des investigations supplémentaires sont nécessaires pour déterminer comment, par quels mécanismes et voies de signalisation, ce facteur de transcription achemine son rôle neuroprotecteur dans la MMJ. Comme

dans notre modèle MMJ nous avons observé des changements au niveau de la durée de vie des vers lors de son KO ou de sa surexpression, et qu'aussi, il a été identifié en tant que régulateur de la longévité chez la levure, évaluer les voies étant impliquées dans la régulation de la durée de vie chez *C. elegans*, incluant les voies de signalisation IIS, mTOR, la respiration mitochondriale et la restriction calorique, semble être des approches prometteuses. Ceci dit, il serait efficace d'effectuer des croisements avec des gènes principaux impliqués dans ces voies, tels que *daf-2/IGF1R*, *daf-16/FOXO*, *eat-2/CHRFAM7A*, *sir-2.1/SIRT1* *akt/AKT*, *clk-1/COQ7* (« Coenzyme Q7 »), *pha-4/FOXA*, et ensuite évaluer l'action de *fkh-2* lors d'un KO de ces gènes en cas de MMJ. Il serait également très intéressant d'évaluer si l'action neuroprotectrice de FKH-2 est dépendante ou pas à HLH-30/TFEB, ayant été démontré à être impliqué dans la régulation de l'autophagie et la modulation de la longévité chez le modèle *C. elegans* (424). Comme autre approche, il serait aussi possible de combiner les deux projets de cette thèse, en traitant les vers mutants MMJ surexprimant ou *knock-out* de *fkh-2* avec les composés neuroprotecteurs identifiés, et d'évaluer les phénotypes associés à la MMJ dans notre modèle, incluant le défaut de la motilité, la neurodégénérescence et la longévité réduite. Des expériences similaires à celles effectuées pour le Chapitre 2 avec le gène *hlh-30* seront entreprises. Par cette approche, il serait possible de déterminer si les composés potentiels identifiés au Chapitre 2 peuvent aussi avoir une action neuroprotectrice dépendante ou pas au gène *fkh-2*. De cette manière, il serait peut-être possible de déterminer un nouveau rôle pour les composés, mais aussi, de suggérer une approche chimique pour la modulation de l'activité de *fkh-2/FOXGI* lors de la MMJ.

#### **4.2.3. Lien entre les deux facteurs de transcriptions identifiés et des voies cellulaires impliquées dans la MMJ**

Une grande quantité de données a été obtenue sur l'expression génique suite à l'invention des techniques de puce à l'ADN (« *microarray* ») et le séquençage d'ARN (570). En effet, la découverte de ces méthodes a fourni des aspects quantitatifs et informatifs importants sur la science de la biologie (571). Les progrès rapides de la génomique ont aussi permis le développement des méthodes à haut débit permettant à mesurer simultanément de nombreux gènes dans des centaines de cellules individuelles, tel que le transcriptomique unicellulaire (« *Single cell transcriptomics* »). À partir de cette approche, il est possible à quantifier la concentration d'ARN messenger dans des centaines et des milliers de gènes, à déterminer la

distribution spatiale des ARN messagers dans une cellule afin d'identifier les mécanismes fondamentaux qui y sont impliqués dans leur motilité et leur développement et aussi, à découvrir l'hétérogénéité et les relations à l'échelle du transcriptome entre différents gènes (571). Afin d'identifier des gènes étant influencés par une inhibition génétique des gènes *hlh-30/TFEB* et *fkh-2/FOXG1* dans notre modèle MMJ, et par ces gènes, des voies cellulaires et des mécanismes étant perturbés en cas de la pathogenèse de cette maladie, diverses approches efficaces existent, incluant entre autres l'utilisation de la méthode du transcriptomique unicellulaire en réalisant un séquençage d'ARN. Des méthodes alternatives à celles-ci existent également. Entre autres, à partir des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine et un séquençage à haut débit effectuée sur la levure, il a été démontré que FKH2 interagit et régule divers types d'enzymes, incluant les enzymes métaboliques impliqués dans la synthèse de la glutamine et la biogenèse de la paroi cellulaire, des enzymes impliqués dans le contrôle de la réplication d'ADN, la stabilité de la chromatine, le signal de la transduction et la régulation du cycle cellulaire (572-575). Basé sur ces études et celles effectuées pour la MMJ, il est possible que le gène *fkh-2* interagisse avec des enzymes impliqués soit au niveau de la réparation d'ADN, la régulation de la transcription, ou encore, dû à ses fonctions dans la résistance au stress, avec des enzymes impliqués dans le stress oxydatif et le stress du RE. Comme il a été démontré au Chapitre 3, le KO de ce gène a présenté des effets néfastes dans les vers mutants MMJ, et qu'au contraire, sa surexpression, des propriétés neuroprotectrices. Ceci démontre que le gène *fkh-2* possède certainement une fonction importante et interagit avec des enzymes essentiels dans le système. La réalisation d'un séquençage d'ARN à cellule unique serait définitivement une approche efficace à entreprendre afin d'identifier ses interactions en cas de MMJ, une maladie neurodégénérative.

Pour ce qui est du gène *hlh-30*, comme déjà mentionné auparavant, il possède un rôle essentiel dans les processus de la clairance intracellulaire, incluant la voie autophagique et la biogenèse lysosomale. Dans une étude effectuée sur un modèle cellulaire KO pour le gène *TFEB*, suite aux analyses du séquençage d'ARN, une dérégulation importante de la réponse aux dommages à l'ADN, ainsi que les régulateurs en amont et les cibles en aval de p53 ont été observés (576). Dans une autre étude, effectuée chez le modèle *C. elegans*, afin de déterminer si les facteurs de transcription HLH-30 et DAF-16 fonctionnent conjointement pour réguler des gènes situés en leur aval, un séquençage d'ARN messenger dans des vers KO pour les gènes *hlh-30* et *daf-16* dans divers mutants a été réalisé (425). Comme résultats, il a été observé que ces



deux gènes co-régulent plusieurs gènes, incluant en particulier ceux impliqués dans le vieillissement (425). Également, dans une étude réalisée chez le *C. elegans*, suite à des analyses d'une réaction en chaîne par polymérase quantitative, il a été démontré que HLH-30 régule l'autophagie et la fonction lysosomale, et est nécessaire pour l'inhibition de la voie mTOR afin d'augmenter la longévité dans cet organisme modèle (424). L'implication du gène *hlh-30* dans notre modèle MMJ, comme démontré dans le Chapitre 2, et la perturbation de la voie autophagique lors de cette pathologie rend essentiel à effectuer un séquençage d'ARN à cellules unique afin d'étudier davantage cette voie et à identifier les gènes qui y sont dérégulés dans cette voie, mais aussi dans d'autres, lors d'une inhibition génétique de *hlh-30* dans notre modèle MMJ.

### **4.3. Criblages dans d'autres maladies à expansion de poly-Q**

Les criblages pharmacologiques et génétiques sont une approche utilisée pour plusieurs autres maladies neurodégénératives, y compris les maladies à expansion de poly-Q. Dans divers organismes modèles, cette approche est employée pour identifier des candidats potentiels et de mieux comprendre les voies cellulaires qui sont associées à la maladie d'intérêt, afin d'éventuellement développer des thérapies potentielles pour traiter les patients qui y sont atteints.

#### **4.3.1. Criblages pharmacologiques**

Plusieurs criblages pharmacologiques ont été effectués dans divers modèles pour les maladies à expansion de poly-Q, incluant la maladie de Huntington (MH). Entre autres, dans une étude effectuée sur une lignée cellulaire pour la MH, un criblage à haut débit pour identifier des composés capables à augmenter la dégradation de la protéine Huntington mutante (mHtt) a été réalisé, et ceci a permis l'identification de plusieurs inhibiteurs de la protéine HSP90 (577). Le traitement des cellules avec ces inhibiteurs a permis une réduction importante du niveau de la protéine mutante et une augmentation de leur clairance par la voie UPS (577). L'utilisation des inhibiteurs HSP90 est une approche également efficace pour d'autres maladies à expansion de poly-Q, tel que la MMJ. En effet, le traitement d'un modèle *C. elegans* MMJ avec un inhibiteur HSP90 s'est également avéré bénéfique, permettant une diminution d'agrégation de la protéine ATXN3 mutante et une amélioration de l'activité locomotrice des vers mutants (375). Plusieurs autres composés ont été identifiés à partir des criblages pharmacologiques, effectués dans des modèles pour la MH, incluant des modèles de lignées cellulaires, de *C. elegans*, de drosophiles et

des poissons-zèbres, permettant une diminution ou une restauration de la perte neuronale et de la dégénérescence, et démontrant des propriétés neuroprotectrices (578,579). Ce type de criblage a aussi été effectué sur un modèle de lignée cellulaire pour la maladie SBMA, et comme résultats, quatre composés se démarquant significativement des autres à diminuer la cytotoxicité dans le modèle à l'étude ont été identifiés (580).

#### **4.3.2. Criblages génétiques à base d'ARNi**

Quant aux criblages génétiques à base d'ARNi, cette approche est aussi employée dans plusieurs maladies à expansion de poly-Q. Entre autre, par cette approche, il a été possible d'identifier plusieurs modificateurs génétiques modulant la dégradation et la clairance de la protéine mHtt, soit en augmentant ou en diminuant le profil d'agrégation, la neurodégénérescence et la neurotoxicité dans des modèles de lignées cellulaires et de drosophile (581-583). Aussi, afin de trouver des gènes qui, lors de leur *knock-down*, entraînent une apparition prématurée d'agrégats de protéines, un criblage d'ARNi à l'échelle du génome a été effectué chez le modèle *C. elegans*, à partir des souches exprimant une expansion de poly-Q (584). Ce criblage a permis l'identification des gènes correspondant aux principales classes de régulateurs de polyglutamine, incluant des gènes impliqués dans le métabolisme d'ARN, la synthèse, le repliement, la dégradation et le trafic protéique (584). Également, dans une autre étude, utilisant un modèle de *C. elegans* pour la MH, les criblages génétiques à base d'ARNi ont permis l'identification de plusieurs gènes, correspondant à diverses voies cellulaires, incluant les voies métaboliques, neurodéveloppementales et de longévité, dont leur inactivation avait un impact important sur les vers mutants, soit un diminuant ou en aggravant leur neurotoxicité (585).

#### **4.3.3. Lien entre les criblages effectués pour cette thèse et ceux des autres études**

Les projets de recherche employant cette approche possèdent tous un but en commun, et celui-ci est l'identification des candidats potentiels, des molécules pharmacologiques ou des modificateurs génétiques, permettant à réduire ou à prévenir la pathogenèse et la neurotoxicité associée à une pathologie. Pour ce qui est des criblages pharmacologiques, ils permettent d'identifier et à sélectionner, parmi des bibliothèques comportant des centaines et des milliers de composés, les candidats se démarquant significativement des autres quant à la restauration d'un phénotype donné. Dans notre cas, pour les criblages en milieu liquide, le phénotype évalué était

le défaut de la motilité, mais d'autres phénotypes peuvent également être étudiés, tel qu'entre autres, l'agrégation et la dégénérescence des cellules neuronales. Pour les criblages génétiques à base d'ARNi, ils permettent la détermination des gènes dont leur inactivation peut avoir des effets néfastes ou bénéfiques sur la pathogenèse et la neurotoxicité de la maladie en question. À partir de ces deux types de criblage, à part l'identification des candidats prometteurs, il est également possible à déterminer des voies de signalisation et des mécanismes en jeu en cas de la maladie. Ces découvertes mènent une meilleure compréhension et un approfondissement des connaissances quant aux aspects affectant la maladie d'intérêt et par conséquent, cela permet éventuellement le développement de meilleures approches thérapeutiques pour contrer la maladie en question. De plus, comme les maladies à expansion de poly-Q partagent de nombreux caractères, y compris des similarités quant aux mécanismes et voies de signalisation perturbés, il serait également intéressant à évaluer les composés et les gènes candidats identifiés dans les projets de cette thèse dans d'autres maladies à expansion de poly-Q, tel que la MH. Par cette approche, il serait entre autre possible à déterminer si leurs actions sont générales ou seulement spécifiques à la MMJ.

## Chapitre 5. Conclusions générales

La maladie de Machado-Joseph est une maladie neurodégénérative causée par une expansion anormale des répétitions de trinuécléotides CAG dans le gène *ATXN3*. Cette expansion entraîne non seulement une, mais plutôt un ensemble de perturbations et de dérégulations de plusieurs mécanismes et voies de signalisation menant au développement de la pathologie. Malheureusement, à ce jour, aucune thérapie spécifique n'est encore disponible pour traiter les individus souffrant de cette maladie dévastatrice traduite par de nombreux troubles physiques, cognitifs et psychologiques. Ainsi, des investigations supplémentaires et un approfondissement des connaissances quant aux mécanismes et voies de signalisation en jeu pour la MMJ sont essentiels afin de comprendre davantage la pathogenèse de cette maladie pour pouvoir éventuellement la contrer.

La présente thèse nous a permis de compléter deux projets qui nous ont menés à identifier l'implication de nouveaux facteurs génétiques et pharmacologiques dans la MMJ, à partir d'un modèle transgénique *C. elegans*. Tous les objectifs de cette thèse ont été accomplis et répondus avec succès. À partir du criblage pharmacologique, cinq composés potentiels et efficaces à améliorer les phénotypes associés à notre modèle MMJ, incluant le défaut de la motilité, la neurodégénérescence et la longévité réduite, à une concentration optimale de 2  $\mu$ M ont été identifiés. Ces composés sont l'alfacalcidol (ALFA), le chenodiol (CHEN), le cyclophosphamide (CYCLO), le fenbufen (FEN) et le sulfaphénazole (SULFA). À partir de l'action de ces molécules, il a été possible d'identifier l'implication du facteur de transcription HLH-30/TFEB, un régulateur essentiel de la voie autophagique-lysosomale, dans la MMJ. Parmi les candidats identifiés, CHEN, FEN et SULFA ont démontré une dépendance et une association directe à ce facteur de transcription quant à l'accomplissement de leur activité neuroprotectrice. Parmi ces derniers, FEN s'est avéré être le composé le plus efficace et potentiel quant à la réduction de la neurotoxicité produite par la protéine *ATXN3* mutante, en raison de son effet additif, suite à une surexpression de HLH-30/TFEB dans les vers MMJ. Par conséquent, ce composé est proposé comme étant bénéfique et prometteur à employer pour le traitement de la MMJ, mais aussi possiblement, à être étudié pour d'autres maladies à expansion de poly-Q. Maintenant qu'une association a été effectuée entre HLH-30/TFEB et la MMJ, il serait intéressant et pertinent d'examiner davantage la voie autophagique et l'action des composés lui étant dépendants lors de

ce processus. Par la suite, par le criblage des modificateurs génétiques à base d'ARNi, un nouveau candidat potentiel impliqué dans la MMJ, *fkh-2/FOXG1*, a été identifié. L'ablation de ce gène a induit une aggravation des phénotypes liés à notre modèle MMJ, mais à l'inverse, sa surexpression a permis une amélioration significative du défaut de la motilité et de la neurodégénérescence, et une extension de la durée de vie chez les vers MMJ, proposant ainsi, un rôle neuroprotecteur pour FKH-2/FOXG1, lorsque la protéine est surexprimée. Cette étude suggère que le rôle de *fkh-2* dans la modulation des réponses cellulaires au stress pourrait être conservé dans l'évolution et son activité neuroprotectrice pourrait faire de *FOXG1* une nouvelle cible thérapeutique pour la MMJ. Il serait donc pertinent d'étudier davantage sur *fkh-2/FOXG1*, afin de mieux comprendre et d'approfondir son rôle dans la MMJ. L'étudier dans d'autres maladies à expansion de poly-Q serait également avantageux, comme plusieurs mécanismes et voies de signalisations en sont similaires.

Les criblages et la souche transgénique *C. elegans ATXN3* sont des outils importants et puissants permettant l'identification rapide des molécules et des gènes, mais aussi des voies de signalisation en jeu dans la MMJ. Cette thèse a donc permis une grande contribution à la communauté scientifique en élucidant et en présentant de nouvelles informations sur la MMJ. Elle a permis non seulement d'identifier de nouveaux composés et facteurs de transcription en lien avec la pathologie de la MMJ, mais elle a aussi ouvert de nouvelles pistes d'étude pour d'autres maladies neurodégénératives. Les découvertes effectuées dans des maladies rares peuvent également servir de piste et contribuer à une meilleure compréhension quant aux mécanismes et voies cellulaires en jeu dans des maladies plus communes. Les découvertes prometteuses de cette thèse peuvent également servir des candidats potentiels à évaluer dans des organismes modèles MMJ plus avancés, comme les poissons-zèbres et les souris. Aussi, les molécules neuroprotectrices identifiées ayant démontrées des effets bénéfiques et prometteurs en essais précliniques peuvent être également ensuite sujets à une évaluation en essais cliniques sur les patients atteints de cette pathologie. Il reste maintenant à espérer qu'à partir de toutes ces recherches, des thérapies spécifiques pour traiter les individus atteints de cette maladie neurodégénérative dévastatrice finiront un jour par exister, permettant ainsi une meilleure qualité de vie pour tous les gens qui y sont atteints. Pour développer des stratégies thérapeutiques efficaces et prometteuses, il est aussi essentiel à avoir recours à de meilleures approches et méthodologies. En effet, dû à des biais méthodologique et épistémologique, certaines réalités

biologiques, incluant plusieurs voies cellulaires et mécanismes dans de nombreuses maladies, peuvent être sujettes à une surreprésentation et par conséquent, imposer des délais quant aux découvertes des thérapies spécifiques. Ceci dit, des efforts quant à l'invention de nouvelles techniques et méthodologies permettant une élucidation de nouvelles pistes pour traiter les patients atteints des maladies dévastatrices, incluant la MMJ, est définitivement essentielle.

## Bibliographies

1. La Spada, A.R. and Taylor, J.P. (2010) Repeat expansion disease: progress and puzzles in disease pathogenesis. *Nature Reviews. Genetics*, **11**, 247-258.
2. Budworth, H. and McMurray, C.T. (2013) A brief history of triplet repeat diseases. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, **1010**, 3-17.
3. Gatchel, J.R. and Zoghbi, H.Y. (2005) Diseases of unstable repeat expansion: mechanisms and common principles. *Nature Reviews. Genetics*, **6**, 743-755.
4. Paulson, H. (2018) Repeat expansion diseases. *Handbook of Clinical Neurology*, **147**, 105-123.
5. 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.
6. 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.
7. La Spada, A.R., Wilson, E.M., Lubahn, D.B., Harding, A.E. and Fischbeck, K.H. (1991) Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature*, **352**, 77-79.
8. Matos, C.A., de Macedo-Ribeiro, S. and Carvalho, A.L. (2011) Polyglutamine diseases: the special case of ataxin-3 and Machado-Joseph disease. *Prog Neurobiol*, **95**, 26-48.
9. Shao, J. and Diamond, M.I. (2007) Polyglutamine diseases: emerging concepts in pathogenesis and therapy. *Human Molecular Genetics*, **16 Spec No. 2**, R115-123.
10. Xu, Z., Joel Tito, A., Rui, Y.N. and Zhang, S. (2015) Studying polyglutamine diseases in *Drosophila*. *Experimental Neurology*, **274**, 25-41.
11. 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.
12. Teixeira-Castro, A., Jalles, A., Esteves, S., Kang, S., da Silva Santos, L., Silva-Fernandes, A., Neto, M.F., Briemann, 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*, **138**, 3221-3237.
13. Weber, J.J., Sowa, A.S., Binder, T. and Hübener, J. (2014) From pathways to targets: understanding the mechanisms behind polyglutamine disease. *Biomed Res Int*, **2014**, 701758.

14. 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.
15. Zoghbi, H.Y. and Orr, H.T. (1999) Polyglutamine diseases: protein cleavage and aggregation. *Current Opinion in Neurobiology*, **9**, 566-570.
16. Margulis, B.A., Vigont, V., Lazarev, V.F., Kaznacheyeva, E.V. and Guzhova, I.V. (2013) Pharmacological protein targets in polyglutamine diseases: mutant polypeptides and their interactors. *FEBS Letters*, **587**, 1997-2007.
17. Bauer, P.O. and Nukina, N. (2009) The pathogenic mechanisms of polyglutamine diseases and current therapeutic strategies. *J Neurochem*, **110**, 1737-1765.
18. Gardiner, S.L., Boogaard, M.W., Trompet, S., de Mutsert, R., Rosendaal, F.R., Gussekloo, J., Jukema, J.W., Roos, R.A.C. and Aziz, N.A. (2019) Prevalence of Carriers of Intermediate and Pathological Polyglutamine Disease-Associated Alleles Among Large Population-Based Cohorts. *JAMA Neurol*, **76**, 650-656.
19. Coutinho, P. and Andrade, C. (1978) Autosomal dominant system degeneration in Portuguese families of the Azores Islands. A new genetic disorder involving cerebellar, pyramidal, extrapyramidal and spinal cord motor functions. *Neurology*, **28**, 703-709.
20. McLoughlin, H.S., Moore, L.R. and Paulson, H.L. (2020) Pathogenesis of SCA3 and implications for other polyglutamine diseases. *Neurobiol Dis*, **134**, 104635.
21. 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.
22. 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.
23. Piccinin, C.C., Rezende, T.J.R., de Paiva, J.L.R., Moysés, P.C., Martinez, A.R.M., Cendes, F. and França, M.C., Jr. (2020) A 5-Year Longitudinal Clinical and Magnetic Resonance Imaging Study in Spinocerebellar Ataxia Type 3. *Mov Disord*, **35**, 1679-1684.
24. Paulson, H. (2012) Machado-Joseph disease/spinocerebellar ataxia type 3. *Handbook of Clinical Neurology*, **103**, 437-449.
25. Riess, O., Rüb, U., Pastore, A., Bauer, P. and Schöls, L. (2008) SCA3: neurological features, pathogenesis and animal models. *Cerebellum (London, England)*, **7**, 125-137.
26. Schöls, L., Bauer, P., Schmidt, T., Schulte, T. and Riess, O. (2004) Autosomal dominant cerebellar ataxias: clinical features, genetics, and pathogenesis. *Lancet Neurol*, **3**, 291-304.



27. Ashizawa, T., Dubel, J.R., Dunne, P.W., Dunne, C.J., Fu, Y.H., Pizzuti, A., Caskey, C.T., Boerwinkle, E., Perryman, M.B., Epstein, H.F. *et al.* (1992) Anticipation in myotonic dystrophy. II. Complex relationships between clinical findings and structure of the GCT repeat. *Neurology*, **42**, 1877-1883.
28. Tsilfidis, C., MacKenzie, A.E., Mettler, G., Barceló, J. and Korneluk, R.G. (1992) Correlation between CTG trinucleotide repeat length and frequency of severe congenital myotonic dystrophy. *Nature Genetics*, **1**, 192-195.
29. Souza, G.N., Kersting, N., Krum-Santos, A.C., Santos, A.S., Furtado, G.V., Pacheco, D., Gonçalves, T.A., Saute, J.A., Schuler-Faccini, L., Mattos, E.P. *et al.* (2016) Spinocerebellar ataxia type 3/Machado-Joseph disease: segregation patterns and factors influencing instability of expanded CAG transmissions. *Clinical Genetics*, **90**, 134-140.
30. Zoghbi, H.Y. and Orr, H.T. (2000) Glutamine repeats and neurodegeneration. *Annual Review of Neuroscience*, **23**, 217-247.
31. Takeuchi, T. and Nagai, Y. (2017) Protein Misfolding and Aggregation as a Therapeutic Target for Polyglutamine Diseases. *Brain Sciences*, **7**.
32. Selkoe, D.J. (2008) Soluble oligomers of the amyloid beta-protein impair synaptic plasticity and behavior. *Behavioural Brain Research*, **192**, 106-113.
33. Spires-Jones, T.L., Stoothoff, W.H., de Calignon, A., Jones, P.B. and Hyman, B.T. (2009) Tau pathophysiology in neurodegeneration: a tangled issue. *Trends in Neurosciences*, **32**, 150-159.
34. Williams, A.J. and Paulson, H.L. (2008) Polyglutamine neurodegeneration: protein misfolding revisited. *Trends in Neurosciences*, **31**, 521-528.
35. Wolfe, K.J. and Cyr, D.M. (2011) Amyloid in neurodegenerative diseases: friend or foe? *Seminars in Cell & Developmental Biology*, **22**, 476-481.
36. Kurtishi, A., Rosen, B., Patil, K.S., Alves, G.W. and Møller, S.G. (2019) Cellular Proteostasis in Neurodegeneration. *Mol Neurobiol*, **56**, 3676-3689.
37. Goedert, M., Eisenberg, D.S. and Crowther, R.A. (2017) Propagation of Tau Aggregates and Neurodegeneration. *Annual Review of Neuroscience*, **40**, 189-210.
38. Soto, C. and Estrada, L.D. (2008) Protein misfolding and neurodegeneration. *Arch Neurol*, **65**, 184-189.
39. Soto, C. and Pritzkow, S. (2018) Protein misfolding, aggregation, and conformational strains in neurodegenerative diseases. *Nature Neuroscience*, **21**, 1332-1340.
40. Kumar, V., Sami, N., Kashav, T., Islam, A., Ahmad, F. and Hassan, M.I. (2016) Protein aggregation and neurodegenerative diseases: From theory to therapy. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **124**, 1105-1120.

41. Matos, C.A., de Almeida, L.P. and Nobrega, C. (2019) Machado-Joseph disease/spinocerebellar ataxia type 3: lessons from disease pathogenesis and clues into therapy. *J Neurochem*, **148**, 8-28.
42. Fardghassemi, Y., Tauffenberger, A., Gosselin, S. and Parker, J.A. (2017) Rescue of ATXN3 neuronal toxicity in *Caenorhabditis elegans* by chemical modification of endoplasmic reticulum stress. *Dis Model Mech*, **10**, 1465-1480.
43. Bates, G. (2003) Huntingtin aggregation and toxicity in Huntington's disease. *Lancet*, **361**, 1642-1644.
44. Miller, J., Arrasate, M., Brooks, E., Libeu, C.P., Legleiter, J., Hatters, D., Curtis, J., Cheung, K., Krishnan, P., Mitra, S. *et al.* (2011) Identifying polyglutamine protein species in situ that best predict neurodegeneration. *Nature Chemical Biology*, **7**, 925-934.
45. Kaye, R., Head, E., Thompson, J.L., McIntire, T.M., Milton, S.C., Cotman, C.W. and Glabe, C.G. (2003) Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science*, **300**, 486-489.
46. Takahashi, Y., Okamoto, Y., Popiel, H.A., Fujikake, N., Toda, T., Kinjo, M. and Nagai, Y. (2007) Detection of polyglutamine protein oligomers in cells by fluorescence correlation spectroscopy. *J Biol Chem*, **282**, 24039-24048.
47. Takahashi, T., Kikuchi, S., Katada, S., Nagai, Y., Nishizawa, M. and Onodera, O. (2008) Soluble polyglutamine oligomers formed prior to inclusion body formation are cytotoxic. *Hum Mol Genet*, **17**, 345-356.
48. Kopito, R.R. (2000) Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends Cell Biol*, **10**, 524-530.
49. Fink, A.L. (1998) Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid. *Fold Des*, **3**, R9-23.
50. Davies, S.W., Turmaine, M., Cozens, B.A., DiFiglia, M., Sharp, A.H., Ross, C.A., Scherzinger, E., Wanker, E.E., Mangiarini, L. and Bates, G.P. (1997) Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. *Cell*, **90**, 537-548.
51. Seidel, K., den Dunnen, W.F., Schultz, C., Paulson, H., Frank, S., de Vos, R.A., Brunt, E.R., Deller, T., Kampinga, H.H. and Rüb, U. (2010) Axonal inclusions in spinocerebellar ataxia type 3. *Acta Neuropathol*, **120**, 449-460.
52. Evert, B.O., Schelhaas, J., Fleischer, H., de Vos, R.A., Brunt, E.R., Stenzel, W., Klockgether, T. and Wüllner, U. (2006) Neuronal intranuclear inclusions, dysregulation of cytokine expression and cell death in spinocerebellar ataxia type 3. *Clinical Neuropathology*, **25**, 272-281.
53. Radwan, M., Lilley, J.D., Ang, C.S., Reid, G.E. and Hatters, D.M. (2020) Immiscible inclusion bodies formed by polyglutamine and poly(glycine-alanine) are enriched with

- distinct proteomes but converge in proteins that are risk factors for disease and involved in protein degradation. *PLoS One*, **15**, e0233247.
54. Trojanowski, J.Q. and Lee, V.M. (2000) "Fatal attractions" of proteins. A comprehensive hypothetical mechanism underlying Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **924**, 62-67.
  55. Steffan, J.S., Kazantsev, A., Spasic-Boskovic, O., Greenwald, M., Zhu, Y.Z., Gohler, H., Wanker, E.E., Bates, G.P., Housman, D.E. and Thompson, L.M. (2000) The Huntington's disease protein interacts with p53 and CREB-binding protein and represses transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 6763-6768.
  56. Nucifora, F.C., Jr., Sasaki, M., Peters, M.F., Huang, H., Cooper, J.K., Yamada, M., Takahashi, H., Tsuji, S., Troncoso, J., Dawson, V.L. *et al.* (2001) Interference by huntingtin and atrophin-1 with cbp-mediated transcription leading to cellular toxicity. *Science*, **291**, 2423-2428.
  57. Cummings, C.J., Mancini, M.A., Antalfy, B., DeFranco, D.B., Orr, H.T. and Zoghbi, H.Y. (1998) Chaperone suppression of aggregation and altered subcellular proteasome localization imply protein misfolding in SCA1. *Nature Genetics*, **19**, 148-154.
  58. Bence, N.F., Sampat, R.M. and Kopito, R.R. (2001) Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation. *Science*, **292**, 1552-1555.
  59. Ross, C.A. and Poirier, M.A. (2005) Opinion: What is the role of protein aggregation in neurodegeneration? *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**, 891-898.
  60. Ordway, J.M., Tallaksen-Greene, S., Gutekunst, C.A., Bernstein, E.M., Cearley, J.A., Wiener, H.W., Dure, L.S.t., Lindsey, R., Hersch, S.M., Jope, R.S. *et al.* (1997) Ectopically expressed CAG repeats cause intranuclear inclusions and a progressive late onset neurological phenotype in the mouse. *Cell*, **91**, 753-763.
  61. 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.
  62. Li, T., Martins, S., Peng, Y., Wang, P., Hou, X., Chen, Z., Wang, C., Tang, Z., Qiu, R., Chen, C. *et al.* (2018) Is the High Frequency of Machado-Joseph Disease in China Due to New Mutational Origins? *Front Genet*, **9**, 740.
  63. Durr, A. (2010) Autosomal dominant cerebellar ataxias: polyglutamine expansions and beyond. *Lancet Neurol*, **9**, 885-894.
  64. 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.
  65. Bettencourt, C. and Lima, M. (2011) Machado-Joseph Disease: from first descriptions to new perspectives. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, **6**, 35.

66. Nakano, K.K., Dawson, D.M. and Spence, A. (1972) Machado disease. A hereditary ataxia in Portuguese emigrants to Massachusetts. *Neurology*, **22**, 49-55.
67. 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.
68. Lima, L. and Coutinho, P. (1980) Clinical criteria for diagnosis of Machado-Joseph disease: report of a non-Azorena Portuguese family. *Neurology*, **30**, 319-322.
69. Sequeiros, J. and Coutinho, P. (1993) Epidemiology and clinical aspects of Machado-Joseph disease. *Advances in Neurology*, **61**, 139-153.
70. Rosenberg, R.N. (1992) Machado-Joseph disease: an autosomal dominant motor system degeneration. *Mov Disord*, **7**, 193-203.
71. Tamura, I., Takei, A., Hamada, S., Soma, H., Nonaka, M., Homma, S. and Moriwaka, F. (2018) Executive dysfunction in patients with spinocerebellar ataxia type 3. *Journal of Neurology*, **265**, 1563-1572.
72. Roeske, S., Filla, I., Heim, S., Amunts, K., Helmstaedter, C., Wüllner, U., Wagner, M., Klockgether, T. and Minnerop, M. (2013) Progressive cognitive dysfunction in spinocerebellar ataxia type 3. *Mov Disord*, **28**, 1435-1438.
73. Lo, R.Y., Figueroa, K.P., Pulst, S.M., Perlman, S., Wilmot, G., Gomez, C., Schmahmann, J., Paulson, H., Shakkottai, V.G., Ying, S. *et al.* (2016) Depression and clinical progression in spinocerebellar ataxias. *Parkinsonism & Related Disorders*, **22**, 87-92.
74. Rüb, U., Schöls, L., Paulson, H., Auburger, G., Kermer, P., Jen, J.C., Seidel, K., Korf, H.W. and Deller, T. (2013) Clinical features, neurogenetics and neuropathology of the polyglutamine spinocerebellar ataxias type 1, 2, 3, 6 and 7. *Prog Neurobiol*, **104**, 38-66.
75. Dürr, A., Stevanin, G., Cancel, G., Duyckaerts, C., Abbas, N., Didierjean, O., Chneiweiss, H., Benomar, A., Lyon-Caen, O., Julien, J. *et al.* (1996) Spinocerebellar ataxia 3 and Machado-Joseph disease: clinical, molecular, and neuropathological features. *Ann Neurol*, **39**, 490-499.
76. Rüb, U., Brunt, E.R., de Vos, R.A., Del Turco, D., Del Tredici, K., Gierga, K., Schultz, C., Ghebremedhin, E., Bürk, K., Auburger, G. *et al.* (2004) Degeneration of the central vestibular system in spinocerebellar ataxia type 3 (SCA3) patients and its possible clinical significance. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, **30**, 402-414.
77. 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.
78. 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.

79. 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.
80. 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.
81. Yamada, M., Hayashi, S., Tsuji, S. and Takahashi, H. (2001) Involvement of the cerebral cortex and autonomic ganglia in Machado-Joseph disease. *Acta Neuropathol*, **101**, 140-144.
82. 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.
83. 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.
84. 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.
85. Wan, N., Chen, Z., Wan, L., Tang, B. and Jiang, H. (2020) MR Imaging of SCA3/MJD. *Front Neurosci*, **14**, 749.
86. Lopes, T.M., D'Abreu, A., França, M.C., Jr., Yasuda, C.L., Betting, L.E., Samara, A.B., Castellano, G., Somazzi, J.C., Balthazar, M.L., Lopes-Cendes, I. *et al.* (2013) Widespread neuronal damage and cognitive dysfunction in spinocerebellar ataxia type 3. *Journal of Neurology*, **260**, 2370-2379.
87. Adanyeguh, I.M., Henry, P.G., Nguyen, T.M., Rinaldi, D., Jauffret, C., Valabregue, R., Emir, U.E., Deelchand, D.K., Brice, A., Eberly, L.E. *et al.* (2015) In vivo neurometabolic profiling in patients with spinocerebellar ataxia types 1, 2, 3, and 7. *Mov Disord*, **30**, 662-670.
88. Klockgether, T., Schöls, L., Abele, M., Bürk, K., Topka, H., Andres, F., Amoiridis, G., Lüdtke, 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.
89. 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. *Arch Neurol*, **61**, 257-261.
90. 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.

91. C. França M, J., D'Abreu, A., Nucci, A., Cendes, F. and Lopes-Cendes, I. (2009) Prospective study of peripheral neuropathy in Machado-Joseph disease. *Muscle & Nerve*, **40**, 1012-1018.
92. Suite, N.D., Sequeiros, J. and McKhann, G.M. (1986) Machado-Joseph disease in a Sicilian-American family. *Journal of Neurogenetics*, **3**, 177-182.
93. Diallo, A., Jacobi, H., Cook, A., Labrum, R., Durr, A., Brice, A., Charles, P., Marelli, C., Mariotti, C., Nanetti, L. *et al.* (2018) Survival in patients with spinocerebellar ataxia types 1, 2, 3, and 6 (EUROSCA): a longitudinal cohort study. *Lancet Neurol*, **17**, 327-334.
94. Kieling, C., Prestes, P.R., Saraiva-Pereira, M.L. and Jardim, L.B. (2007) Survival estimates for patients with Machado-Joseph disease (SCA3). *Clinical Genetics*, **72**, 543-545.
95. Carvalho, D.R., La Roque-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.
96. Mitchell, N., LaTouche, G.A., Nelson, B., Figueroa, K.P., Walker, R.H. and Sobering, A.K. (2019) Childhood-Onset Spinocerebellar Ataxia 3: Tongue Dystonia as an Early Manifestation. *Tremor and Other Hyperkinetic Movements (New York, N.Y.)*, **9**.
97. Zhou, Y.X., Takiyama, Y., Igarashi, S., Li, Y.F., Zhou, B.Y., Gui, D.C., Endo, K., Tanaka, H., Chen, Z.H., Zhou, L.S. *et al.* (1997) Machado-Joseph disease in four Chinese pedigrees: molecular analysis of 15 patients including two juvenile cases and clinical correlations. *Neurology*, **48**, 482-485.
98. Globas, C., du Montcel, S.T., Baliko, L., Boesch, S., Depondt, C., DiDonato, S., Durr, A., Filla, A., Klockgether, T., Mariotti, C. *et al.* (2008) Early symptoms in spinocerebellar ataxia type 1, 2, 3, and 6. *Mov Disord*, **23**, 2232-2238.
99. van de Warrenburg, B.P., Hendriks, H., Dürr, A., van Zuijlen, M.C., Stevanin, G., Camuzat, A., Sinke, R.J., Brice, A. and Kremer, B.P. (2005) Age at onset variance analysis in spinocerebellar ataxias: a study in a Dutch-French cohort. *Ann Neurol*, **57**, 505-512.
100. Ding, D., Wang, C., Chen, Z., Peng, H., Li, K., Zhou, X., Peng, Y., Wang, P., Hou, X., Li, T. *et al.* (2019) Polymorphisms in DNA methylation-related genes are linked to the phenotype of Machado-Joseph disease. *Neurobiology of Aging*, **75**, 225.e221-225.e228.
101. Wang, C., Peng, H., Li, J., Ding, D., Chen, Z., Long, Z., Peng, Y., Zhou, X., Ye, W., Li, K. *et al.* (2017) Alteration of methylation status in the ATXN3 gene promoter region is linked to the SCA3/MJD. *Neurobiology of Aging*, **53**, 192.e195-192.e110.
102. Ding, D., Wang, C., Chen, Z., Xia, K., Tang, B., Qiu, R. and Jiang, H. (2020) Polyglutamine-expanded ataxin3 alter specific gene expressions through changing DNA methylation status in SCA3/MJD. *Aging (Albany NY)*, **13**, 3680-3698.

103. Zhao, H., Yang, L., Dong, Y. and Wu, Z.Y. (2020) Phenotypic variance in monozygotic twins with SCA3. *Molecular Genetics & Genomic Medicine*, **8**, e1438.
104. 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. *Prog Neurobiol*, **132**, 34-58.
105. Costa Mdo, C. and Paulson, H.L. (2012) Toward understanding Machado-Joseph disease. *Prog Neurobiol*, **97**, 239-257.
106. Ashizawa, T., Öz, G. and Paulson, H.L. (2018) Spinocerebellar ataxias: prospects and challenges for therapy development. *Nature Reviews. Neurology*, **14**, 590-605.
107. 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.
108. 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.
109. Matos, C., Pereira de Almeida, L. and Nobrega, C. (2018) Machado-Joseph disease / Spinocerebellar ataxia type 3: lessons from disease pathogenesis and clues into therapy. *J Neurochem*.
110. 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. *Hum Mol Genet*, **15**, 555-568.
111. Schmitt, I., Linden, M., Khazneh, H., Evert, B.O., Breuer, P., Klockgether, T. and Wuellner, U. (2007) Inactivation of the mouse *Atxn3* (ataxin-3) gene increases protein ubiquitination. *Biochem Biophys Res Commun*, **362**, 734-739.
112. 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.
113. Ramani, B., Panwar, B., Moore, L.R., Wang, B., Huang, R., Guan, Y. and Paulson, H.L. (2017) Comparison of spinocerebellar ataxia type 3 mouse models identifies early gain-of-function, cell-autonomous transcriptional changes in oligodendrocytes. *Hum Mol Genet*, **26**, 3362-3374.
114. Tsou, W.L., Ouyang, M., Hosking, R.R., Sutton, J.R., Blount, J.R., Burr, A.A. and Todi, S.V. (2015) The deubiquitinase ataxin-3 requires Rad23 and DnaJ-1 for its neuroprotective role in *Drosophila melanogaster*. *Neurobiol Dis*, **82**, 12-21.

115. 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. *Mol Cell*, **18**, 37-48.
116. Herzog, L.K., Kevei, É., Marchante, R., Böttcher, C., Bindesbøll, C., Lystad, A.H., Pfeiffer, A., Gierisch, M.E., Salomons, F.A., Simonsen, A. *et al.* (2020) The Machado-Joseph disease deubiquitylase ataxin-3 interacts with LC3C/GABARAP and promotes autophagy. *Aging Cell*, **19**, e13051.
117. Niewiadomska-Cimicka, A., Hache, A. and Trottier, Y. (2020) Gene Deregulation and Underlying Mechanisms in Spinocerebellar Ataxias With Polyglutamine Expansion. *Front Neurosci*, **14**, 571.
118. Sittler, A., Muriel, M.P., Marinello, M., Brice, A., den Dunnen, W. and Alves, S. (2018) Deregulation of autophagy in postmortem brains of Machado-Joseph disease patients. *Neuropathology*, **38**, 113-124.
119. Zeng, L., Zhang, D., McLoughlin, H.S., Zalon, A.J., Aravind, L. and Paulson, H.L. (2018) Loss of the Spinocerebellar Ataxia type 3 disease protein ATXN3 alters transcription of multiple signal transduction pathways. *PLoS One*, **13**, e0204438.
120. Bettencourt, C., Santos, C., Montiel, R., Costa Mdo, C., Cruz-Morales, P., Santos, L.R., Simões, 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.
121. 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.
122. 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.
123. Burnett, B.G. and Pittman, R.N. (2005) The polyglutamine neurodegenerative protein ataxin 3 regulates aggresome formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 4330-4335.
124. Durcan, T.M., Kontogiannia, M., Thorarinsdottir, T., Fallon, L., Williams, A.J., Djarmati, A., Fantaneanu, T., Paulson, H.L. and Fon, E.A. (2011) The Machado-Joseph disease-associated mutant form of ataxin-3 regulates parkin ubiquitination and stability. *Hum Mol Genet*, **20**, 141-154.
125. Scaglione, K.M., Zavodszky, E., Todi, S.V., Patury, S., Xu, P., Rodríguez-Lebrón, E., Fischer, S., Konen, J., Djarmati, A., Peng, J. *et al.* (2011) Ube2w and ataxin-3 coordinately regulate the ubiquitin ligase CHIP. *Mol Cell*, **43**, 599-612.
126. 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.



127. Evert, B.O., Araujo, J., Vieira-Saecker, A.M., de Vos, R.A., Harendza, S., Klockgether, T. and Wüllner, U. (2006) Ataxin-3 represses transcription via chromatin binding, interaction with histone deacetylase 3, and histone deacetylation. *J Neurosci*, **26**, 11474-11486.
128. Pfeiffer, A., Luijsterburg, M.S., Acs, K., Wiegant, W.W., Helfricht, A., Herzog, L.K., Minoia, M., Böttcher, C., Salomons, F.A., van Attikum, H. *et al.* (2017) Ataxin-3 consolidates the MDC1-dependent DNA double-strand break response by counteracting the SUMO-targeted ubiquitin ligase RNF4. *Embo J*, **36**, 1066-1083.
129. Wang, H., Ying, Z. and Wang, G. (2012) Ataxin-3 regulates aggresome formation of copper-zinc superoxide dismutase (SOD1) by editing K63-linked polyubiquitin chains. *J Biol Chem*, **287**, 28576-28585.
130. do Carmo Costa, M., Bajanca, F., Rodrigues, A.J., Tomé, 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.
131. 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. *Biochim Biophys Acta*, **1803**, 1154-1163.
132. 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. *Ann Neurol*, **41**, 453-462.
133. Antony, P.M., Mäntele, S., Mollenkopf, P., Boy, J., Kehlenbach, R.H., Riess, O. and Schmidt, T. (2009) Identification and functional dissection of localization signals within ataxin-3. *Neurobiol Dis*, **36**, 280-292.
134. Reina, C.P., Zhong, X. and Pittman, R.N. (2010) Proteotoxic stress increases nuclear localization of ataxin-3. *Hum Mol Genet*, **19**, 235-249.
135. Bichelmeier, U., Schmidt, T., Hübener, J., Boy, J., Rüttiger, L., Häbig, K., Poths, S., Bonin, M., Knipper, M., Schmidt, W.J. *et al.* (2007) Nuclear localization of ataxin-3 is required for the manifestation of symptoms in SCA3: in vivo evidence. *J Neurosci*, **27**, 7418-7428.
136. 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.
137. 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. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 10493-10498.

138. 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.
139. 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. *Embo J*, **28**, 372-382.
140. 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.
141. Reyes-Turcu, F.E., Ventii, K.H. and Wilkinson, K.D. (2009) Regulation and cellular roles of ubiquitin-specific deubiquitinating enzymes. *Annu Rev Biochem*, **78**, 363-397.
142. Song, A.X., Zhou, C.J., Peng, Y., Gao, X.C., Zhou, Z.R., Fu, Q.S., Hong, J., Lin, D.H. and Hu, H.Y. (2010) Structural transformation of the tandem ubiquitin-interacting motifs in ataxin-3 and their cooperative interactions with ubiquitin chains. *PLoS One*, **5**, e13202.
143. Matos, C.A., de Almeida, L.P. and Nóbrega, C. (2019) Machado-Joseph disease/spinocerebellar ataxia type 3: lessons from disease pathogenesis and clues into therapy. *J Neurochem*, **148**, 8-28.
144. Maciel, P., Gaspar, C., DeStefano, A.L., Silveira, I., Coutinho, P., Radvany, J., Dawson, D.M., Sudarsky, L., Guimarães, 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.
145. Cokol, M., Nair, R. and Rost, B. (2000) Finding nuclear localization signals. *EMBO Reports*, **1**, 411-415.
146. Baker, R.T. and Board, P.G. (1987) The human ubiquitin gene family: structure of a gene and pseudogenes from the Ub B subfamily. *Nucleic Acids Res*, **15**, 443-463.
147. Ozkaynak, E., Finley, D., Solomon, M.J. and Varshavsky, A. (1987) The yeast ubiquitin genes: a family of natural gene fusions. *Embo J*, **6**, 1429-1439.
148. Wiborg, O., Pedersen, M.S., Wind, A., Berglund, L.E., Marcker, K.A. and Vuust, J. (1985) The human ubiquitin multigene family: some genes contain multiple directly repeated ubiquitin coding sequences. *Embo J*, **4**, 755-759.
149. Pickart, C.M. and Rose, I.A. (1985) Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase acts on ubiquitin carboxyl-terminal amides. *J Biol Chem*, **260**, 7903-7910.
150. Nijman, S.M., Luna-Vargas, M.P., Velds, A., Brummelkamp, T.R., Dirac, A.M., Sixma, T.K. and Bernards, R. (2005) A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. *Cell*, **123**, 773-786.
151. Amerik, A.Y. and Hochstrasser, M. (2004) Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. *Biochim Biophys Acta*, **1695**, 189-207.

152. Ashkenazi, A., Bento, C.F., Ricketts, T., Vicinanza, M., Siddiqi, F., Pavel, M., Squitieri, F., Hardenberg, M.C., Imarisio, S., Menzies, F.M. *et al.* (2017) Polyglutamine tracts regulate beclin 1-dependent autophagy. *Nature*, **545**, 108-111.
153. Paulson, H.L., Shakkottai, V.G., Clark, H.B. and Orr, H.T. (2017) Polyglutamine spinocerebellar ataxias - from genes to potential treatments. *Nature Reviews. Neuroscience*, **18**, 613-626.
154. Klockgether, T., Mariotti, C. and Paulson, H.L. (2019) Spinocerebellar ataxia. *Nature Reviews. Disease Primers*, **5**, 24.
155. Wentink, A., Nussbaum-Krammer, C. and Bukau, B. (2019) Modulation of Amyloid States by Molecular Chaperones. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, **11**.
156. Nalepa, G., Rolfe, M. and Harper, J.W. (2006) Drug discovery in the ubiquitin-proteasome system. *Nat Rev Drug Discov*, **5**, 596-613.
157. 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.
158. Burnett, B., Li, F. and Pittman, R.N. (2003) The polyglutamine neurodegenerative protein ataxin-3 binds polyubiquitylated proteins and has ubiquitin protease activity. *Hum Mol Genet*, **12**, 3195-3205.
159. 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. *Mol Cell Biol*, **23**, 6469-6483.
160. 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.
161. 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.
162. Meusser, B., Hirsch, C., Jarosch, E. and Sommer, T. (2005) ERAD: the long road to destruction. *Nature Cell Biology*, **7**, 766-772.
163. Boeddrich, A., Gaumer, S., Haacke, A., Tzvetkov, N., Albrecht, M., Evert, B.O., Muller, E.C., Lurz, R., Breuer, P., Schugaradt, 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.
164. Zhong, X. and Pittman, R.N. (2006) Ataxin-3 binds VCP/p97 and regulates retrotranslocation of ERAD substrates. *Hum Mol Genet*, **15**, 2409-2420.

165. Ferro, A., Carvalho, A.L., Teixeira-Castro, A., Almeida, C., Tomé, R.J., Cortes, L., Rodrigues, A.J., Logarinho, E., Sequeiros, J., Macedo-Ribeiro, S. *et al.* (2007) NEDD8: a new ataxin-3 interactor. *Biochim Biophys Acta*, **1773**, 1619-1627.
166. Markossian, K.A. and Kurganov, B.I. (2004) Protein folding, misfolding, and aggregation. Formation of inclusion bodies and aggresomes. *Biochemistry. Biokhimiia*, **69**, 971-984.
167. Corboy, M.J., Thomas, P.J. and Wigley, W.C. (2005) Aggresome formation. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, **301**, 305-327.
168. Bonanomi, M., Mazzucchelli, S., D'Urzo, A., Nardini, M., Konarev, P.V., Invernizzi, G., Svergun, D.I., Vanoni, M., Regonesi, M.E. and Tortora, P. (2014) Interactions of ataxin-3 with its molecular partners in the protein machinery that sorts protein aggregates to the aggresome. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **51**, 58-64.
169. Mazzucchelli, S., De Palma, A., Riva, M., D'Urzo, A., Pozzi, C., Pastori, V., Comelli, F., Fusi, P., Vanoni, M., Tortora, P. *et al.* (2009) Proteomic and biochemical analyses unveil tight interaction of ataxin-3 with tubulin. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **41**, 2485-2492.
170. Zhou, L., Wang, H., Chen, D., Gao, F., Ying, Z. and Wang, G. (2014) p62/sequestosome 1 regulates aggresome formation of pathogenic ataxin-3 with expanded polyglutamine. *Int J Mol Sci*, **15**, 14997-15010.
171. 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. *Mol Neurobiol*, **49**, 1513-1531.
172. Evert, B.O., Vogt, I.R., Vieira-Saecker, A.M., Ozimek, L., de Vos, R.A., Brunt, E.R., Klockgether, T. and Wüllner, U. (2003) Gene expression profiling in ataxin-3 expressing cell lines reveals distinct effects of normal and mutant ataxin-3. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, **62**, 1006-1018.
173. 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.
174. Li, F., Macfarlan, T., Pittman, R.N. and Chakravarti, D. (2002) Ataxin-3 is a histone-binding protein with two independent transcriptional corepressor activities. *J Biol Chem*, **277**, 45004-45012.
175. Chai, Y., Wu, L., Griffin, J.D. and Paulson, H.L. (2001) The role of protein composition in specifying nuclear inclusion formation in polyglutamine disease. *J Biol Chem*, **276**, 44889-44897.
176. Chou, A.H., Chen, Y.L., Hu, S.H., Chang, Y.M. and Wang, H.L. (2014) Polyglutamine-expanded ataxin-3 impairs long-term depression in Purkinje neurons of SCA3 transgenic mouse by inhibiting HAT and impairing histone acetylation. *Brain Res*, **1583**, 220-229.

177. Jung, J. and Bonini, N. (2007) CREB-binding protein modulates repeat instability in a *Drosophila* model for polyQ disease. *Science*, **315**, 1857-1859.
178. Chou, A.H., Yeh, T.H., Ouyang, P., Chen, Y.L., Chen, S.Y. and Wang, H.L. (2008) Polyglutamine-expanded ataxin-3 causes cerebellar dysfunction of SCA3 transgenic mice by inducing transcriptional dysregulation. *Neurobiol Dis*, **31**, 89-101.
179. McCampbell, A., Taylor, J.P., Taye, A.A., Robitschek, J., Li, M., Walcott, J., Merry, D., Chai, Y., Paulson, H., Sobue, G. *et al.* (2000) CREB-binding protein sequestration by expanded polyglutamine. *Hum Mol Genet*, **9**, 2197-2202.
180. 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 Genet*, **11**, e1004749.
181. 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 Genet*, **11**, e1004834.
182. 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.
183. 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.
184. 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.
185. Liu, H., Li, X., Ning, G., Zhu, S., Ma, X., Liu, X., Liu, C., Huang, M., Schmitt, I., Wüllner, U. *et al.* (2016) The Machado-Joseph Disease Deubiquitinase Ataxin-3 Regulates the Stability and Apoptotic Function of p53. *PLoS Biol*, **14**, e2000733.
186. McMurray, C.T. (2000) Neurodegeneration: diseases of the cytoskeleton? *Cell Death and Differentiation*, **7**, 861-865.
187. Gunawardena, S. and Goldstein, L.S. (2005) Polyglutamine diseases and transport problems: deadly traffic jams on neuronal highways. *Arch Neurol*, **62**, 46-51.
188. Kounakis, K. and Tavernarakis, N. (2019) The Cytoskeleton as a Modulator of Aging and Neurodegeneration. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **1178**, 227-245.
189. Ogawa, M. (2004) Pharmacological treatments of cerebellar ataxia. *Cerebellum*, **3**, 107-111.

190. Correia, M., Coutinho, P., Silva, M.C., Guimaraes, J., Amado, J. and Matos, E. (1995) Evaluation of the effect of sulphamethoxazole and trimethoprim in patients with Machado-Joseph disease. *Revista de Neurologia*, **23**, 632-634.
191. 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.
192. 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.
193. 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.
194. 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.
195. Friedman, J.H. (1997) Machado-Joseph disease/spinocerebellar ataxia 3 responsive to buspirone. *Mov Disord*, **12**, 613-614.
196. Takei, A., Honma, S., Kawashima, A., Yabe, I., Fukazawa, T., Hamada, K., Hamada, T. and Tashiro, K. (2002) Beneficial effects of tandospirone on ataxia of a patient with Machado-Joseph disease. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, **56**, 181-185.
197. Chen, Y.S., Hong, Z.X., Lin, S.Z. and Harn, H.J. (2020) Identifying Therapeutic Targets for Spinocerebellar Ataxia Type 3/Machado-Joseph Disease through Integration of Pathological Biomarkers and Therapeutic Strategies. *Int J Mol Sci*, **21**.
198. Pereira-Sousa, J., Ferreira-Lomba, B., Bellver-Sanchis, A., Vilasboas-Campos, D., Fernandes, J.H., Costa, M.D., Varney, M.A., Newman-Tancredi, A., Maciel, P. and Teixeira-Castro, A. (2021) Identification of the 5-HT(1A) serotonin receptor as a novel therapeutic target in a *C. elegans* model of Machado-Joseph disease. *Neurobiol Dis*, **152**, 105278.
199. Wang, Z. (2018) Experimental and Clinical Strategies for Treating Spinocerebellar Ataxia Type 3. *Neuroscience*, **371**, 138-154.
200. 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.
201. Gaspar, C., Jannatipour, M., Dion, P., Laganière, J., Sequeiros, J., Brais, B. and Rouleau, G.A. (2000) CAG tract of MJD-1 may be prone to frameshifts causing polyalanine accumulation. *Hum Mol Genet*, **9**, 1957-1966.
202. Stochmanski, S.J., Therrien, M., Laganière, 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. *Hum Mol Genet*, **21**, 2211-2218.
203. Moseley, M.L., Zu, T., Ikeda, Y., Gao, W., Mosemiller, A.K., Daughters, R.S., Chen, G., Weatherspoon, M.R., Clark, H.B., Ebner, T.J. *et al.* (2006) Bidirectional expression of CUG and CAG expansion transcripts and intranuclear polyglutamine inclusions in spinocerebellar ataxia type 8. *Nature Genetics*, **38**, 758-769.
204. Zu, T., Gibbens, B., Doty, N.S., Gomes-Pereira, M., Huguet, A., Stone, M.D., Margolis, J., Peterson, M., Markowski, T.W., Ingram, M.A. *et al.* (2011) Non-ATG-initiated translation directed by microsatellite expansions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **108**, 260-265.
205. Moore, L.R., Rajpal, G., Dillingham, I.T., Qutob, M., Blumenstein, K.G., Gattis, D., Hung, G., Kordasiewicz, H.B., Paulson, H.L. and McLoughlin, H.S. (2017) Evaluation of Antisense Oligonucleotides Targeting ATXN3 in SCA3 Mouse Models. *Molecular Therapy. Nucleic acids*, **7**, 200-210.
206. McLoughlin, H.S., Moore, L.R., Chopra, R., Komlo, R., McKenzie, M., Blumenstein, K.G., Zhao, H., Kordasiewicz, H.B., Shakkottai, V.G. and Paulson, H.L. (2018) Oligonucleotide therapy mitigates disease in spinocerebellar ataxia type 3 mice. *Ann Neurol*, **84**, 64-77.
207. Costa Mdo, C., Luna-Cancelon, K., Fischer, S., Ashraf, N.S., Ouyang, M., Dharia, R.M., Martin-Fishman, L., Yang, Y., Shakkottai, V.G., Davidson, B.L. *et al.* (2013) Toward RNAi therapy for the polyglutamine disease Machado-Joseph disease. *Mol Ther*, **21**, 1898-1908.
208. Rodríguez-Lebrón, E., Costa Mdo, C., Luna-Cancelon, K., Peron, T.M., Fischer, S., Boudreau, R.L., Davidson, B.L. and Paulson, H.L. (2013) Silencing mutant ATXN3 expression resolves molecular phenotypes in SCA3 transgenic mice. *Mol Ther*, **21**, 1909-1918.
209. 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 Déglon, N. (2008) Allele-specific RNA silencing of mutant ataxin-3 mediates neuroprotection in a rat model of Machado-Joseph disease. *PLoS One*, **3**, e3341.
210. Alves, S., Nascimento-Ferreira, I., Dufour, N., Hassig, R., Auregan, G., Nóbrega, C., Brouillet, E., Hantraye, P., Pedroso de Lima, M.C., Déglon, N. *et al.* (2010) Silencing ataxin-3 mitigates degeneration in a rat model of Machado-Joseph disease: no role for wild-type ataxin-3? *Hum Mol Genet*, **19**, 2380-2394.
211. Toonen, L.J., Schmidt, I., Luijsterburg, M.S., van Attikum, H. and van Roon-Mom, W.M. (2016) Antisense oligonucleotide-mediated exon skipping as a strategy to reduce proteolytic cleavage of ataxin-3. *Sci Rep*, **6**, 35200.

212. Toonen, L.J.A., Rigo, F., van Attikum, H. and van Roon-Mom, W.M.C. (2017) Antisense Oligonucleotide-Mediated Removal of the Polyglutamine Repeat in Spinocerebellar Ataxia Type 3 Mice. *Molecular Therapy. Nucleic Acids*, **8**, 232-242.
213. Nóbrega, C., Nascimento-Ferreira, I., Onofre, I., Albuquerque, D., Hirai, H., Déglon, N. and de Almeida, L.P. (2013) Silencing mutant ataxin-3 rescues motor deficits and neuropathology in Machado-Joseph disease transgenic mice. *PLoS One*, **8**, e52396.
214. Nóbrega, C., Codêso, J.M., Mendonça, L. and Pereira de Almeida, L. (2019) RNA Interference Therapy for Machado-Joseph Disease: Long-Term Safety Profile of Lentiviral Vectors Encoding Short Hairpin RNAs Targeting Mutant Ataxin-3. *Human Gene Therapy*, **30**, 841-854.
215. Conceição, M., Mendonça, L., Nóbrega, C., Gomes, C., Costa, P., Hirai, H., Moreira, J.N., Lima, M.C., Manjunath, N. and Pereira de Almeida, L. (2016) Intravenous administration of brain-targeted stable nucleic acid lipid particles alleviates Machado-Joseph disease neurological phenotype. *Biomaterials*, **82**, 124-137.
216. Buijsen, R.A.M., Toonen, L.J.A., Gardiner, S.L. and van Roon-Mom, W.M.C. (2019) Genetics, Mechanisms, and Therapeutic Progress in Polyglutamine Spinocerebellar Ataxias. *Neurotherapeutics*, **16**, 263-286.
217. Moore, L.R., Keller, L., Bushart, D.D., Delatorre, R.G., Li, D., McLoughlin, H.S., do Carmo Costa, M., Shakkottai, V.G., Smith, G.D. and Paulson, H.L. (2019) Antisense oligonucleotide therapy rescues aggregates formation in a novel spinocerebellar ataxia type 3 human embryonic stem cell line. *Stem Cell Research*, **39**, 101504.
218. Alves, S., Régulier, E., Nascimento-Ferreira, I., Hassig, R., Dufour, N., Koeppen, A., Carvalho, A.L., Simões, S., de Lima, M.C., Brouillet, E. *et al.* (2008) Striatal and nigral pathology in a lentiviral rat model of Machado-Joseph disease. *Hum Mol Genet*, **17**, 2071-2083.
219. Nóbrega, C., Nascimento-Ferreira, I., Onofre, I., Albuquerque, D., Déglon, N. and de Almeida, L.P. (2014) RNA interference mitigates motor and neuropathological deficits in a cerebellar mouse model of Machado-Joseph disease. *PLoS One*, **9**, e100086.
220. Shi, Y., Huang, F., Tang, B., Li, J., Wang, J., Shen, L., Xia, K. and Jiang, H. (2014) MicroRNA profiling in the serums of SCA3/MJD patients. *The International Journal of Neuroscience*, **124**, 97-101.
221. Huang, F., Zhang, L., Long, Z., Chen, Z., Hou, X., Wang, C., Peng, H., Wang, J., Li, J., Duan, R. *et al.* (2014) miR-25 alleviates polyQ-mediated cytotoxicity by silencing ATXN3. *FEBS Letters*, **588**, 4791-4798.
222. Carmona, V., Cunha-Santos, J., Onofre, I., Simões, A.T., Vijayakumar, U., Davidson, B.L. and Pereira de Almeida, L. (2017) Unravelling Endogenous MicroRNA System Dysfunction as a New Pathophysiological Mechanism in Machado-Joseph Disease. *Mol Ther*, **25**, 1038-1055.



223. Hou, X., Gong, X., Zhang, L., Li, T., Yuan, H., Xie, Y., Peng, Y., Qiu, R., Xia, K., Tang, B. *et al.* (2019) Identification of a potential exosomal biomarker in spinocerebellar ataxia Type 3/Machado-Joseph disease. *Epigenomics*, **11**, 1037-1056.
224. Bonneau, E., Neveu, B., Kostantin, E., Tsongalis, G.J. and De Guire, V. (2019) How close are miRNAs from clinical practice? A perspective on the diagnostic and therapeutic market. *Ejifcc*, **30**, 114-127.
225. Miller, C.M. and Harris, E.N. (2016) Antisense Oligonucleotides: Treatment Strategies and Cellular Internalization. *RNA & Disease (Houston, Tex.)*, **3**.
226. Cerritelli, S.M. and Crouch, R.J. (2009) Ribonuclease H: the enzymes in eukaryotes. *The FEBS Journal*, **276**, 1494-1505.
227. Wurster, C.D. and Ludolph, A.C. (2018) Antisense oligonucleotides in neurological disorders. *Ther Adv Neurol Disord*, **11**, 1756286418776932.
228. Bennett, C.F., Krainer, A.R. and Cleveland, D.W. (2019) Antisense Oligonucleotide Therapies for Neurodegenerative Diseases. *Annual Review of Neuroscience*, **42**, 385-406.
229. Finkel, R.S., Chiriboga, C.A., Vajsar, J., Day, J.W., Montes, J., De Vivo, D.C., Yamashita, M., Rigo, F., Hung, G., Schneider, E. *et al.* (2016) Treatment of infantile-onset spinal muscular atrophy with nusinersen: a phase 2, open-label, dose-escalation study. *Lancet*, **388**, 3017-3026.
230. Finkel, R.S., Mercuri, E., Darras, B.T., Connolly, A.M., Kuntz, N.L., Kirschner, J., Chiriboga, C.A., Saito, K., Servais, L., Tizzano, E. *et al.* (2017) Nusinersen versus Sham Control in Infantile-Onset Spinal Muscular Atrophy. *The New England Journal of Medicine*, **377**, 1723-1732.
231. Tabrizi, S.J., Leavitt, B.R., Landwehrmeyer, G.B., Wild, E.J., Saft, C., Barker, R.A., Blair, N.F., Craufurd, D., Priller, J., Rickards, H. *et al.* (2019) Targeting Huntingtin Expression in Patients with Huntington's Disease. *The New England Journal of Medicine*, **380**, 2307-2316.
232. Lane, R.M., Smith, A., Baumann, T., Gleichmann, M., Norris, D., Bennett, C.F. and Kordasiewicz, H. (2018) Translating Antisense Technology into a Treatment for Huntington's Disease. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, **1780**, 497-523.
233. Kordasiewicz, H.B., Stanek, L.M., Wancewicz, E.V., Mazur, C., McAlonis, M.M., Pytel, K.A., Artates, J.W., Weiss, A., Cheng, S.H., Shihabuddin, L.S. *et al.* (2012) Sustained therapeutic reversal of Huntington's disease by transient repression of huntingtin synthesis. *Neuron*, **74**, 1031-1044.
234. Kourkouta, E., Weij, R., González-Barriga, A., Mulder, M., Verheul, R., Bosgra, S., Groenendaal, B., Puoliväli, J., Toivanen, J., van Deutekom, J.C.T. *et al.* (2019) Suppression of Mutant Protein Expression in SCA3 and SCA1 Mice Using a CAG Repeat-Targeting Antisense Oligonucleotide. *Molecular Therapy. Nucleic Acids*, **17**, 601-614.

235. Matos, C.A., Almeida, L.P. and Nobrega, C. (2017) Proteolytic Cleavage of Polyglutamine Disease-Causing Proteins: Revisiting the Toxic Fragment Hypothesis. *Current Pharmaceutical Design*, **23**, 753-775.
236. Weber, J.J., Golla, M., Guitoli, G., Wanichawan, P., Hayer, S.N., Hauser, S., Krahl, A.C., Nagel, M., Samer, S., Aronica, E. *et al.* (2017) A combinatorial approach to identify calpain cleavage sites in the Machado-Joseph disease protein ataxin-3. *Brain*, **140**, 1280-1299.
237. Colomer Gould, V.F., Goti, D., Pearce, D., Gonzalez, G.A., Gao, H., Bermudez de Leon, M., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Ross, C.A. and Brown, D.R. (2007) A mutant ataxin-3 fragment results from processing at a site N-terminal to amino acid 190 in brain of Machado-Joseph disease-like transgenic mice. *Neurobiol Dis*, **27**, 362-369.
238. Goti, D., Katzen, S.M., Mez, J., Kurtis, N., Kiluk, J., Ben-Haïem, L., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Kakizuka, A., Sharp, A.H. *et al.* (2004) A mutant ataxin-3 putative-cleavage fragment in brains of Machado-Joseph disease patients and transgenic mice is cytotoxic above a critical concentration. *J Neurosci*, **24**, 10266-10279.
239. Simões, A.T., Gonçalves, N., Koeppen, A., Déglon, N., Kügler, S., Duarte, C.B. and Pereira de Almeida, L. (2012) Calpastatin-mediated inhibition of calpains in the mouse brain prevents mutant ataxin 3 proteolysis, nuclear localization and aggregation, relieving Machado-Joseph disease. *Brain*, **135**, 2428-2439.
240. Berke, S.J., Schmied, F.A., Brunt, E.R., Ellerby, L.M. and Paulson, H.L. (2004) Caspase-mediated proteolysis of the polyglutamine disease protein ataxin-3. *J Neurochem*, **89**, 908-918.
241. Hsu, J.Y., Jhang, Y.L., Cheng, P.H., Chang, Y.F., Mao, S.H., Yang, H.I., Lin, C.W., Chen, C.M. and Yang, S.H. (2017) The Truncated C-terminal Fragment of Mutant ATXN3 Disrupts Mitochondria Dynamics in Spinocerebellar Ataxia Type 3 Models. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, **10**, 196.
242. Haacke, A., Hartl, F.U. and Breuer, P. (2007) Calpain inhibition is sufficient to suppress aggregation of polyglutamine-expanded ataxin-3. *J Biol Chem*, **282**, 18851-18856.
243. Liman, J., Deeg, S., Voigt, A., Voßfeldt, H., Dohm, C.P., Karch, A., Weishaupt, J., Schulz, J.B., Bähr, M. and Kermer, P. (2014) CDK5 protects from caspase-induced Ataxin-3 cleavage and neurodegeneration. *J Neurochem*, **129**, 1013-1023.
244. Watchon, M., Yuan, K.C., Mackovski, N., Svahn, A.J., Cole, N.J., Goldsbury, C., Rinkwitz, S., Becker, T.S., Nicholson, G.A. and Laird, A.S. (2017) Calpain Inhibition Is Protective in Machado-Joseph Disease Zebrafish Due to Induction of Autophagy. *J Neurosci*, **37**, 7782-7794.
245. Hansen, S.K., Stummann, T.C., Borland, H., Hasholt, L.F., Tümer, Z., Nielsen, J.E., Rasmussen, M.A., Nielsen, T.T., Daechsel, J.C., Fog, K. *et al.* (2016) Induced pluripotent stem cell - derived neurons for the study of spinocerebellar ataxia type 3. *Stem cell Research*, **17**, 306-317.

246. Koch, P., Breuer, P., Peitz, M., Jungverdorben, J., Kesavan, J., Poppe, D., Doerr, J., Ladewig, J., Mertens, J., Tüting, T. *et al.* (2011) Excitation-induced ataxin-3 aggregation in neurons from patients with Machado-Joseph disease. *Nature*, **480**, 543-546.
247. Simões, A.T., Gonçalves, N., Nobre, R.J., Duarte, C.B. and Pereira de Almeida, L. (2014) Calpain inhibition reduces ataxin-3 cleavage alleviating neuropathology and motor impairments in mouse models of Machado-Joseph disease. *Hum Mol Genet*, **23**, 4932-4944.
248. Weber, J.J., Haas, E., Maringer, Y., Hauser, S., Casadei, N.L.P., Chishti, A.H., Riess, O. and Hübener-Schmid, J. (2020) Calpain-1 ablation partially rescues disease-associated hallmarks in models of Machado-Joseph disease. *Hum Mol Genet*, **29**, 892-906.
249. Shalini, S., Dorstyn, L., Dawar, S. and Kumar, S. (2015) Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death and Differentiation*, **22**, 526-539.
250. Sorimachi, H. and Ono, Y. (2012) Regulation and physiological roles of the calpain system in muscular disorders. *Cardiovascular Research*, **96**, 11-22.
251. Karve, T.M. and Cheema, A.K. (2011) Small changes huge impact: the role of protein posttranslational modifications in cellular homeostasis and disease. *Journal of Amino Acids*, **2011**, 207691.
252. Wan, L., Xu, K., Chen, Z., Tang, B. and Jiang, H. (2018) Roles of Post-translational Modifications in Spinocerebellar Ataxias. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, **12**, 290.
253. Matos, C.A., Nóbrega, C., Louros, S.R., Almeida, B., Ferreiro, E., Valero, J., Pereira de Almeida, L., Macedo-Ribeiro, S. and Carvalho, A.L. (2016) Ataxin-3 phosphorylation decreases neuronal defects in spinocerebellar ataxia type 3 models. *The Journal of Cell Biology*, **212**, 465-480.
254. Tao, R.S., Fei, E.K., Ying, Z., Wang, H.F. and Wang, G.H. (2008) Casein kinase 2 interacts with and phosphorylates ataxin-3. *Neuroscience Bulletin*, **24**, 271-277.
255. Mueller, T., Breuer, P., Schmitt, I., Walter, J., Evert, B.O. and Wüllner, U. (2009) CK2-dependent phosphorylation determines cellular localization and stability of ataxin-3. *Hum Mol Genet*, **18**, 3334-3343.
256. Fei, E., Jia, N., Zhang, T., Ma, X., Wang, H., Liu, C., Zhang, W., Ding, L., Nukina, N. and Wang, G. (2007) Phosphorylation of ataxin-3 by glycogen synthase kinase 3beta at serine 256 regulates the aggregation of ataxin-3. *Biochem Biophys Res Commun*, **357**, 487-492.
257. Almeida, B., Abreu, I.A., Matos, C.A., Fraga, J.S., Fernandes, S., Macedo, M.G., Gutiérrez-Gallego, R., Pereira, P.J., Carvalho, A.L. and Macedo-Ribeiro, S. (2015) SUMOylation of the brain-predominant Ataxin-3 isoform modulates its interaction with p97. *Biochim Biophys Acta*, **1852**, 1950-1959.

258. Zhou, Y.F., Liao, S.S., Luo, Y.Y., Tang, J.G., Wang, J.L., Lei, L.F., Chi, J.W., Du, J., Jiang, H., Xia, K. *et al.* (2013) SUMO-1 modification on K166 of polyQ-expanded ataxin-3 strengthens its stability and increases its cytotoxicity. *PLoS One*, **8**, e54214.
259. Chai, Y., Koppenhafer, S.L., Shoesmith, S.J., Perez, M.K. and Paulson, H.L. (1999) Evidence for proteasome involvement in polyglutamine disease: localization to nuclear inclusions in SCA3/MJD and suppression of polyglutamine aggregation in vitro. *Hum Mol Genet*, **8**, 673-682.
260. Seidel, K., Siswanto, S., Fredrich, M., Bouzrou, M., den Dunnen, W.F.A., Özerden, I., Korf, H.W., Melegh, B., de Vries, J.J., Brunt, E.R. *et al.* (2017) On the distribution of intranuclear and cytoplasmic aggregates in the brainstem of patients with spinocerebellar ataxia type 2 and 3. *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*, **27**, 345-355.
261. Park, H., Kang, J.H. and Lee, S. (2020) Autophagy in Neurodegenerative Diseases: A Hunter for Aggregates. *Int J Mol Sci*, **21**.
262. Da Silva, J.D., Teixeira-Castro, A. and Maciel, P. (2019) From Pathogenesis to Novel Therapeutics for Spinocerebellar Ataxia Type 3: Evading Potholes on the Way to Translation. *Neurotherapeutics*.
263. Djajadikerta, A., Keshri, S., Pavel, M., Prestil, R., Ryan, L. and Rubinsztein, D.C. (2019) Autophagy Induction as a Therapeutic Strategy for Neurodegenerative Diseases. *J Mol Biol*.
264. Cortes, C.J. and La Spada, A.R. (2015) Autophagy in polyglutamine disease: Imposing order on disorder or contributing to the chaos? *Molecular and Cellular Neurosciences*, **66**, 53-61.
265. Onofre, I., Mendonça, N., Lopes, S., Nobre, R., de Melo, J.B., Carreira, I.M., Januário, C., Gonçalves, A.F. and de Almeida, L.P. (2016) Fibroblasts of Machado Joseph Disease patients reveal autophagy impairment. *Sci Rep*, **6**, 28220.
266. Mori, F., Tanji, K., Odagiri, S., Toyoshima, Y., Yoshida, M., Kakita, A., Takahashi, H. and Wakabayashi, K. (2012) Autophagy-related proteins (p62, NBR1 and LC3) in intranuclear inclusions in neurodegenerative diseases. *Neuroscience Letters*, **522**, 134-138.
267. Nascimento-Ferreira, I., Santos-Ferreira, T., Sousa-Ferreira, L., Auregan, G., Onofre, I., Alves, S., Dufour, N., Colomer Gould, V.F., Koeppen, A., Déglon, N. *et al.* (2011) Overexpression of the autophagic beclin-1 protein clears mutant ataxin-3 and alleviates Machado-Joseph disease. *Brain*, **134**, 1400-1415.
268. Nascimento-Ferreira, I., Nóbrega, C., Vasconcelos-Ferreira, A., Onofre, I., Albuquerque, D., Avelaira, C., Hirai, H., Déglon, N. and Pereira de Almeida, L. (2013) Beclin 1 mitigates motor and neuropathological deficits in genetic mouse models of Machado-Joseph disease. *Brain*, **136**, 2173-2188.

269. Torashima, T., Koyama, C., Iizuka, A., Mitsumura, K., Takayama, K., Yanagi, S., Oue, M., Yamaguchi, H. and Hirai, H. (2008) Lentivector-mediated rescue from cerebellar ataxia in a mouse model of spinocerebellar ataxia. *EMBO Reports*, **9**, 393-399.
270. Nóbrega, C., Nascimento-Ferreira, I., Onofre, I., Albuquerque, D., Conceição, M., Déglon, N. and de Almeida, L.P. (2013) Overexpression of mutant ataxin-3 in mouse cerebellum induces ataxia and cerebellar neuropathology. *Cerebellum (London, England)*, **12**, 441-455.
271. Nobrega, C., Mendonca, L., Marcelo, A., Lamaziere, A., Tome, S., Despres, G., Matos, C.A., Mehmet, F., Langui, D., den Dunnen, W. *et al.* (2019) Restoring brain cholesterol turnover improves autophagy and has therapeutic potential in mouse models of spinocerebellar ataxia. *Acta Neuropathol*, **138**, 837-858.
272. Costa, M.D.C. (2020) Recent therapeutic prospects for Machado-Joseph disease. *Current Opinion in Neurology*, **33**, 519-526.
273. Ou, Z., Luo, M., Niu, X., Chen, Y., Xie, Y., He, W., Song, B., Xian, Y., Fan, D., OuYang, S. *et al.* (2016) Autophagy Promoted the Degradation of Mutant ATXN3 in Neurally Differentiated Spinocerebellar Ataxia-3 Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Biomed Res Int*, **2016**, 6701793.
274. Marcelo, A., Brito, F., Carmo-Silva, S., Matos, C.A., Alves-Cruzeiro, J., Vasconcelos-Ferreira, A., Koppenol, R., Mendonça, L., de Almeida, L.P. and Nóbrega, C. (2019) Cordycepin activates autophagy through AMPK phosphorylation to reduce abnormalities in Machado-Joseph disease models. *Hum Mol Genet*, **28**, 51-63.
275. Menzies, F.M., Huebener, J., Renna, M., Bonin, M., Riess, O. and Rubinsztein, D.C. (2010) Autophagy induction reduces mutant ataxin-3 levels and toxicity in a mouse model of spinocerebellar ataxia type 3. *Brain*, **133**, 93-104.
276. Zaltzman, R., Elyoseph, Z., Lev, N. and Gordon, C.R. (2020) Trehalose in Machado-Joseph Disease: Safety, Tolerability, and Efficacy. *Cerebellum (London, England)*, **19**, 672-679.
277. Santana, M.M., Paixão, S., Cunha-Santos, J., Silva, T.P., Trevino-Garcia, A., Gaspar, L.S., Nóbrega, C., Nobre, R.J., Cavadas, C., Greif, H. *et al.* (2020) Trehalose alleviates the phenotype of Machado-Joseph disease mouse models. *Journal of Translational Medicine*, **18**, 161.
278. Rusmini, P., Cortese, K., Crippa, V., Cristofani, R., Cicardi, M.E., Ferrari, V., Vezzoli, G., Tedesco, B., Meroni, M., Messi, E. *et al.* (2019) Trehalose induces autophagy via lysosomal-mediated TFEB activation in models of motoneuron degeneration. *Autophagy*, **15**, 631-651.
279. DeBosch, B.J., Heitmeier, M.R., Mayer, A.L., Higgins, C.B., Crowley, J.R., Kraft, T.E., Chi, M., Newberry, E.P., Chen, Z., Finck, B.N. *et al.* (2016) Trehalose inhibits solute carrier 2A (SLC2A) proteins to induce autophagy and prevent hepatic steatosis. *Science Signaling*, **9**, ra21.

280. Settembre, C. and Medina, D.L. (2015) TFEB and the CLEAR network. *Methods in Cell Biology*, **126**, 45-62.
281. Shin, H.J., Kim, H., Oh, S., Lee, J.G., Kee, M., Ko, H.J., Kweon, M.N., Won, K.J. and Baek, S.H. (2016) AMPK-SKP2-CARM1 signalling cascade in transcriptional regulation of autophagy. *Nature*, **534**, 553-557.
282. Young, N.P., Kamireddy, A., Van Nostrand, J.L., Eichner, L.J., Shokhirev, M.N., Dayn, Y. and Shaw, R.J. (2016) AMPK governs lineage specification through Tfeb-dependent regulation of lysosomes. *Genes Dev*, **30**, 535-552.
283. Schmeisser, K. and Parker, J.A. (2019) Pleiotropic Effects of mTOR and Autophagy During Development and Aging. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, **7**, 192.
284. Winborn, B.J., Travis, S.M., Todi, S.V., Scaglione, K.M., Xu, P., Williams, A.J., Cohen, R.E., Peng, J. and Paulson, H.L. (2008) The deubiquitinating enzyme ataxin-3, a polyglutamine disease protein, edits Lys63 linkages in mixed linkage ubiquitin chains. *J Biol Chem*, **283**, 26436-26443.
285. Chai, Y., Koppenhafer, S.L., Bonini, N.M. and Paulson, H.L. (1999) Analysis of the role of heat shock protein (Hsp) molecular chaperones in polyglutamine disease. *J Neurosci*, **19**, 10338-10347.
286. Schmidt, T., Lindenberg, K.S., Krebs, A., Schöls, L., Laccone, F., Herms, J., Rechsteiner, M., Riess, O. and Landwehrmeyer, G.B. (2002) Protein surveillance machinery in brains with spinocerebellar ataxia type 3: redistribution and differential recruitment of 26S proteasome subunits and chaperones to neuronal intranuclear inclusions. *Ann Neurol*, **51**, 302-310.
287. de Pril, R., Fischer, D.F., Maat-Schieman, M.L., Hobo, B., de Vos, R.A., Brunt, E.R., Hol, E.M., Roos, R.A. and van Leeuwen, F.W. (2004) Accumulation of aberrant ubiquitin induces aggregate formation and cell death in polyglutamine diseases. *Hum Mol Genet*, **13**, 1803-1813.
288. Bergink, S., Salomons, F.A., Hoogstraten, D., Groothuis, T.A., de Waard, H., Wu, J., Yuan, L., Citterio, E., Houtsmuller, A.B., Neefjes, J. *et al.* (2006) DNA damage triggers nucleotide excision repair-dependent monoubiquitylation of histone H2A. *Genes Dev*, **20**, 1343-1352.
289. Matsumoto, M., Yada, M., Hatakeyama, S., Ishimoto, H., Tanimura, T., Tsuji, S., Kakizuka, A., Kitagawa, M. and Nakayama, K.I. (2004) Molecular clearance of ataxin-3 is regulated by a mammalian E4. *Embo J*, **23**, 659-669.
290. Jana, N.R., Dikshit, P., Goswami, A., Kotliarova, S., Murata, S., Tanaka, K. and Nukina, N. (2005) Co-chaperone CHIP associates with expanded polyglutamine protein and promotes their degradation by proteasomes. *J Biol Chem*, **280**, 11635-11640.
291. Wang, H., Jia, N., Fei, E., Wang, Z., Liu, C., Zhang, T., Fan, J., Wu, M., Chen, L., Nukina, N. *et al.* (2007) p45, an ATPase subunit of the 19S proteasome, targets the polyglutamine disease protein ataxin-3 to the proteasome. *J Neurochem*, **101**, 1651-1661.

292. Chen, I.C., Chang, C.N., Chen, W.L., Lin, T.H., Chao, C.Y., Lin, C.H., Lin, H.Y., Cheng, M.L., Chiang, M.C., Lin, J.Y. *et al.* (2019) Targeting Ubiquitin Proteasome Pathway with Traditional Chinese Medicine for Treatment of Spinocerebellar Ataxia Type 3. *The American Journal of Chinese Medicine*, **47**, 63-95.
293. Chou, A.H., Chen, Y.L., Chiu, C.C., Yuan, S.J., Weng, Y.H., Yeh, T.H., Lin, Y.L., Fang, J.M. and Wang, H.L. (2015) T1-11 and JMF1907 ameliorate polyglutamine-expanded ataxin-3-induced neurodegeneration, transcriptional dysregulation and ataxic symptom in the SCA3 transgenic mouse. *Neuropharmacology*, **99**, 308-317.
294. Bilen, J. and Bonini, N.M. (2007) Genome-wide screen for modifiers of ataxin-3 neurodegeneration in Drosophila. *PLoS Genet*, **3**, 1950-1964.
295. Pavel, M., Imarisio, S., Menzies, F.M., Jimenez-Sanchez, M., Siddiqi, F.H., Wu, X., Renna, M., O'Kane, C.J., Crowther, D.C. and Rubinsztein, D.C. (2016) CCT complex restricts neuropathogenic protein aggregation via autophagy. *Nat Commun*, **7**, 13821.
296. Zijlstra, M.P., Rujano, M.A., Van Waarde, M.A., Vis, E., Brunt, E.R. and Kampinga, H.H. (2010) Levels of DNAJB family members (HSP40) correlate with disease onset in patients with spinocerebellar ataxia type 3. *The European Journal of Neuroscience*, **32**, 760-770.
297. Zarouchlioti, C., Parfitt, D.A., Li, W., Gittings, L.M. and Cheetham, M.E. (2018) DNAJ Proteins in neurodegeneration: essential and protective factors. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, **373**.
298. Wu, D., Vonk, J.J., Salles, F., Vonk, D., Haslbeck, M., Melki, R., Bergink, S. and Kampinga, H.H. (2019) The N terminus of the small heat shock protein HSPB7 drives its polyQ aggregation-suppressing activity. *J Biol Chem*, **294**, 9985-9994.
299. Warrick, J.M., Chan, H.Y., Gray-Board, G.L., Chai, Y., Paulson, H.L. and Bonini, N.M. (1999) Suppression of polyglutamine-mediated neurodegeneration in Drosophila by the molecular chaperone HSP70. *Nature Genetics*, **23**, 425-428.
300. Vos, M.J., Zijlstra, M.P., Kanon, B., van Waarde-Verhagen, M.A., Brunt, E.R., Oosterveld-Hut, H.M., Carra, S., Sibon, O.C. and Kampinga, H.H. (2010) HSPB7 is the most potent polyQ aggregation suppressor within the HSPB family of molecular chaperones. *Hum Mol Genet*, **19**, 4677-4693.
301. Seidel, K., Vinet, J., Dunnen, W.F., Brunt, E.R., Meister, M., Boncoraglio, A., Zijlstra, M.P., Boddeke, H.W., Rüb, U., Kampinga, H.H. *et al.* (2012) The HSPB8-BAG3 chaperone complex is upregulated in astrocytes in the human brain affected by protein aggregation diseases. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, **38**, 39-53.
302. Ito, N., Kamiguchi, K., Nakanishi, K., Sokolovskya, A., Hirohashi, Y., Tamura, Y., Murai, A., Yamamoto, E., Kanaseki, T., Tsukahara, T. *et al.* (2016) A novel nuclear DnaJ protein, DNAJC8, can suppress the formation of spinocerebellar ataxia 3 polyglutamine aggregation in a J-domain independent manner. *Biochem Biophys Res Commun*, **474**, 626-633.

303. Silva-Fernandes, A., Duarte-Silva, S., Neves-Carvalho, A., Amorim, M., Soares-Cunha, C., Oliveira, P., Thirstrup, K., Teixeira-Castro, A. and Maciel, P. (2014) Chronic treatment with 17-DMAG improves balance and coordination in a new mouse model of Machado-Joseph disease. *Neurotherapeutics*, **11**, 433-449.
304. Berendzen, K.M., Durieux, J., Shao, L.W., Tian, Y., Kim, H.E., Wolff, S., Liu, Y. and Dillin, A. (2016) Neuroendocrine Coordination of Mitochondrial Stress Signaling and Proteostasis. *Cell*, **166**, 1553-1563.e1510.
305. Ashraf, N.S., Duarte-Silva, S., Shaw, E.D., Maciel, P., Paulson, H.L., Teixeira-Castro, A. and Costa, M.D.C. (2019) Citalopram Reduces Aggregation of ATXN3 in a YAC Transgenic Mouse Model of Machado-Joseph Disease. *Mol Neurobiol*, **56**, 3690-3701.
306. Culmsee, C. and Mattson, M.P. (2005) p53 in neuronal apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*, **331**, 761-777.
307. Tu, Y., Li, X., Zhu, X., Liu, X., Guo, C., Jia, D. and Tang, T.S. (2020) Determining the Fate of Neurons in SCA3: ATX3, a Rising Decision Maker in Response to DNA Stresses and Beyond. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, **8**, 619911.
308. Chou, A.H., Lin, A.C., Hong, K.Y., Hu, S.H., Chen, Y.L., Chen, J.Y. and Wang, H.L. (2011) p53 activation mediates polyglutamine-expanded ataxin-3 upregulation of Bax expression in cerebellar and pontine nuclei neurons. *Neurochem Int*, **58**, 145-152.
309. Chuang, D.M., Leng, Y., Marinova, Z., Kim, H.J. and Chiu, C.T. (2009) Multiple roles of HDAC inhibition in neurodegenerative conditions. *Trends in Neurosciences*, **32**, 591-601.
310. Shukla, S. and Tekwani, B.L. (2020) Histone Deacetylases Inhibitors in Neurodegenerative Diseases, Neuroprotection and Neuronal Differentiation. *Frontiers in Pharmacology*, **11**, 537.
311. Ziemka-Nalecz, M., Jaworska, J., Sypecka, J. and Zalewska, T. (2018) Histone Deacetylase Inhibitors: A Therapeutic Key in Neurological Disorders? *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, **77**, 855-870.
312. Yi, J., Zhang, L., Tang, B., Han, W., Zhou, Y., Chen, Z., Jia, D. and Jiang, H. (2013) Sodium valproate alleviates neurodegeneration in SCA3/MJD via suppressing apoptosis and rescuing the hypoacetylation levels of histone H3 and H4. *PLoS One*, **8**, e54792.
313. Gui, C.Y., Ngo, L., Xu, W.S., Richon, V.M. and Marks, P.A. (2004) Histone deacetylase (HDAC) inhibitor activation of p21WAF1 involves changes in promoter-associated proteins, including HDAC1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 1241-1246.
314. Chou, A.H., Chen, S.Y., Yeh, T.H., Weng, Y.H. and Wang, H.L. (2011) HDAC inhibitor sodium butyrate reverses transcriptional downregulation and ameliorates ataxic symptoms in a transgenic mouse model of SCA3. *Neurobiol Dis*, **41**, 481-488.
315. Lei, L.F., Yang, G.P., Wang, J.L., Chuang, D.M., Song, W.H., Tang, B.S. and Jiang, H. (2016) Safety and efficacy of valproic acid treatment in SCA3/MJD patients. *Parkinsonism & Related Disorders*, **26**, 55-61.



316. Rosenberg, G. (2007) The mechanisms of action of valproate in neuropsychiatric disorders: can we see the forest for the trees? *Cell Mol Life Sci*, **64**, 2090-2103.
317. Gould, T.D., Quiroz, J.A., Singh, J., Zarate, C.A. and Manji, H.K. (2004) Emerging experimental therapeutics for bipolar disorder: insights from the molecular and cellular actions of current mood stabilizers. *Molecular Psychiatry*, **9**, 734-755.
318. Chiu, C.T., Wang, Z., Hunsberger, J.G. and Chuang, D.M. (2013) Therapeutic potential of mood stabilizers lithium and valproic acid: beyond bipolar disorder. *Pharmacological Reviews*, **65**, 105-142.
319. Onyango, I.G., Dennis, J. and Khan, S.M. (2016) Mitochondrial Dysfunction in Alzheimer's Disease and the Rationale for Bioenergetics Based Therapies. *Aging and Disease*, **7**, 201-214.
320. Park, J.S., Davis, R.L. and Sue, C.M. (2018) Mitochondrial Dysfunction in Parkinson's Disease: New Mechanistic Insights and Therapeutic Perspectives. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, **18**, 21.
321. Guo, C., Sun, L., Chen, X. and Zhang, D. (2013) Oxidative stress, mitochondrial damage and neurodegenerative diseases. *Neural Regeneration Research*, **8**, 2003-2014.
322. Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., Squadrito, F., Altavilla, D. and Bitto, A. (2017) Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **2017**, 8416763.
323. Singh, K.K. (2006) Mitochondria damage checkpoint, aging, and cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1067**, 182-190.
324. Poulsen, H.E. (2005) Oxidative DNA modifications. *Experimental and Toxicologic Pathology : Official Journal of the Gesellschaft fur Toxikologische Pathologie*, **57 Suppl 1**, 161-169.
325. Cali, T., Ottolini, D. and Brini, M. (2012) Mitochondrial Ca(2+) and neurodegeneration. *Cell Calcium*, **52**, 73-85.
326. Martin, L.J. (2010) Mitochondrial and Cell Death Mechanisms in Neurodegenerative Diseases. *Pharmaceuticals (Basel)*, **3**, 839-915.
327. Angajala, A., Lim, S., Phillips, J.B., Kim, J.H., Yates, C., You, Z. and Tan, M. (2018) Diverse Roles of Mitochondria in Immune Responses: Novel Insights Into Immuno-Metabolism. *Frontiers in Immunology*, **9**, 1605.
328. Lin, M.T. and Beal, M.F. (2006) Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*, **443**, 787-795.
329. Yu, Y.C., Kuo, C.L., Cheng, W.L., Liu, C.S. and Hsieh, M. (2009) Decreased antioxidant enzyme activity and increased mitochondrial DNA damage in cellular models of Machado-Joseph disease. *Journal of Neuroscience Research*, **87**, 1884-1891.

330. de Assis, A.M., Saute, J.A.M., Longoni, A., Haas, C.B., Torrez, V.R., Brochier, A.W., Souza, G.N., Furtado, G.V., Gheno, T.C., Russo, A. *et al.* (2017) Peripheral Oxidative Stress Biomarkers in Spinocerebellar Ataxia Type 3/Machado-Joseph Disease. *Frontiers in Neurology*, **8**, 485.
331. Cunha-Santos, J., Duarte-Neves, J., Carmona, V., Guarente, L., Pereira de Almeida, L. and Cavadas, C. (2016) Caloric restriction blocks neuropathology and motor deficits in Machado-Joseph disease mouse models through SIRT1 pathway. *Nat Commun*, **7**, 11445.
332. Ou, X., Lee, M.R., Huang, X., Messina-Graham, S. and Broxmeyer, H.E. (2014) SIRT1 positively regulates autophagy and mitochondria function in embryonic stem cells under oxidative stress. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, **32**, 1183-1194.
333. Olmos, Y., Sánchez-Gómez, F.J., Wild, B., García-Quintans, N., Cabezudo, S., Lamas, S. and Monsalve, M. (2013) SirT1 regulation of antioxidant genes is dependent on the formation of a FoxO3a/PGC-1 $\alpha$  complex. *Antioxidants & Redox Signaling*, **19**, 1507-1521.
334. Egorova, P., Popugaeva, E. and Bezprozvanny, I. (2015) Disturbed calcium signaling in spinocerebellar ataxias and Alzheimer's disease. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, **40**, 127-133.
335. Robinson, K.J., Watchon, M. and Laird, A.S. (2020) Aberrant Cerebellar Circuitry in the Spinocerebellar Ataxias. *Front Neurosci*, **14**, 707.
336. Hirano, T. (2018) Purkinje Neurons: Development, Morphology, and Function. *Cerebellum (London, England)*, **17**, 699-700.
337. Chang, W., Pedroni, A., Hohendorf, V., Giacomello, S., Hibi, M., Köster, R.W. and Ampatzis, K. (2020) Functionally distinct Purkinje cell types show temporal precision in encoding locomotion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **117**, 17330-17337.
338. Prestori, F., Moccia, F. and D'Angelo, E. (2019) Disrupted Calcium Signaling in Animal Models of Human Spinocerebellar Ataxia (SCA). *Int J Mol Sci*, **21**.
339. Hisatsune, C., Hamada, K. and Mikoshiba, K. (2018) Ca(2+) signaling and spinocerebellar ataxia. *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular Cell Research*, **1865**, 1733-1744.
340. Zhivotovsky, B. and Orrenius, S. (2011) Calcium and cell death mechanisms: a perspective from the cell death community. *Cell Calcium*, **50**, 211-221.
341. Chen, X., Tang, T.S., Tu, H., Nelson, O., Pook, M., Hammer, R., Nukina, N. and Bezprozvanny, I. (2008) Deranged calcium signaling and neurodegeneration in spinocerebellar ataxia type 3. *J Neurosci*, **28**, 12713-12724.
342. Hsieh, M., Hsieh, B.Y., Ma, C.Y., Li, Y.T., Liu, C.S. and Lo, C.M. (2019) Protective roles of carbonic anhydrase 8 in Machado-Joseph Disease. *Journal of Neuroscience Research*, **97**, 1278-1297.

343. Hirota, J., Ando, H., Hamada, K. and Mikoshiba, K. (2003) Carbonic anhydrase-related protein is a novel binding protein for inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1. *The Biochemical Journal*, **372**, 435-441.
344. 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. *J Neurosci*, **21**, 5389-5396.
345. Raposo, M., Bettencourt, C., Maciel, P., Gao, F., Ramos, A., Kazachkova, N., Vasconcelos, J., Kay, T., Rodrigues, A.J., Bettencourt, B. *et al.* (2015) Novel candidate blood-based transcriptional biomarkers of Machado-Joseph disease. *Mov Disord*, **30**, 968-975.
346. Chiu, Y.J., Lin, S.A., Chen, W.L., Lin, T.H., Lin, C.H., Yao, C.F., Lin, W., Wu, Y.R., Chang, K.H., Lee-Chen, G.J. *et al.* (2020) Pathomechanism characterization and potential therapeutics identification for SCA3 targeting neuroinflammation. *Aging (Albany NY)*, **12**, 23619-23646.
347. Mendonça, L.S., Nóbrega, C., Tavino, S., Brinkhaus, M., Matos, C., Tomé, S., Moreira, R., Henriques, D., Kaspar, B.K. and Pereira de Almeida, L. (2019) Ibuprofen enhances synaptic function and neural progenitors proliferation markers and improves neuropathology and motor coordination in Machado-Joseph disease models. *Hum Mol Genet*, **28**, 3691-3703.
348. Babiloni, C., Frisoni, G.B., Del Percio, C., Zanetti, O., Bonomini, C., Cassetta, E., Pasqualetti, P., Miniussi, C., De Rosas, M., Valenzano, A. *et al.* (2009) Ibuprofen treatment modifies cortical sources of EEG rhythms in mild Alzheimer's disease. *Clinical Neurophysiology : Official Journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology*, **120**, 709-718.
349. Scali, C., Prospero, C., Bracco, L., Piccini, C., Baronti, R., Ginestroni, A., Sorbi, S., Pepeu, G. and Casamenti, F. (2002) Neutrophils CD11b and fibroblasts PGE(2) are elevated in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, **23**, 523-530.
350. Duarte-Neves, J., Gonçalves, N., Cunha-Santos, J., Simões, A.T., den Dunnen, W.F., Hirai, H., Kügler, S., Cavadas, C. and Pereira de Almeida, L. (2015) Neuropeptide Y mitigates neuropathology and motor deficits in mouse models of Machado-Joseph disease. *Hum Mol Genet*, **24**, 5451-5463.
351. Chen, X.Y., Du, Y.F. and Chen, L. (2018) Neuropeptides Exert Neuroprotective Effects in Alzheimer's Disease. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, **11**, 493.
352. Pain, S., Vergote, J., Gulhan, Z., Bodard, S., Chalon, S. and Gaillard, A. (2019) Inflammatory process in Parkinson disease: neuroprotection by neuropeptide Y. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, **33**, 544-548.
353. Li, C., Wu, X., Liu, S., Zhao, Y., Zhu, J. and Liu, K. (2019) Roles of Neuropeptide Y in Neurodegenerative and Neuroimmune Diseases. *Front Neurosci*, **13**, 869.

354. Mendonça, L.S., Nóbrega, 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*, **138**, 320-335.
355. D'Abreu, A., França, M., Jr., Appenzeller, S., Lopes-Cendes, I. and Cendes, F. (2009) Axonal dysfunction in the deep white matter in Machado-Joseph disease. *Journal of Neuroimaging : Official Journal of the American Society of Neuroimaging*, **19**, 9-12.
356. Joers, J.M., Deelchand, D.K., Lyu, T., Emir, U.E., Hutter, D., Gomez, C.M., Bushara, K.O., Eberly, L.E. and Öz, G. (2018) Neurochemical abnormalities in premanifest and early spinocerebellar ataxias. *Ann Neurol*, **83**, 816-829.
357. Fisher, S.K., Novak, J.E. and Agranoff, B.W. (2002) Inositol and higher inositol phosphates in neural tissues: homeostasis, metabolism and functional significance. *J Neurochem*, **82**, 736-754.
358. Mountford, C.E., Stanwell, P., Lin, A., Ramadan, S. and Ross, B. (2010) Neurospectroscopy: the past, present and future. *Chemical Reviews*, **110**, 3060-3086.
359. Demougeot, C., Garnier, P., Mossiat, C., Bertrand, N., Giroud, M., Beley, A. and Marie, C. (2001) N-Acetylaspartate, a marker of both cellular dysfunction and neuronal loss: its relevance to studies of acute brain injury. *J Neurochem*, **77**, 408-415.
360. Costa, M.D.C., Radzwion, M., McLoughlin, H.S., Ashraf, N.S., Fischer, S., Shakkottai, V.G., Maciel, P., Paulson, H.L. and Öz, G. (2020) In Vivo Molecular Signatures of Cerebellar Pathology in Spinocerebellar Ataxia Type 3. *Mov Disord*, **35**, 1774-1786.
361. Gonçalves, N., Simões, A.T., Cunha, R.A. and de Almeida, L.P. (2013) Caffeine and adenosine A(2A) receptor inactivation decrease striatal neuropathology in a lentiviral-based model of Machado-Joseph disease. *Ann Neurol*, **73**, 655-666.
362. Gonçalves, N., Simões, A.T., Prediger, R.D., Hirai, H., Cunha, R.A. and Pereira de Almeida, L. (2017) Caffeine alleviates progressive motor deficits in a transgenic mouse model of spinocerebellar ataxia. *Ann Neurol*, **81**, 407-418.
363. Blaxter, M. (2011) Nematodes: the worm and its relatives. *PLoS biology*, **9**, e1001050.
364. 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.
365. Lai, C.H., Chou, C.Y., Ch'ang, L.Y., Liu, C.S. and Lin, W. (2000) Identification of novel human genes evolutionarily conserved in *Caenorhabditis elegans* by comparative proteomics. *Genome Research*, **10**, 703-713.
366. Hobert, O. (2010) Neurogenesis in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *WormBook*, 1-24.
367. Sengupta, P. and Samuel, A.D. (2009) *Caenorhabditis elegans*: a model system for systems neuroscience. *Current Opinion in Neurobiology*, **19**, 637-643.

368. McIntire, S.L., Jorgensen, E., Kaplan, J. and Horvitz, H.R. (1993) The GABAergic nervous system of *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, **364**, 337-341.
369. Schuske, K., Beg, A.A. and Jorgensen, E.M. (2004) The GABA nervous system in *C. elegans*. *Trends in Neurosciences*, **27**, 407-414.
370. Rodrigues, A.J., Neves-Carvalho, A., Ferro, A., Rokka, A., Corthals, G., Logarinho, E. and Maciel, P. (2009) ATX-3, CDC-48 and UBXN-5: a new trimolecular complex in *Caenorhabditis elegans*. *Biochem Biophys Res Commun*, **386**, 575-581.
371. Mouysset, J., Kähler, C. and Hoppe, T. (2006) A conserved role of *Caenorhabditis elegans* CDC-48 in ER-associated protein degradation. *Journal of Structural Biology*, **156**, 41-49.
372. 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.
373. Schmidt, J. and Schmidt, T. (2018) Animal Models of Machado-Joseph Disease. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **1049**, 289-308.
374. Khan, L.A., Bauer, P.O., Miyazaki, H., Lindenberg, K.S., Landwehrmeyer, B.G. and Nukina, N. (2006) Expanded polyglutamines impair synaptic transmission and ubiquitin-proteasome system in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurochem*, **98**, 576-587.
375. Teixeira-Castro, A., Ailion, M., Jalles, A., Brignull, H.R., Vilaça, 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. *Hum Mol Genet*, **20**, 2996-3009.
376. Bonanomi, M., Natalello, A., Visentin, C., Pastori, V., Penco, A., Cornelli, G., Colombo, G., Malabarba, M.G., Doglia, S.M., Relini, A. *et al.* (2014) Epigallocatechin-3-gallate and tetracycline differently affect ataxin-3 fibrillogenesis and reduce toxicity in spinocerebellar ataxia type 3 model. *Hum Mol Genet*, **23**, 6542-6552.
377. Christie, N.T., Lee, A.L., Fay, H.G., Gray, A.A. and Kikis, E.A. (2014) Novel polyglutamine model uncouples proteotoxicity from aging. *PLoS One*, **9**, e96835.
378. Frøkjær-Jensen, C., Davis, M.W., Hopkins, C.E., Newman, B.J., Thummel, J.M., Olesen, S.P., Grunnet, M. and Jorgensen, E.M. (2008) Single-copy insertion of transgenes in *Caenorhabditis elegans*. *Nature Genetics*, **40**, 1375-1383.
379. 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.
380. 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.

381. 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.
382. Jaques, C.S., Pedroso, J.L., Rocha, A.J.D., Pinto, W., Oliveira, A.S.B. and Barsottini, O.G.P. (2021) Spinocerebellar ataxia type 3 presenting simultaneously with motor neuron disease and cerebellar ataxia. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, **79**, 851-852.
383. Fardghassemi, Y. and Parker, J.A. (2020) Overexpression of FKH-2/FOXG1 is neuroprotective in a *C. elegans* model of Machado-Joseph disease. *Exp Neurol*, **337**, 113544.
384. Kern, A., Spang, N., Huesmann, H. and Behl, C. (2018) Novel Modulators of Proteostasis: RNAi Screen of Chromosome I in a Heat Stress Paradigm in *C. elegans*. *Cells*, **7**.
385. Hamamichi, S., Rivas, R.N., Knight, A.L., Cao, S., Caldwell, K.A. and Caldwell, G.A. (2008) Hypothesis-based RNAi screening identifies neuroprotective genes in a Parkinson's disease model. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 728-733.
386. de Carlos Cáceres, I., Porto, D.A., Gallotta, I., Santonicola, P., Rodríguez-Cordero, J., Di Schiavi, E. and Lu, H. (2018) Automated screening of *C. elegans* neurodegeneration mutants enabled by microfluidics and image analysis algorithms. *Integr Biol (Camb)*, **10**, 539-548.
387. Patten, S.A., Aggad, D., Martinez, J., Tremblay, E., Petrillo, J., Armstrong, G.A., La Fontaine, A., Maios, C., Liao, M., Ciura, S. *et al.* (2017) Neuroleptics as therapeutic compounds stabilizing neuromuscular transmission in amyotrophic lateral sclerosis. *JCI Insight*, **2**.
388. Schmeisser, K., Fardghassemi, Y. and Parker, J.A. (2017) A rapid chemical-genetic screen utilizing impaired movement phenotypes in *C. elegans*: Input into genetics of neurodevelopmental disorders. *Exp Neurol*, **293**, 101-114.
389. Bose, P., Tremblay, E., Maois, C., Narasimhan, V., Armstrong, G.A.B., Liao, M., Parker, J.A., Robitaille, R., Wen, X.Y., Barden, C. *et al.* (2019) The Novel Small Molecule TRVA242 Stabilizes Neuromuscular Junction Defects in Multiple Animal Models of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurotherapeutics*, **16**, 1149-1166.
390. Fardghassemi, Y., Maios, C. and Parker, J.A. (2021) Small Molecule Rescue of ATXN3 Toxicity in *C. elegans* via TFEB/HLH-30. *Neurotherapeutics*.
391. Kwok, T.C., Ricker, N., Fraser, R., Chan, A.W., Burns, A., Stanley, E.F., McCourt, P., Cutler, S.R. and Roy, P.J. (2006) A small-molecule screen in *C. elegans* yields a new calcium channel antagonist. *Nature*, **441**, 91-95.
392. O'Reilly, L.P., Luke, C.J., Perlmutter, D.H., Silverman, G.A. and Pak, S.C. (2014) *C. elegans* in high-throughput drug discovery. *Adv Drug Deliv Rev*, **69-70**, 247-253.

393. Ikenaka, K., Tsukada, Y., Giles, A.C., Arai, T., Nakadera, Y., Nakano, S., Kawai, K., Mochizuki, H., Katsuno, M., Sobue, G. *et al.* (2019) A behavior-based drug screening system using a *Caenorhabditis elegans* model of motor neuron disease. *Sci Rep*, **9**, 10104.
394. Kinser, H.E. and Pincus, Z. (2017) High-throughput screening in the *C. elegans* nervous system. *Molecular and Cellular Neurosciences*, **80**, 192-197.
395. Simonetta, S.H. and Golombek, D.A. (2007) An automated tracking system for *Caenorhabditis elegans* locomotor behavior and circadian studies application. *J Neurosci Methods*, **161**, 273-280.
396. Takahashi, K. and Yamanaka, S. (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, **126**, 663-676.
397. Lemons, D. and McGinnis, W. (2006) Genomic evolution of Hox gene clusters. *Science*, **313**, 1918-1922.
398. Evan, G., Harrington, E., Fanidi, A., Land, H., Amati, B. and Bennett, M. (1994) Integrated control of cell proliferation and cell death by the c-myc oncogene. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, **345**, 269-275.
399. Blanchet, E., Annicotte, J.S., Lagarrigue, S., Aguilar, V., Clapé, C., Chavey, C., Fritz, V., Casas, F., Apparailly, F., Auwerx, J. *et al.* (2011) E2F transcription factor-1 regulates oxidative metabolism. *Nature Cell Biology*, **13**, 1146-1152.
400. Benizri, E., Ginouvès, A. and Berra, E. (2008) The magic of the hypoxia-signaling cascade. *Cell Mol Life Sci*, **65**, 1133-1149.
401. Reece-Hoyes, J.S., Deplancke, B., Shingles, J., Grove, C.A., Hope, I.A. and Walhout, A.J. (2005) A compendium of *Caenorhabditis elegans* regulatory transcription factors: a resource for mapping transcription regulatory networks. *Genome Biology*, **6**, R110.
402. Haerty, W., Artieri, C., Khezri, N., Singh, R.S. and Gupta, B.P. (2008) Comparative analysis of function and interaction of transcription factors in nematodes: extensive conservation of orthology coupled to rapid sequence evolution. *BMC Genomics*, **9**, 399.
403. Seetharam, A., Bai, Y. and Stuart, G.W. (2010) A survey of well conserved families of C2H2 zinc-finger genes in *Daphnia*. *BMC Genomics*, **11**, 276.
404. Schwabe, J.W. and Klug, A. (1994) Zinc mining for protein domains. *Nature Structural Biology*, **1**, 345-349.
405. Laity, J.H., Lee, B.M. and Wright, P.E. (2001) Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity. *Current Opinion in Structural Biology*, **11**, 39-46.
406. Enmark, E. and Gustafsson, J.A. (2001) Comparing nuclear receptors in worms, flies and humans. *Trends in Pharmacological Sciences*, **22**, 611-615.

407. Arda, H.E., Taubert, S., MacNeil, L.T., Conine, C.C., Tsuda, B., Van Gilst, M., Sequerra, R., Doucette-Stamm, L., Yamamoto, K.R. and Walhout, A.J. (2010) Functional modularity of nuclear hormone receptors in a *Caenorhabditis elegans* metabolic gene regulatory network. *Molecular Systems Biology*, **6**, 367.
408. Antebi, A. (2015) Nuclear receptor signal transduction in *C. elegans*. *WormBook*, 1-49.
409. Riddle, D.L., Blumenthal, T., Meyer, B.J. and Priess, J.R. (1997) In Riddle, D. L., Blumenthal, T., Meyer, B. J. and Priess, J. R. (eds.), *C. elegans II*. Cold Spring Harbor Laboratory Press Copyright © 1997, Cold Spring Harbor Laboratory Press., Cold Spring Harbor (NY).
410. Van Gilst, M., Gissendanner, C.R. and Sluder, A.E. (2002) Diversity and function of orphan nuclear receptors in nematodes. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, **12**, 65-88.
411. Hench, J., Henriksson, J., Abou-Zied, A.M., Lüppert, M., Dethlefsen, J., Mukherjee, K., Tong, Y.G., Tang, L., Gangishetti, U., Baillie, D.L. *et al.* (2015) The Homeobox Genes of *Caenorhabditis elegans* and Insights into Their Spatio-Temporal Expression Dynamics during Embryogenesis. *PLoS One*, **10**, e0126947.
412. Hope, I.A., Mounsey, A., Bauer, P. and Aslam, S. (2003) The forkhead gene family of *Caenorhabditis elegans*. *Gene*, **304**, 43-55.
413. Tuteja, G. and Kaestner, K.H. (2007) SnapShot: forkhead transcription factors I. *Cell*, **130**, 1160.
414. Tuteja, G. and Kaestner, K.H. (2007) Forkhead transcription factors II. *Cell*, **131**, 192.
415. Lehmann, O.J., Sowden, J.C., Carlsson, P., Jordan, T. and Bhattacharya, S.S. (2003) Fox's in development and disease. *Trends in Genetics : TIG*, **19**, 339-344.
416. Massari, M.E. and Murre, C. (2000) Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Mol Cell Biol*, **20**, 429-440.
417. Chaudhary, J. and Skinner, M.K. (1999) Basic helix-loop-helix proteins can act at the E-box within the serum response element of the c-fos promoter to influence hormone-induced promoter activation in Sertoli cells. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, **13**, 774-786.
418. Malinow, R.A., Ying, P., Koorman, T., Boxem, M., Jin, Y. and Kim, K.W. (2019) Functional Dissection of *C. elegans* bZip-Protein CEBP-1 Reveals Novel Structural Motifs Required for Axon Regeneration and Nuclear Import. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, **13**, 348.
419. Hurst, H.C. (1994) Transcription factors. 1: bZIP proteins. *Protein Profile*, **1**, 123-168.
420. Ellenberger, T.E., Brandl, C.J., Struhl, K. and Harrison, S.C. (1992) The GCN4 basic region leucine zipper binds DNA as a dimer of uninterrupted alpha helices: crystal structure of the protein-DNA complex. *Cell*, **71**, 1223-1237.



421. Huber, P., Crum, T., Clary, L.M., Ronan, T., Packard, A.V. and Okkema, P.G. (2013) Function of the *C. elegans* T-box factor TBX-2 depends on SUMOylation. *Cell Mol Life Sci*, **70**, 4157-4168.
422. Huber, P., Crum, T. and Okkema, P.G. (2016) Function of the *C. elegans* T-box factor TBX-2 depends on interaction with the UNC-37/Groucho corepressor. *Developmental Biology*, **416**, 266-276.
423. Milton, A.C. and Okkema, P.G. (2015) *Caenorhabditis elegans* TBX-2 Directly Regulates Its Own Expression in a Negative Autoregulatory Loop. *G3 (Bethesda)*, **5**, 1177-1186.
424. Lapiere, L.R., De Magalhaes Filho, C.D., McQuary, P.R., Chu, C.C., Visvikis, O., Chang, J.T., Gelino, S., Ong, B., Davis, A.E., Irazoqui, J.E. *et al.* (2013) The TFEB orthologue HLH-30 regulates autophagy and modulates longevity in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Commun*, **4**, 2267.
425. Lin, X.X., Sen, I., Janssens, G.E., Zhou, X., Fonslow, B.R., Edgar, D., Stroustrup, N., Swoboda, P., Yates, J.R., 3rd, Ruvkun, G. *et al.* (2018) DAF-16/FOXO and HLH-30/TFEB function as combinatorial transcription factors to promote stress resistance and longevity. *Nat Commun*, **9**, 4400.
426. O'Rourke, E.J. and Ruvkun, G. (2013) MXL-3 and HLH-30 transcriptionally link lipolysis and autophagy to nutrient availability. *Nature Cell Biology*, **15**, 668-676.
427. Settembre, C., De Cegli, R., Mansueto, G., Saha, P.K., Vetrini, F., Visvikis, O., Huynh, T., Carissimo, A., Palmer, D., Klisch, T.J. *et al.* (2013) TFEB controls cellular lipid metabolism through a starvation-induced autoregulatory loop. *Nature Cell Biology*, **15**, 647-658.
428. Napolitano, G. and Ballabio, A. (2016) TFEB at a glance. *Journal of Cell Science*, **129**, 2475-2481.
429. Palmieri, M., Impey, S., Kang, H., di Ronza, A., Pelz, C., Sardiello, M. and Ballabio, A. (2011) Characterization of the CLEAR network reveals an integrated control of cellular clearance pathways. *Hum Mol Genet*, **20**, 3852-3866.
430. Sardiello, M., Palmieri, M., di Ronza, A., Medina, D.L., Valenza, M., Gennarino, V.A., Di Malta, C., Donaudy, F., Embrione, V., Polishchuk, R.S. *et al.* (2009) A gene network regulating lysosomal biogenesis and function. *Science*, **325**, 473-477.
431. Settembre, C., Di Malta, C., Polito, V.A., Garcia Arencibia, M., Vetrini, F., Erdin, S., Erdin, S.U., Huynh, T., Medina, D., Colella, P. *et al.* (2011) TFEB links autophagy to lysosomal biogenesis. *Science*, **332**, 1429-1433.
432. Zhang, W., Li, X., Wang, S., Chen, Y. and Liu, H. (2020) Regulation of TFEB activity and its potential as a therapeutic target against kidney diseases. *Cell Death Discovery*, **6**, 32.

433. Decressac, M., Mattsson, B., Weikop, P., Lundblad, M., Jakobsson, J. and Björklund, A. (2013) TFEB-mediated autophagy rescues midbrain dopamine neurons from  $\alpha$ -synuclein toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **110**, E1817-1826.
434. Polito, V.A., Li, H., Martini-Stoica, H., Wang, B., Yang, L., Xu, Y., Swartzlander, D.B., Palmieri, M., di Ronza, A., Lee, V.M. *et al.* (2014) Selective clearance of aberrant tau proteins and rescue of neurotoxicity by transcription factor EB. *EMBO Molecular Medicine*, **6**, 1142-1160.
435. Di Malta, C., Cinque, L. and Settembre, C. (2019) Transcriptional Regulation of Autophagy: Mechanisms and Diseases. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, **7**, 114.
436. Settembre, C., Zoncu, R., Medina, D.L., Vetrini, F., Erdin, S., Erdin, S., Huynh, T., Ferron, M., Karsenty, G., Vellard, M.C. *et al.* (2012) A lysosome-to-nucleus signalling mechanism senses and regulates the lysosome via mTOR and TFEB. *Embo J*, **31**, 1095-1108.
437. Martina, J.A., Chen, Y., Gucek, M. and Puertollano, R. (2012) MTORC1 functions as a transcriptional regulator of autophagy by preventing nuclear transport of TFEB. *Autophagy*, **8**, 903-914.
438. Rocznik-Ferguson, A., Petit, C.S., Froehlich, F., Qian, S., Ky, J., Angarola, B., Walther, T.C. and Ferguson, S.M. (2012) The transcription factor TFEB links mTORC1 signaling to transcriptional control of lysosome homeostasis. *Science Signaling*, **5**, ra42.
439. Raben, N. and Puertollano, R. (2016) TFEB and TFE3: Linking Lysosomes to Cellular Adaptation to Stress. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, **32**, 255-278.
440. Vega-Rubin-de-Celis, S., Peña-Llopis, S., Konda, M. and Brugarolas, J. (2017) Multistep regulation of TFEB by MTORC1. *Autophagy*, **13**, 464-472.
441. Kaneko, H., Kobayashi, M., Mizunoe, Y., Yoshida, M., Yasukawa, H., Hoshino, S., Itagawa, R., Furuichi, T., Okita, N., Sudo, Y. *et al.* (2018) Taurine is an amino acid with the ability to activate autophagy in adipocytes. *Amino Acids*, **50**, 527-535.
442. Nada, S., Hondo, A., Kasai, A., Koike, M., Saito, K., Uchiyama, Y. and Okada, M. (2009) The novel lipid raft adaptor p18 controls endosome dynamics by anchoring the MEK-ERK pathway to late endosomes. *Embo J*, **28**, 477-489.
443. Medina, D.L., Di Paola, S., Peluso, I., Armani, A., De Stefani, D., Venditti, R., Montefusco, S., Scotto-Rosato, A., Prezioso, C., Forrester, A. *et al.* (2015) Lysosomal calcium signalling regulates autophagy through calcineurin and TFEB. *Nature Cell Biology*, **17**, 288-299.
444. Chen, D., Xie, J., Fiskesund, R., Dong, W., Liang, X., Lv, J., Jin, X., Liu, J., Mo, S., Zhang, T. *et al.* (2018) Chloroquine modulates antitumor immune response by resetting tumor-associated macrophages toward M1 phenotype. *Nat Commun*, **9**, 873.

445. Li, Y., Xu, M., Ding, X., Yan, C., Song, Z., Chen, L., Huang, X., Wang, X., Jian, Y., Tang, G. *et al.* (2016) Protein kinase C controls lysosome biogenesis independently of mTORC1. *Nature Cell Biology*, **18**, 1065-1077.
446. Martina, J.A., Diab, H.I., Brady, O.A. and Puertollano, R. (2016) TFEB and TFE3 are novel components of the integrated stress response. *Embo J*, **35**, 479-495.
447. Ivankovic, D., Chau, K.Y., Schapira, A.H. and Gegg, M.E. (2016) Mitochondrial and lysosomal biogenesis are activated following PINK1/parkin-mediated mitophagy. *J Neurochem*, **136**, 388-402.
448. Kaufmann, E. and Knöchel, W. (1996) Five years on the wings of fork head. *Mechanisms of Development*, **57**, 3-20.
449. Xuan, S., Baptista, C.A., Balas, G., Tao, W., Soares, V.C. and Lai, E. (1995) Winged helix transcription factor BF-1 is essential for the development of the cerebral hemispheres. *Neuron*, **14**, 1141-1152.
450. Kumamoto, T., Toma, K., Gunadi, McKenna, W.L., Kasukawa, T., Katzman, S., Chen, B. and Hanashima, C. (2013) Foxg1 coordinates the switch from nonradially to radially migrating glutamatergic subtypes in the neocortex through spatiotemporal repression. *Cell Rep*, **3**, 931-945.
451. Manuel, M., Martynoga, B., Yu, T., West, J.D., Mason, J.O. and Price, D.J. (2010) The transcription factor Foxg1 regulates the competence of telencephalic cells to adopt subpallial fates in mice. *Development (Cambridge, England)*, **137**, 487-497.
452. Cargnin, F., Kwon, J.S., Katzman, S., Chen, B., Lee, J.W. and Lee, S.K. (2018) FOXG1 Orchestrates Neocortical Organization and Cortico-Cortical Connections. *Neuron*, **100**, 1083-1096.e1085.
453. Vezzali, R., Weise, S.C., Hellbach, N., Machado, V., Heidrich, S. and Vogel, T. (2016) The FOXG1/FOXO/SMAD network balances proliferation and differentiation of cortical progenitors and activates Kcnh3 expression in mature neurons. *Oncotarget*, **7**, 37436-37455.
454. Hanashima, C., Fernandes, M., Hebert, J.M. and Fishell, G. (2007) The role of Foxg1 and dorsal midline signaling in the generation of Cajal-Retzius subtypes. *J Neurosci*, **27**, 11103-11111.
455. Chiola, S., Do, M.D., Centrone, L. and Mallamaci, A. (2019) Foxg1 Overexpression in Neocortical Pyramids Stimulates Dendrite Elongation Via Hes1 and pCreb1 Upregulation. *Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)*, **29**, 1006-1019.
456. Dastidar, S.G., Landrieu, P.M. and D'Mello, S.R. (2011) FoxG1 promotes the survival of postmitotic neurons. *J Neurosci*, **31**, 402-413.
457. Yu, B., Liu, J., Su, M., Wang, C., Chen, H. and Zhao, C. (2019) Disruption of Foxg1 impairs neural plasticity leading to social and cognitive behavioral defects. *Mol Brain*, **12**, 63.

458. Tian, C., Gong, Y., Yang, Y., Shen, W., Wang, K., Liu, J., Xu, B., Zhao, J. and Zhao, C. (2012) Foxg1 has an essential role in postnatal development of the dentate gyrus. *J Neurosci*, **32**, 2931-2949.
459. Wong, L.C., Singh, S., Wang, H.P., Hsu, C.J., Hu, S.C. and Lee, W.T. (2019) FOXG1-Related Syndrome: From Clinical to Molecular Genetics and Pathogenic Mechanisms. *Int J Mol Sci*, **20**.
460. Seoane, J., Le, H.V., Shen, L., Anderson, S.A. and Massagué, J. (2004) Integration of Smad and forkhead pathways in the control of neuroepithelial and glioblastoma cell proliferation. *Cell*, **117**, 211-223.
461. Manoranjan, B., Venugopal, C., McFarlane, N., Doble, B.W., Dunn, S.E., Scheinemann, K. and Singh, S.K. (2013) Medulloblastoma stem cells: modeling tumor heterogeneity. *Cancer Lett*, **338**, 23-31.
462. Li, J. and Vogt, P.K. (1993) The retroviral oncogene qin belongs to the transcription factor family that includes the homeotic gene fork head. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 4490-4494.
463. Ariani, F., Hayek, G., Rondinella, D., Artuso, R., Mencarelli, M.A., Spanhol-Rosseto, A., Pollazzon, M., Buoni, S., Spiga, O., Ricciardi, S. *et al.* (2008) FOXG1 is responsible for the congenital variant of Rett syndrome. *American Journal of Human Genetics*, **83**, 89-93.
464. Mariani, J., Coppola, G., Zhang, P., Abyzov, A., Provini, L., Tomasini, L., Amenduni, M., Szekely, A., Palejev, D., Wilson, M. *et al.* (2015) FOXG1-Dependent Dysregulation of GABA/Glutamate Neuron Differentiation in Autism Spectrum Disorders. *Cell*, **162**, 375-390.
465. Florian, C., Bahi-Buisson, N. and Bienvenu, T. (2012) FOXG1-Related Disorders: From Clinical Description to Molecular Genetics. *Mol Syndromol*, **2**, 153-163.
466. Patriarchi, T., Amabile, S., Frullanti, E., Landucci, E., Lo Rizzo, C., Ariani, F., Costa, M., Olimpico, F., J, W.H., F, M.V. *et al.* (2016) Imbalance of excitatory/inhibitory synaptic protein expression in iPSC-derived neurons from FOXG1(+/-) patients and in foxg1(+/-) mice. *European Journal of Human Genetics : EJHG*, **24**, 871-880.
467. Cellini, E., Vignoli, A., Pisano, T., Falchi, M., Molinaro, A., Accorsi, P., Bontacchio, A., Pinelli, L., Giordano, L. and Guerrini, R. (2016) The hyperkinetic movement disorder of FOXG1-related epileptic-dyskinetic encephalopathy. *Developmental Medicine and Child Neurology*, **58**, 93-97.
468. Regad, T., Roth, M., Bredenkamp, N., Illing, N. and Papalopulu, N. (2007) The neural progenitor-specifying activity of FoxG1 is antagonistically regulated by CKI and FGF. *Nature Cell Biology*, **9**, 531-540.
469. Rodriguez, C., Huang, L.J., Son, J.K., McKee, A., Xiao, Z. and Lodish, H.F. (2001) Functional cloning of the proto-oncogene brain factor-1 (BF-1) as a Smad-binding antagonist of transforming growth factor-beta signaling. *J Biol Chem*, **276**, 30224-30230.

470. Hsu, A.L., Murphy, C.T. and Kenyon, C. (2003) Regulation of aging and age-related disease by DAF-16 and heat-shock factor. *Science*, **300**, 1142-1145.
471. Morley, J.F. and Morimoto, R.I. (2004) Regulation of longevity in *Caenorhabditis elegans* by heat shock factor and molecular chaperones. *Mol Biol Cell*, **15**, 657-664.
472. Cohen, E., Bieschke, J., Perciavalle, R.M., Kelly, J.W. and Dillin, A. (2006) Opposing activities protect against age-onset proteotoxicity. *Science*, **313**, 1604-1610.
473. 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.
474. Kretzschmar, D., Tschäpe, J., Bettencourt Da Cruz, A., Asan, E., Poeck, B., Strauss, R. and Pflugfelder, G.O. (2005) Glial and neuronal expression of polyglutamine proteins induce behavioral changes and aggregate formation in *Drosophila*. *Glia*, **49**, 59-72.
475. Jung, J., Xu, K., Lessing, D. and Bonini, N.M. (2009) Preventing Ataxin-3 protein cleavage mitigates degeneration in a *Drosophila* model of SCA3. *Hum Mol Genet*, **18**, 4843-4852.
476. 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. *Hum Mol Genet*, **11**, 1075-1094.
477. Silva-Fernandes, A., Costa Mdo, C., Duarte-Silva, S., Oliveira, P., Botelho, C.M., Martins, L., Mariz, J.A., Ferreira, T., Ribeiro, F., Correia-Neves, M. *et al.* (2010) Motor uncoordination and neuropathology in a transgenic mouse model of Machado-Joseph disease lacking intranuclear inclusions and ataxin-3 cleavage products. *Neurobiol Dis*, **40**, 163-176.
478. Switonski, P.M., Szlachcic, W.J., Krzyzosiak, W.J. and Figiel, M. (2015) A new humanized ataxin-3 knock-in mouse model combines the genetic features, pathogenesis of neurons and glia and late disease onset of SCA3/MJD. *Neurobiol Dis*, **73**, 174-188.
479. Kamath, R.S., Martinez-Campos, M., Zipperlen, P., Fraser, A.G. and Ahringer, J. (2001) Effectiveness of specific RNA-mediated interference through ingested double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Genome Biology*, **2**, Research0002.
480. Timmons, L., Court, D.L. and Fire, A. (2001) Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Gene*, **263**, 103-112.
481. Asikainen, S., Vartiainen, S., Lakso, M., Nass, R. and Wong, G. (2005) Selective sensitivity of *Caenorhabditis elegans* neurons to RNA interference. *Neuroreport*, **16**, 1995-1999.
482. Calixto, A., Chelur, D., Topalidou, I., Chen, X. and Chalfie, M. (2010) Enhanced neuronal RNAi in *C. elegans* using SID-1. *Nat Methods*, **7**, 554-559.

483. Whangbo, J.S., Weisman, A.S., Chae, J. and Hunter, C.P. (2017) SID-1 Domains Important for dsRNA Import in *Caenorhabditis elegans*. *G3 (Bethesda)*, **7**, 3887-3899.
484. Boudreau, R.L., Rodríguez-Lebrón, E. and Davidson, B.L. (2011) RNAi medicine for the brain: progresses and challenges. *Hum Mol Genet*, **20**, R21-27.
485. Martier, R., Sogorb-Gonzalez, M., Stricker-Shaver, J., Hübener-Schmid, J., Keskin, S., Klima, J., Toonen, L.J., Juhas, S., Juhasova, J., Ellederova, Z. *et al.* (2019) Development of an AAV-Based MicroRNA Gene Therapy to Treat Machado-Joseph Disease. *Molecular Therapy. Methods & Clinical Development*, **15**, 343-358.
486. Borel, F., Kay, M.A. and Mueller, C. (2014) Recombinant AAV as a platform for translating the therapeutic potential of RNA interference. *Mol Ther*, **22**, 692-701.
487. Mueller, C., Berry, J.D., McKenna-Yasek, D.M., Gernoux, G., Owegi, M.A., Pothier, L.M., Douthwright, C.L., Gelevski, D., Luppino, S.D., Blackwood, M. *et al.* (2020) SOD1 Suppression with Adeno-Associated Virus and MicroRNA in Familial ALS. *The New England Journal of Medicine*, **383**, 151-158.
488. Rubinsztein, D.C. (2008) Functional genomics approaches to neurodegenerative diseases. *Mamm Genome*, **19**, 587-590.
489. Smout, M.J., Kotze, A.C., McCarthy, J.S. and Loukas, A. (2010) A novel high throughput assay for anthelmintic drug screening and resistance diagnosis by real-time monitoring of parasite motility. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **4**, e885.
490. Bretscher, A.J., Busch, K.E. and de Bono, M. (2008) A carbon dioxide avoidance behavior is integrated with responses to ambient oxygen and food in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 8044-8049.
491. Lockery, S.R., Lawton, K.J., Doll, J.C., Faumont, S., Coulthard, S.M., Thiele, T.R., Chronis, N., McCormick, K.E., Goodman, M.B. and Pruitt, B.L. (2008) Artificial dirt: microfluidic substrates for nematode neurobiology and behavior. *Journal of Neurophysiology*, **99**, 3136-3143.
492. Zhang, Y., Lu, H. and Bargmann, C.I. (2005) Pathogenic bacteria induce aversive olfactory learning in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, **438**, 179-184.
493. Chung, K. and Lu, H. (2009) Automated high-throughput cell microsurgery on-chip. *Lab on a Chip*, **9**, 2764-2766.
494. Chung, K., Crane, M.M. and Lu, H. (2008) Automated on-chip rapid microscopy, phenotyping and sorting of *C. elegans*. *Nat Methods*, **5**, 637-643.
495. Crane, M.M., Chung, K. and Lu, H. (2009) Computer-enhanced high-throughput genetic screens of *C. elegans* in a microfluidic system. *Lab on a Chip*, **9**, 38-40.
496. Crane, M.M., Chung, K., Stirman, J. and Lu, H. (2010) Microfluidics-enabled phenotyping, imaging, and screening of multicellular organisms. *Lab on a Chip*, **10**, 1509-1517.

497. Lee, H., Crane, M.M., Zhang, Y. and Lu, H. (2013) Quantitative screening of genes regulating tryptophan hydroxylase transcription in *Caenorhabditis elegans* using microfluidics and an adaptive algorithm. *Integr Biol (Camb)*, **5**, 372-380.
498. Guo, S.X., Bourgeois, F., Chokshi, T., Durr, N.J., Hilliard, M.A., Chronis, N. and Ben-Yakar, A. (2008) Femtosecond laser nanoaxotomy lab-on-a-chip for in vivo nerve regeneration studies. *Nat Methods*, **5**, 531-533.
499. Rohde, C.B., Zeng, F., Gonzalez-Rubio, R., Angel, M. and Yanik, M.F. (2007) Microfluidic system for on-chip high-throughput whole-animal sorting and screening at subcellular resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 13891-13895.
500. Stirman, J.N., Brauner, M., Gottschalk, A. and Lu, H. (2010) High-throughput study of synaptic transmission at the neuromuscular junction enabled by optogenetics and microfluidics. *J Neurosci Methods*, **191**, 90-93.
501. Muthaiyan Shanmugam, M. and Subhra Santra, T. (2016) Microfluidic Devices in Advanced *Caenorhabditis elegans* Research. *Molecules*, **21**.
502. Schmeisser, K. and Parker, J.A. (2018) Nicotinamide-N-methyltransferase controls behavior, neurodegeneration and lifespan by regulating neuronal autophagy. *PLoS Genet*, **14**, e1007561.
503. Cohen-Kaplan, V., Livneh, I., Avni, N., Fabre, B., Ziv, T., Kwon, Y.T. and Ciechanover, A. (2016) p62- and ubiquitin-dependent stress-induced autophagy of the mammalian 26S proteasome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **113**, E7490-e7499.
504. Lee, Y.K. and Lee, J.A. (2016) Role of the mammalian ATG8/LC3 family in autophagy: differential and compensatory roles in the spatiotemporal regulation of autophagy. *BMB Reports*, **49**, 424-430.
505. Chang, J.T., Kumsta, C., Hellman, A.B., Adams, L.M. and Hansen, M. (2017) Spatiotemporal regulation of autophagy during *Caenorhabditis elegans* aging. *Elife*, **6**.
506. Vodicka, P., Chase, K., Iuliano, M., Tousley, A., Valentine, D.T., Sapp, E., Kegel-Gleason, K.B., Sena-Esteves, M., Aronin, N. and DiFiglia, M. (2016) Autophagy Activation by Transcription Factor EB (TFEB) in Striatum of HDQ175/Q7 Mice. *Journal of Huntington's Disease*, **5**, 249-260.
507. Cortes, C.J., Miranda, H.C., Frankowski, H., Batlevi, Y., Young, J.E., Le, A., Ivanov, N., Sopher, B.L., Carromeu, C., Muotri, A.R. *et al.* (2014) Polyglutamine-expanded androgen receptor interferes with TFEB to elicit autophagy defects in SBMA. *Nature Neuroscience*, **17**, 1180-1189.
508. Zhang, Y.D. and Zhao, J.J. (2015) TFEB Participates in the A $\beta$ -Induced Pathogenesis of Alzheimer's Disease by Regulating the Autophagy-Lysosome Pathway. *DNA and Cell Biology*, **34**, 661-668.

509. Cortes, C.J. and La Spada, A.R. (2019) TFEB dysregulation as a driver of autophagy dysfunction in neurodegenerative disease: Molecular mechanisms, cellular processes, and emerging therapeutic opportunities. *Neurobiol Dis*, **122**, 83-93.
510. Torra, A., Parent, A., Cuadros, T., Rodríguez-Galván, B., Ruiz-Bronchal, E., Ballabio, A., Bortolozzi, A., Vila, M. and Bové, J. (2018) Overexpression of TFEB Drives a Pleiotropic Neurotrophic Effect and Prevents Parkinson's Disease-Related Neurodegeneration. *Mol Ther*, **26**, 1552-1567.
511. Kilpatrick, K., Zeng, Y., Hancock, T. and Segatori, L. (2015) Genetic and chemical activation of TFEB mediates clearance of aggregated  $\alpha$ -synuclein. *PLoS One*, **10**, e0120819.
512. Koduah, P., Paul, F. and Dorr, J.M. (2017) Vitamin D in the prevention, prediction and treatment of neurodegenerative and neuroinflammatory diseases. *EPMA J*, **8**, 313-325.
513. Balion, C., Griffith, L.E., Striffler, L., Henderson, M., Patterson, C., Heckman, G., Llewellyn, D.J. and Raina, P. (2012) Vitamin D, cognition, and dementia: a systematic review and meta-analysis. *Neurology*, **79**, 1397-1405.
514. Munger, K.L., Levin, L.I., Hollis, B.W., Howard, N.S. and Ascherio, A. (2006) Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. *JAMA*, **296**, 2832-2838.
515. Mark, K.A., Dumas, K.J., Bhaumik, D., Schilling, B., Davis, S., Oron, T.R., Sorensen, D.J., Lucanic, M., Brem, R.B., Melov, S. *et al.* (2016) Vitamin D Promotes Protein Homeostasis and Longevity via the Stress Response Pathway Genes *skn-1*, *ire-1*, and *xbp-1*. *Cell Rep*, **17**, 1227-1237.
516. Haq, S.H., AlAfaleq, N.O. and Johari, R.A. (2019) Vitamin D Treatment Reverses the Induced Oxidative Stress Damage to DNA. *Pak J Biol Sci*, **22**, 8-14.
517. Lima, L.A.R., Lopes, M.J.P., Costa, R.O., Lima, F.A.V., Neves, K.R.T., Calou, I.B.F., Andrade, G.M. and Viana, G.S.B. (2018) Vitamin D protects dopaminergic neurons against neuroinflammation and oxidative stress in hemiparkinsonian rats. *J Neuroinflammation*, **15**, 249.
518. Hylemon, P.B., Zhou, H., Pandak, W.M., Ren, S., Gil, G. and Dent, P. (2009) Bile acids as regulatory molecules. *Journal of Lipid Research*, **50**, 1509-1520.
519. Tsutsumi, K., Li, S.K., Hymas, R.V., Teng, C.L., Tillman, L.G., Hardee, G.E., Higuchi, W.I. and Ho, N.F. (2008) Systematic studies on the paracellular permeation of model permeants and oligonucleotides in the rat small intestine with chenodeoxycholate as enhancer. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **97**, 350-367.
520. Yasukawa, K., Iida, T. and Fujimoto, Y. (2009) Relative inhibitory activity of bile acids against 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced inflammation, and chenodeoxycholic acid inhibition of tumour promotion in mouse skin two-stage carcinogenesis. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **61**, 1051-1056.



521. Chen, X., Yang, D., Shen, W., Dong, H.F., Wang, J.M., Oppenheim, J.J. and Howard, M.Z. (2000) Characterization of chenodeoxycholic acid as an endogenous antagonist of the G-coupled formyl peptide receptors. *Inflammation Research : Official Journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]*, **49**, 744-755.
522. Goyal, N., Rana, A., Bijjem, K.R. and Kumar, P. (2015) Effect of chenodeoxycholic acid and sodium hydrogen sulfide in dinitro benzene sulfonic acid (DNBS)--Induced ulcerative colitis in rats. *Pharmacological Reports : PR*, **67**, 616-623.
523. Bazzari, F.H., Abdallah, D.M. and El-Abhar, H.S. (2019) Chenodeoxycholic Acid Ameliorates AlCl<sub>3</sub>-Induced Alzheimer's Disease Neurotoxicity and Cognitive Deterioration via Enhanced Insulin Signaling in Rats. *Molecules*, **24**.
524. Iser, J.H. and Sali, A. (1981) Chenodeoxycholic acid: a review of its pharmacological properties and therapeutic use. *Drugs*, **21**, 90-119.
525. Mair, W., Morantte, I., Rodrigues, A.P., Manning, G., Montminy, M., Shaw, R.J. and Dillin, A. (2011) Lifespan extension induced by AMPK and calcineurin is mediated by CRTCL-1 and CREB. *Nature*, **470**, 404-408.
526. Chen, Y.C., Chen, H.J., Tseng, W.C., Hsu, J.M., Huang, T.T., Chen, C.H. and Pan, C.L. (2016) A *C. elegans* Thermosensory Circuit Regulates Longevity through crh-1/CREB-Dependent flp-6 Neuropeptide Signaling. *Developmental Cell*, **39**, 209-223.
527. Kauffman, A.L., Ashraf, J.M., Corces-Zimmerman, M.R., Landis, J.N. and Murphy, C.T. (2010) Insulin signaling and dietary restriction differentially influence the decline of learning and memory with age. *PLoS Biol*, **8**, e1000372.
528. Manley, S., Ni, H.M., Kong, B., Apte, U., Guo, G. and Ding, W.X. (2014) Suppression of autophagic flux by bile acids in hepatocytes. *Toxicological Sciences : an Official Journal of the Society of Toxicology*, **137**, 478-490.
529. Jiang, P., Nishimura, T., Sakamaki, Y., Itakura, E., Hatta, T., Natsume, T. and Mizushima, N. (2014) The HOPS complex mediates autophagosome-lysosome fusion through interaction with syntaxin 17. *Mol Biol Cell*, **25**, 1327-1337.
530. Lőrincz, P. and Juhász, G. (2020) Autophagosome-Lysosome Fusion. *J Mol Biol*, **432**, 2462-2482.
531. Manil-Ségalen, M., Lefebvre, C., Jenzer, C., Trichet, M., Boulogne, C., Satiat-Jeunemaitre, B. and Legouis, R. (2014) The *C. elegans* LC3 acts downstream of GABARAP to degrade autophagosomes by interacting with the HOPS subunit VPS39. *Developmental Cell*, **28**, 43-55.
532. Emadi, A., Jones, R.J. and Brodsky, R.A. (2009) Cyclophosphamide and cancer: golden anniversary. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, **6**, 638-647.
533. Culman, J., Blume, A., Gohlke, P. and Unger, T. (2002) The renin-angiotensin system in the brain: possible therapeutic implications for AT(1)-receptor blockers. *Journal of Human Hypertension*, **16 Suppl 3**, S64-70.

534. Duraes, F., Pinto, M. and Sousa, E. (2018) Old Drugs as New Treatments for Neurodegenerative Diseases. *Pharmaceuticals (Basel)*, **11**.
535. Awad, A. and Stüve, O. (2009) Cyclophosphamide in multiple sclerosis: scientific rationale, history and novel treatment paradigms. *Ther Adv Neurol Disord*, **2**, 50-61.
536. Aisen, P.S. (2002) The potential of anti-inflammatory drugs for the treatment of Alzheimer's disease. *Lancet Neurol*, **1**, 279-284.
537. Pukkila-Worley, R. and Ausubel, F.M. (2012) Immune defense mechanisms in the *Caenorhabditis elegans* intestinal epithelium. *Current Opinion in Immunology*, **24**, 3-9.
538. Kheiri, G., Dolatshahi, M., Rahmani, F. and Rezaei, N. (2018) Role of p38/MAPKs in Alzheimer's disease: implications for amyloid beta toxicity targeted therapy. *Reviews in the Neurosciences*, **30**, 9-30.
539. 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. *Nat Commun*, **6**, 7319.
540. He, J., Zhong, W., Zhang, M., Zhang, R. and Hu, W. (2018) P38 Mitogen-activated Protein Kinase and Parkinson's Disease. *Translational Neuroscience*, **9**, 147-153.
541. Tsirigotis, M., Baldwin, R.M., Tang, M.Y., Lorimer, I.A. and Gray, D.A. (2008) Activation of p38MAPK contributes to expanded polyglutamine-induced cytotoxicity. *PLoS One*, **3**, e2130.
542. Henry, R.J. (1943) THE MODE OF ACTION OF SULFONAMIDES. *Bacteriological Reviews*, **7**, 175-262.
543. Perreten, V. and Boerlin, P. (2003) A new sulfonamide resistance gene (sul3) in *Escherichia coli* is widespread in the pig population of Switzerland. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **47**, 1169-1172.
544. Granville, D.J., Tashakkor, B., Takeuchi, C., Gustafsson, A.B., Huang, C., Sayen, M.R., Wentworth, P., Jr., Yeager, M. and Gottlieb, R.A. (2004) Reduction of ischemia and reperfusion-induced myocardial damage by cytochrome P450 inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 1321-1326.
545. Wang, S., Zhang, S., Xu, C., Barron, A., Galiano, F., Patel, D., Lee, Y.J., Caldwell, G.A., Caldwell, K.A. and Witt, S.N. (2016) Chemical Compensation of Mitochondrial Phospholipid Depletion in Yeast and Animal Models of Parkinson's Disease. *PLoS One*, **11**, e0164465.
546. Daly, A.K., Rettie, A.E., Fowler, D.M. and Miners, J.O. (2017) Pharmacogenomics of CYP2C9: Functional and Clinical Considerations. *Journal of Personalized Medicine*, **8**.
547. Viswanathan, S., Hammock, B.D., Newman, J.W., Meerarani, P., Toborek, M. and Hennig, B. (2003) Involvement of CYP 2C9 in mediating the proinflammatory effects of

- linoleic acid in vascular endothelial cells. *Journal of the American College of Nutrition*, **22**, 502-510.
548. Ashrafi, K., Chang, F.Y., Watts, J.L., Fraser, A.G., Kamath, R.S., Ahringer, J. and Ruvkun, G. (2003) Genome-wide RNAi analysis of *Caenorhabditis elegans* fat regulatory genes. *Nature*, **421**, 268-272.
549. Menzel, R., Yeo, H.L., Rienau, S., Li, S., Steinberg, C.E. and Stürzenbaum, S.R. (2007) Cytochrome P450s and short-chain dehydrogenases mediate the toxicogenomic response of PCB52 in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J Mol Biol*, **370**, 1-13.
550. Aarnio, V., Lehtonen, M., Storvik, M., Callaway, J.C., Lakso, M. and Wong, G. (2011) *Caenorhabditis Elegans* Mutants Predict Regulation of Fatty Acids and Endocannabinoids by the CYP-35A Gene Family. *Frontiers in Pharmacology*, **2**, 12.
551. Thomas, J.H. (2007) Rapid birth-death evolution specific to xenobiotic cytochrome P450 genes in vertebrates. *PLoS Genet*, **3**, e67.
552. Fer, M., Dréano, Y., Lucas, D., Corcos, L., Salaün, J.P., Berthou, F. and Amet, Y. (2008) Metabolism of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids by recombinant human cytochromes P450. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **471**, 116-125.
553. Arnold, C., Konkol, A., Fischer, R. and Schunck, W.H. (2010) Cytochrome P450-dependent metabolism of omega-6 and omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids. *Pharmacological Reports : PR*, **62**, 536-547.
554. Solanki, M., Pointon, A., Jones, B. and Herbert, K. (2018) Cytochrome P450 2J2: Potential Role in Drug Metabolism and Cardiotoxicity. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, **46**, 1053-1065.
555. Huang, C., Liu, W., Perry, C.N., Yitzhaki, S., Lee, Y., Yuan, H., Tsukada, Y.T., Hamacher-Brady, A., Mentzer, R.M., Jr. and Gottlieb, R.A. (2010) Autophagy and protein kinase C are required for cardioprotection by sulfaphenazole. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **298**, H570-579.
556. Smith, C.E., Soti, S., Jones, T.A., Nakagawa, A., Xue, D. and Yin, H. (2017) Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs Are Caspase Inhibitors. *Cell Chem Biol*, **24**, 281-292.
557. Harry, G.J. and Kraft, A.D. (2008) Neuroinflammation and microglia: considerations and approaches for neurotoxicity assessment. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, **4**, 1265-1277.
558. Hirsch, E.C. and Hunot, S. (2009) Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? *Lancet Neurol*, **8**, 382-397.
559. Hofmann, K.W., Schuh, A.F., Saute, J., Townsend, R., Fricke, D., Leke, R., Souza, D.O., Portela, L.V., Chaves, M.L. and Rieder, C.R. (2009) Interleukin-6 serum levels in patients with Parkinson's disease. *Neurochem Res*, **34**, 1401-1404.
560. van der Burg, J.M., Bjorkqvist, M. and Brundin, P. (2009) Beyond the brain: widespread pathology in Huntington's disease. *Lancet Neurol*, **8**, 765-774.

561. Raposo, M., Bettencourt, C., Ramos, A., Kazachkova, N., Vasconcelos, J., Kay, T., Bruges-Armas, J. and Lima, M. (2017) Promoter Variation and Expression Levels of Inflammatory Genes IL1A, IL1B, IL6 and TNF in Blood of Spinocerebellar Ataxia Type 3 (SCA3) Patients. *Neuromolecular Med*, **19**, 41-45.
562. Calsolaro, V. and Edison, P. (2016) Neuroinflammation in Alzheimer's disease: Current evidence and future directions. *Alzheimers Dement*, **12**, 719-732.
563. McCauley, M.E. and Baloh, R.H. (2019) Inflammation in ALS/FTD pathogenesis. *Acta Neuropathol*, **137**, 715-730.
564. Costa, D., Moutinho, L., Lima, J.L. and Fernandes, E. (2006) Antioxidant activity and inhibition of human neutrophil oxidative burst mediated by arylpropionic acid non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Biol Pharm Bull*, **29**, 1659-1670.
565. Hendricks, G. and Mylonakis, E. (2017) Expanding the nematode model system: The molecular basis of inflammation and infection recovery in *C. elegans*. *Virulence*, **8**, 244-245.
566. Wagner, E.F. and Nebreda, A.R. (2009) Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nature Reviews. Cancer*, **9**, 537-549.
567. Postnikoff, S.D., Malo, M.E., Wong, B. and Harkness, T.A. (2012) The yeast forkhead transcription factors fkh1 and fkh2 regulate lifespan and stress response together with the anaphase-promoting complex. *PLoS Genet*, **8**, e1002583.
568. 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.
569. Pobre, K.F.R., Poet, G.J. and Hendershot, L.M. (2019) The endoplasmic reticulum (ER) chaperone BiP is a master regulator of ER functions: Getting by with a little help from ERdj friends. *J Biol Chem*, **294**, 2098-2108.
570. Brenner, S., Johnson, M., Bridgham, J., Golda, G., Lloyd, D.H., Johnson, D., Luo, S., McCurdy, S., Foy, M., Ewan, M. *et al.* (2000) Gene expression analysis by massively parallel signature sequencing (MPSS) on microbead arrays. *Nat Biotechnol*, **18**, 630-634.
571. Kanter, I. and Kalisky, T. (2015) Single cell transcriptomics: methods and applications. *Frontiers in Oncology*, **5**, 53.
572. Ostrow, A.Z., Nellimoottil, T., Knott, S.R., Fox, C.A., Tavaré, S. and Aparicio, O.M. (2014) Fkh1 and Fkh2 bind multiple chromosomal elements in the *S. cerevisiae* genome with distinct specificities and cell cycle dynamics. *PLoS One*, **9**, e87647.
573. Venters, B.J., Wachi, S., Mavrich, T.N., Andersen, B.E., Jena, P., Sinnamon, A.J., Jain, P., Roller, N.S., Jiang, C., Hemeryck-Walsh, C. *et al.* (2011) A comprehensive genomic binding map of gene and chromatin regulatory proteins in *Saccharomyces*. *Mol Cell*, **41**, 480-492.

574. MacIsaac, K.D., Wang, T., Gordon, D.B., Gifford, D.K., Stormo, G.D. and Fraenkel, E. (2006) An improved map of conserved regulatory sites for *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Bioinformatics*, **7**, 113.
575. Mondeel, T., Holland, P., Nielsen, J. and Barberis, M. (2019) ChIP-exo analysis highlights Fkh1 and Fkh2 transcription factors as hubs that integrate multi-scale networks in budding yeast. *Nucleic Acids Res*, **47**, 7825-7841.
576. Brady, O.A., Jeong, E., Martina, J.A., Pirooznia, M., Tunc, I. and Puertollano, R. (2018) The transcription factors TFE3 and TFEB amplify p53 dependent transcriptional programs in response to DNA damage. *Elife*, **7**.
577. Baldo, B., Weiss, A., Parker, C.N., Bibel, M., Paganetti, P. and Kaupmann, K. (2012) A screen for enhancers of clearance identifies huntingtin as a heat shock protein 90 (Hsp90) client protein. *J Biol Chem*, **287**, 1406-1414.
578. Voisine, C., Varma, H., Walker, N., Bates, E.A., Stockwell, B.R. and Hart, A.C. (2007) Identification of potential therapeutic drugs for huntington's disease using *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One*, **2**, e504.
579. Varma, H., Cheng, R., Voisine, C., Hart, A.C. and Stockwell, B.R. (2007) Inhibitors of metabolism rescue cell death in Huntington's disease models. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 14525-14530.
580. Piccioni, F., Roman, B.R., Fischbeck, K.H. and Taylor, J.P. (2004) A screen for drugs that protect against the cytotoxicity of polyglutamine-expanded androgen receptor. *Hum Mol Genet*, **13**, 437-446.
581. Lu, B., Al-Ramahi, I., Valencia, A., Wang, Q., Berenshteyn, F., Yang, H., Gallego-Flores, T., Ichcho, S., Lacoste, A., Hild, M. *et al.* (2013) Identification of NUB1 as a suppressor of mutant Huntington toxicity via enhanced protein clearance. *Nature Neuroscience*, **16**, 562-570.
582. Yu, S., Liang, Y., Palacino, J., DiFiglia, M. and Lu, B. (2014) Drugging unconventional targets: insights from Huntington's disease. *Trends in Pharmacological Sciences*, **35**, 53-62.
583. Doumanis, J., Wada, K., Kino, Y., Moore, A.W. and Nukina, N. (2009) RNAi screening in *Drosophila* cells identifies new modifiers of mutant huntingtin aggregation. *PLoS One*, **4**, e7275.
584. Nollen, E.A., Garcia, S.M., van Haften, G., Kim, S., Chavez, A., Morimoto, R.I. and Plasterk, R.H. (2004) Genome-wide RNA interference screen identifies previously undescribed regulators of polyglutamine aggregation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 6403-6408.
585. Lejeune, F.X., Mesrob, L., Parmentier, F., Bicep, C., Vazquez-Manrique, R.P., Parker, J.A., Vert, J.P., Tourette, C. and Neri, C. (2012) Large-scale functional RNAi screen in *C. elegans* identifies genes that regulate the dysfunction of mutant polyglutamine neurons. *BMC Genomics*, **13**, 91.

## **Annexe 1.**

### **Rescue of ATXN3 neuronal toxicity in *Caenorhabditis elegans* by chemical modification of endoplasmic reticulum stress**

**Fardghassemi Y, Tauffenberger A, Gosselin S, Parker JA. (2017).**  
*Disease Models and Mechanisms*, **10** (12), 1465-1480. doi: 10.1242/dmm.029736.

## RESEARCH ARTICLE

# Rescue of ATXN3 neuronal toxicity in *Caenorhabditis elegans* by chemical modification of endoplasmic reticulum stress

 Yasmin Fardghassemi<sup>1,2,\*</sup>, Arnaud Tauffenberger<sup>1,3,\*</sup>, Sarah Gosselin<sup>1,4</sup> and J. Alex Parker<sup>1,2,3,4,‡</sup>
**ABSTRACT**

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 causes 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 SCA is the type 3 (SCA3), also known as Machado–Joseph disease (MJD), which is 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. We generated transgenic *Caenorhabditis elegans* strains expressing human *ATXN3* genes in motoneurons, and animals expressing mutant *ATXN3-CAG89* alleles showed decreased lifespan, impaired movement, and rates of neurodegeneration greater than wild-type *ATXN3-CAG10* controls. We tested three neuroprotective compounds (Methylene Blue, guanabenz and salubrinal) believed to modulate ER stress and observed that these molecules rescued *ATXN3-CAG89* phenotypes. Furthermore, these compounds required specific branches of the ER unfolded protein response (UPR<sup>ER</sup>), reduced global ER and oxidative stress, and polyglutamine aggregation. We introduce new *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 UPR<sup>ER</sup> reduced neurodegeneration and warrants investigation in mammalian models of MJD.

**KEY WORDS:** Ataxin 3, *Caenorhabditis elegans*, Endoplasmic reticulum stress, Guanabenz, Polyglutamine

**INTRODUCTION**

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 (Gatchel and Zoghbi, 2005; Matos et al., 2011; Shao and Diamond, 2007; Xu et al., 2015). These diseases are characterized by

a selective loss of neurons along with physical and psychological complications (Matos et al., 2011). 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 (Shao and Diamond, 2007). However, the exact mechanism of disease pathogenesis is still not well understood. The poly-Q expansion diseases include several neurodegenerative disorders, such as Huntington's disease, dentatorubral–pallidoluysian atrophy, spinobulbar muscular atrophy and six forms of spinocerebellar ataxia (SCA) (Matos et al., 2011; Teixeira-Castro et al., 2015). SCAs are considered to be rare disorders, with a prevalence ranging from 0.3 to 2.0 per 100,000 (van de Warrenburg et al., 2002). SCA3 (spinocerebellar ataxia type 3), also known as Machado–Joseph disease (MJD), is considered to be the most common form of SCA worldwide (Schöls et al., 2004).

MJD is an autosomal dominant progressive neurological disorder characterized principally by ataxia, spasticity, peripheral neuropathy and ocular movement abnormalities (França et al., 2008). This disease is accompanied by neurodegeneration in selective regions, mainly in the cerebellum, basal ganglia, brainstem and spinal cord (Teixeira-Castro et al., 2011, 2015; Matos et al., 2011). Regarding brain function, it has been 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 (Soon et al., 1997; Wüllner et al., 2005; Yen et al., 2000; Riess et al., 2008; Rub et al., 2008). MJD, constituting the most prevalent subtype of SCA, is more frequently observed among people of Portuguese/Azorean ancestry, with the highest prevalence in the Azorean island of Flores (1/239; Bettencourt et al., 2008). The gene causatively associated with MJD is *ATXN3* (ataxin 3) and is located on chromosome 14 (14q24.3–14q32.45; Kawaguchi et al., 1994; Takiyama et al., 1994). This gene encodes a poly-Q-containing protein named ataxin 3 (Kawaguchi et al., 1994).

Ataxin 3 has 339 amino acid residues, with an estimated molecular weight of 42 kDa for normal individuals (Kawaguchi et al., 1994). Healthy individuals have between 10–51 CAG repeats, which is expanded to 55–87 repeats in the disease state (Maciel et al., 2001; Cummings and Zoghbi, 2000). Ataxin 3 has several functional domains, including 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 on the protein isoform, a third atypical UIM in the C-terminus tail (Goto et al., 1997; Li et al., 2015).

To aid the study of MJD, 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

<sup>1</sup>Centre de recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM) Montréal, Québec H2X 0A9, Canada. <sup>2</sup>Département de biochimie et médecine moléculaire, Université de Montréal, Montréal, Québec H3T 1J4, Canada.

<sup>3</sup>Département de pathologie et biologie cellulaire, Université de Montréal, Montréal, Québec H3T 1J4, Canada. <sup>4</sup>Département de neurosciences, Université de Montréal, Montréal, Québec H3T 1J4, Canada.

\*These authors contributed equally to this work

‡Author for correspondence (ja.parker@umontreal.ca)

© J.A.P., 0000-0002-3333-2445

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0>), which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium provided that the original work is properly attributed.

research because of its comprehensively detailed neuronal lineage and interconnectivity of synapses that resembles aspects of the vertebrate nervous system (Stiernagle, 2006). Additionally, the *C. elegans* genome contains an orthologue of *ATXN3*, named *atx-3*. The *C. elegans* orthologue of human ataxin 3 is localized in both the nucleus and the cytoplasm, with higher levels observed in the cytoplasm. It has been shown that loss of *atx-3* activity results in changes in the expression of genes involved in several different pathways: the ubiquitin–proteasome pathway, signal transduction and cell structure and motility (Rodrigues et al., 2007; Kawaguchi et al., 1994). Ataxin 3 has been identified as participating in the endoplasmic reticulum network (Matos et al., 2011; Echtermeyer et al., 2011; Reina et al., 2010). We previously showed that several compounds, including Methylene Blue, salubrinal and guanabenz, target the endoplasmic reticulum (ER) stress response and protect against proteotoxicity in simple models of amyotrophic lateral sclerosis (ALS; Vaccaro et al., 2013, 2012a) and have beneficial effects in models of the neurological disorder hereditary spastic paraplegia (Julien et al., 2016). 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 locomotor phenotypes, neuronal loss and the increased oxidative and ER stress observed in mutant transgenic animals as an early effort for MJD therapy development.

## RESULTS

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

Using Mos1-mediated single copy insertion (MoSci) transposon-mediated single copy insertion into the genome (Frokjaer-Jensen et al., 2014), we created 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, and in protein misfolding phenotypes in cell culture and *Drosophila* models (Stochmanski et al., 2012). Based on our previous neurodegeneration models (ALS models), we expressed human *ATXN3*, either wild-type *ATXN3-CAG10* (Fig. 1A) or mutant *ATXN3-CAG89* (Fig. 1B), in the worm's 26 GABAergic motoneurons using the promoter for the gene *unc-47*, which encodes a vesicular GABA transporter (Vaccaro et al., 2012a). In our experience, the *unc-47* modelling approach produces animals with strong phenotypes resulting from the expression of disease-associated proteins in a small number of neurons. Thus, in the context of chemical suppressor screens, relatively few neurons need to be exposed to small molecules to detect reversion of phenotypes.

We confirmed the expression of full-length human *ATXN3* in transgenic *C. elegans* strains by western blotting with a human specific anti-*ATXN3* antibody. A band corresponding to wild-type *ATXN3-CAG10* and 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 (Fig. 1C). *atx-3* encodes a deubiquitylating enzyme that is the highly conserved *C. elegans* orthologue of human *ATXN3* (Kawaguchi et al., 1994; Echtermeyer et al., 2011), thus it can be detected by western blotting with a human specific *ATXN3* antibody. To confirm this, we conducted western blotting experiments using the anti-*ATXN3* antibody and protein extracts from *atx-3* null mutants. *atx-3(tm1689)* is a loss-of-function mutation consisting of a 660 bp deletion along with a 6 bp insertion (*C. elegans* Deletion Mutant Consortium, 2012; Rodrigues et al., 2007), and no signal was observed. These data suggest that the anti-*ATXN3* antibody recognizes *C. elegans* *ATX-3* in N2 wild-type worms and partly obscures the signal for *ATXN3-CAG10*

transgenics, but a specific, higher molecular weight signal is visible in extracts from *ATXN3-CAG89* animals (Fig. 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 (Fig. 1D).

### Decreased lifespan and impaired neuronal phenotypes in mutant *ATXN3* transgenics

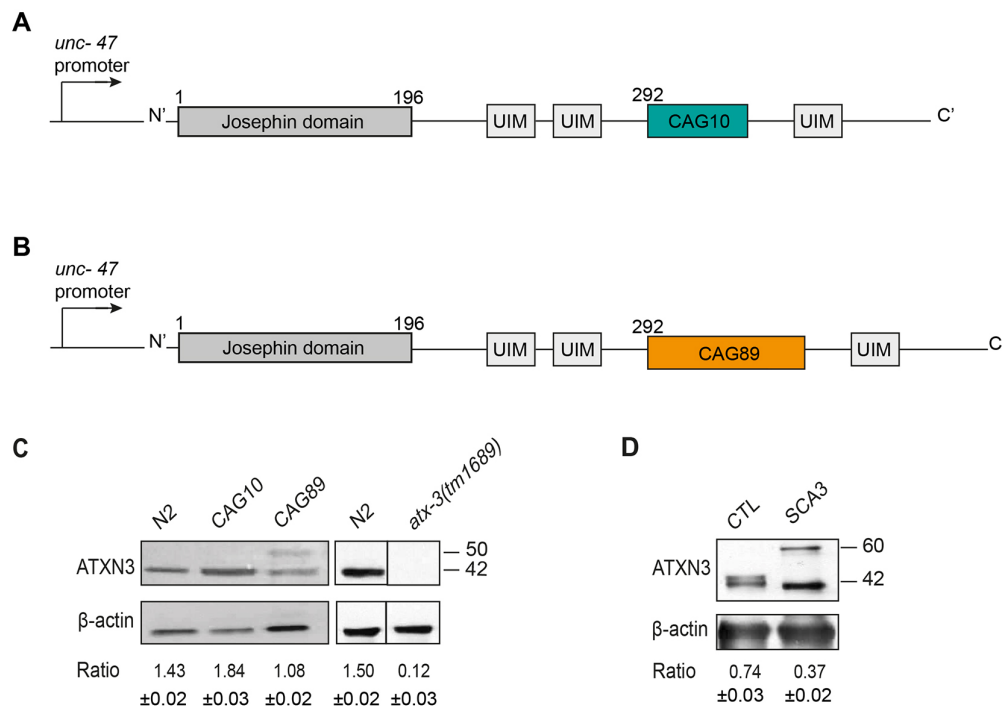
We wondered whether the expression of non-native proteins led to decreased health in the transgenic strains. Initially, we investigated whether lifespan was altered in our *ATXN3* transgenics. Using age-synchronized animals we observed that both *ATXN3-CAG10* and *ATXN3-CAG89* transgenics showed significantly decreased lifespan compared with non-transgenic wild-type N2 worms (Fig. 2A). These data demonstrate that increased expression of *ATXN3* transgenes has negative consequences on lifespan, but the mutant *ATXN3-CAG89* transgene had a more severe phenotype compared with *ATXN3-CAG10* controls.

Decreased lifespan can indicate poor health of the animals, and one sign of ageing in *C. elegans* is decreased motility that can be quantified using assays for progressive, age-dependent paralysis (Collins et al., 2008; Herndon et al., 2002). We observed that the age-synchronized *ATXN3-CAG89* transgenics displayed progressive motor defects compared with wild-type *ATXN3-CAG10* transgenics. Starting during adulthood, *ATXN3-CAG89* transgenics displayed uncoordinated motility phenotypes, progressing to paralysis over a period of 12 days, and occurred at a higher rate compared with *ATXN3-CAG10* controls (Fig. 2B).

The nematode *C. elegans* body wall muscle cells receive excitatory (acetylcholine) and inhibitory (GABA) inputs to coordinate muscle contraction and relaxation and to facilitate movement (McIntire et al., 1993). Activity of the neuromuscular junction can be measured indirectly with the acetylcholinesterase inhibitor aldicarb (Mahoney et al., 2006). It has been shown that treating worms with the known compound, aldicarb, results in accumulation of acetylcholine at neuromuscular junctions, leading to a number of different phenotypes: hyperactive cholinergic synapses, muscle hypercontraction and acute paralysis (Mahoney et al., 2006). Mutant strains having a defect in synaptic vesicle release demonstrate resistance for aldicarb. Resistance or hypersensitivity to aldicarb-induced paralysis has been used to identify genes that regulate acetylcholine secretion or inhibitory GABA signalling in different studies, including ours for ALS models (Loria et al., 2004; Vaccaro et al., 2012b). To investigate whether our transgenic *ATXN3* strains had abnormal activity at the neuromuscular junction, we exposed them and two control strains, *unc-64(e246)* (resistant to aldicarb, encodes syntaxin) and *unc-47(e307)* (hypersensitive to aldicarb), to aldicarb. Transgenic *ATXN3-CAG89* strains and *unc-47(e307)* mutants were hypersensitive to aldicarb-induced paralysis compared with *ATXN3-CAG10* transgenics, wild-type N2 worms, and *unc-64(e246)* mutants at days 1, 5 and 9 of adulthood (Fig. 2C). *ATXN3-CAG10* transgenics did show a hypersensitivity to aldicarb-induced paralysis, but this was less severe than what was observed for *ATXN3-CAG89* animals. These data suggest that the function of the GABAergic motoneurons, and perhaps their inhibitory signalling function, is impaired in mutant *ATXN3-CAG89* transgenics.

Additionally, we tracked the movement of wild-type N2 worms and both *ATXN3* transgenics for a period of 10 min on agar plates. We observed that *ATXN3-CAG89* worms had impaired motility phenotypes and explored less of their area compared with wild-type N2, and *ATXN3-CAG10* worms at days 1, 5 and 9 of adulthood (Fig. 2D). Overall, these data demonstrate that mutant





**Fig. 1. Transgenic *C. elegans* ATXN3 model.** (A) Full-length wild-type human ATXN3 containing 10 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. CAG10/CAG89, polyglutamine sequences; UIM, interaction domains with ubiquitin. (C) Total protein levels for N2, *atx-3(tm1689)* and transgenic worms expressing ATXN3-CAG10 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-CAG10 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, probably 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. For the ATXN3-CAG89 lane, the ratio of ATXN3 to actin was made using the top band. (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 the expression ratio  $\pm$ s.e.m. of ATXN3 to actin was determined from three independent experiments. Representative western blots are shown.

ATXN3-CAG89 transgenic worms have increased neuromuscular dysfunction that advances in a progressive manner, leading to increased rates of paralysis compared with controls.

#### Mutant ATXN3-CAG89 causes progressive motoneuron degeneration

Many neurodegenerative diseases are characterized by neuronal dysfunction before degeneration (Saxena and Caroni, 2011). To determine whether 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 motoneurons (Petrasch et al., 2013). We observed a significant increase of gaps and/or breaks in motoneurons of ATXN3-CAG89 worms when compared with the wild-type *unc-47p::mCherry* and ATXN3-CAG10 transgenics at days 5 and 9 of adulthood (Fig. 2E,F). We did not observe neurodegeneration in young adult day 1 mutant ATXN3-CAG89 transgenic worms (Fig. S1B). These observations suggest a gradual decline of neuronal function that is correlated with age-dependent neurodegeneration as observed in diseases such as MJD.

We investigated whether endogenous *atx-3* contributed to motility and neurodegeneration phenotypes in our ATXN3-CAG89 transgenics. We observed that the rates of paralysis and neurodegeneration of *atx-3(tm1689)*; ATXN3-CAG89 animals was

indistinguishable from ATXN3-CAG89 controls, suggesting that *atx-3* does not contribute to ATXN3-CAG89 phenotypes (Fig. S1).

As ATXN3 and mCherry are both expressed under the same promoter (*unc-47*), we wondered whether transcription factor depletion could contribute to the motility phenotypes observed in our ATXN3-CAG89 transgenics. To investigate, we turned to a worm tracking system (*Wmicrotracker*; Phylum Tech) able to measure both automatically and simultaneously the movement of a population of worms placed in 96-well microtitre plates over several hours (Veriepe et al., 2015; Vaccaro et al., 2012a; Therrien and Parker, 2014; Schmeisser et al., 2017). The apparatus makes use of two infrared light beams crossing each microtitre well from top to bottom, and a detector determines how often the light rays are interrupted by worms moving in the well. Each interruption counts as a movement registered by the machine (Schmeisser et al., 2017). We observed no difference in overall movement between ATXN3-CAG89 and *unc-47p::mCherry*; ATXN3-CAG89 worms (Fig. S2). These data suggest that the addition of the *unc-47p::mCherry* transgene to ATXN3-CAG89 transgenics does not influence motility phenotypes.

#### Methylene Blue, salubrinal and guanabenz suppress paralysis and extend lifespan in ATXN3-CAG89 transgenics without affecting the expression of this transgene

Our group previously identified several small molecules, including Methylene Blue, salubrinal and guanabenz, that target the ER stress

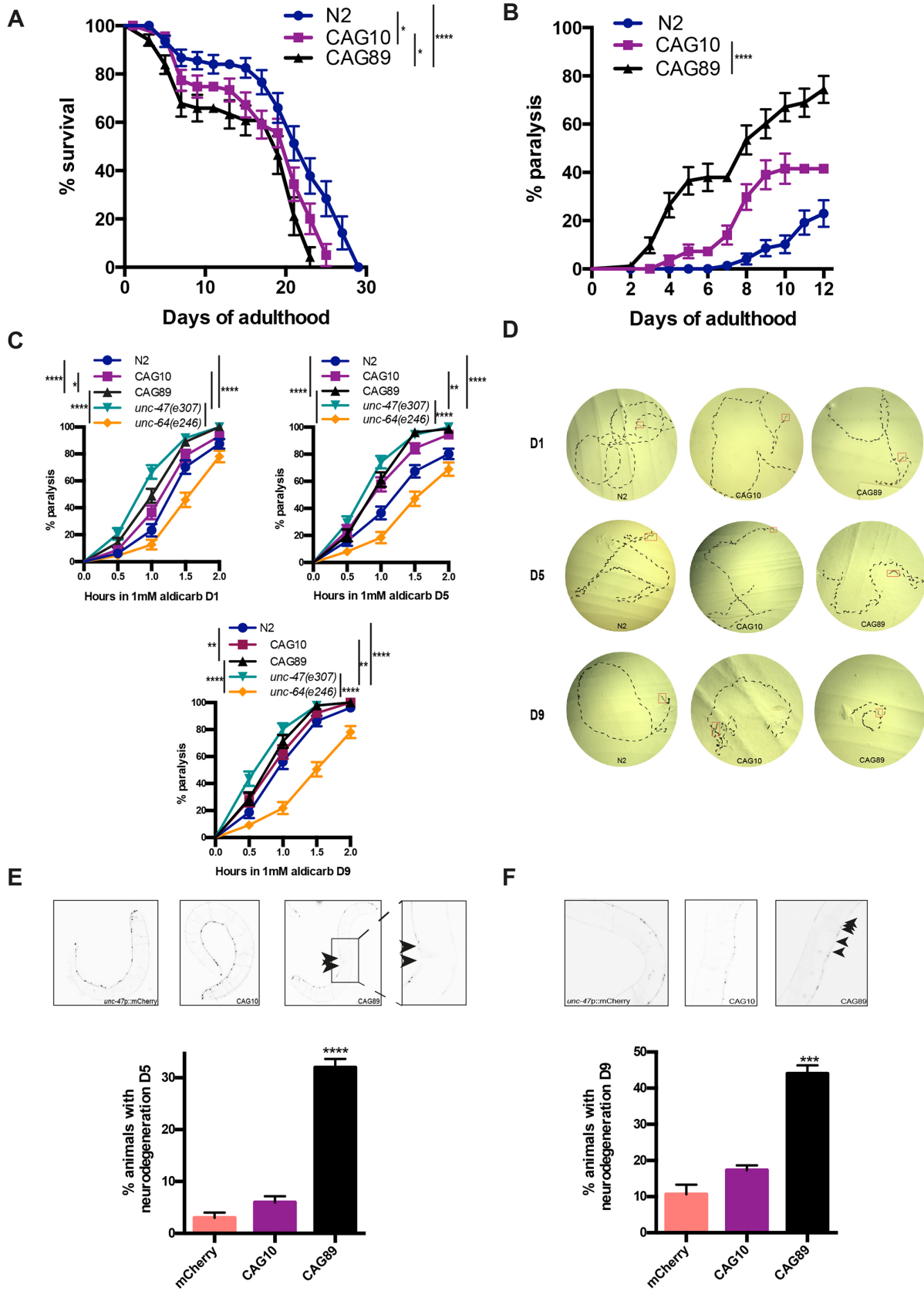


Fig. 2. See next page for legend.

**Fig. 2. Lifespan and neuronal phenotypes in *ATXN3* transgenics.**

(A) *ATXN3-CAG89* worms had reduced lifespan compared with wild-type *ATXN3-CAG10* or N2 worms [ $*P < 0.05$  and  $****P < 0.0001$ , respectively, by log-rank (Mantel–Cox) test;  $n = 300$ –360]. *ATXN3-CAG10* animals showed reduced lifespan compared with N2 wild-type worms [ $*P < 0.05$ , by log-rank (Mantel–Cox) test;  $n = 300$ –360]. The experiment was repeated three times. (B) *CAG89* transgenics had a significantly higher paralysis phenotype compared with wild-type *ATXN3-CAG10* transgenics [ $****P < 0.0001$ , by log-rank (Mantel–Cox) test;  $n = 270$ –300]. The experiment was repeated three times. (C) Cholinergic neuronal transmission was measured by determining the onset of paralysis induced by the cholinesterase inhibitor aldicarb. Adult day 1 *unc-47(e307)* and *ATXN3-CAG89* mutant strains showed a higher hypersensitive phenotype in the presence of the aldicarb-induced paralysis compared with wild-type N2, *ATXN3-CAG10* and *unc-64(e246)* worms [ $****P < 0.0001$  for *unc-47(e307)* mutant worms when compared with the controls, and  $****P < 0.0001$ ,  $*P < 0.05$  and  $****P < 0.0001$  for *ATXN3-CAG89* mutants compared with the controls, by log-rank (Mantel–Cox) test;  $n = 270$ –300]. Adult day 5 *unc-47(e307)* and *ATXN3-CAG89* worms also showed a higher hypersensitive phenotype in presence of the aldicarb-induced paralysis compared with wild-type N2, *ATXN3-CAG10* and *unc-64(e246)* worms [ $****P < 0.0001$ ,  $**P < 0.01$  and  $****P < 0.0001$  for *unc-47(e307)* mutants, respectively, compared with the controls, and  $****P < 0.0001$  for *ATXN3-CAG89* mutants when compared with wild-type N2 and *unc-64(e246)* worms, by log-rank (Mantel–Cox) test;  $n = 270$ –300]. A hypersensitive phenotype was observed at adult day 9 *unc-47(e307)* and *ATXN3-CAG89* mutant strains when compared with wild-type N2, *ATXN3-CAG10* and *unc-64(e246)* worms [ $****P < 0.0001$ ,  $**P < 0.01$  and  $****P < 0.0001$  for *unc-47(e307)* mutant worms when compared with the controls, respectively, and  $**P < 0.01$  and  $****P < 0.0001$  for *ATXN3-CAG89* mutants when compared with the wild-type N2 and *unc-64(e246)* worms, by log-rank (Mantel–Cox) test;  $n = 270$ –300]. The experiment was repeated three times. (D) Synchronized adult day 1, 5 and 9 worms were placed on NGM plates and photographed after 10 min of free movement. *ATXN3-CAG89* mutant worms showed defects in motility when compared with wild-type N2 and *ATXN3-CAG10* transgenic worms. (E,F) Representative photos of living, adult expressing wild-type *unc-47p::mCherry*, *unc-47p::mCherry*; *ATXN3-CAG10* and *unc-47p::mCherry*; *ATXN3-CAG89* transgenic worms at days 5 and 9 of adulthood. Images of the GABAergic motoneurons from entire *unc-47p::mCherry* and *unc-47p::mCherry*; *ATXN3-CAG10* worms were taken. Image of an entire *unc-47p::mCherry*; *ATXN3-CAG89* transgenic worm was taken and then zoomed in the panel on the right, representing a magnification of the area indicated. Increased incidences of gaps or breakages were observed in mutant *unc-47p::mCherry*; *ATXN3-CAG89* transgenics compared with wild-type *unc-47p::mCherry* and *unc-47p::mCherry*; *ATXN3-CAG10* controls. Quantification of neurodegeneration in transgenic worms at days 5 and 9 of adulthood. *ATXN3-CAG89* transgenics showed a significant increase of neurodegeneration compared with *unc-47p::mCherry* and *ATXN3-CAG10* controls ( $****P < 0.0001$  for day 5 of adulthood and  $***P < 0.001$  for adult day 9 worms, by Student's unpaired *t*-test;  $n = 100$  for each condition). These experiments were replicated three times.

response and were shown to have beneficial effects against mutant TDP-43 neuronal toxicity in models for ALS (Vaccaro et al., 2012a, 2013) and to have protective effects in models for hereditary spastic paraplegia (Julien et al., 2016). Thus, we wondered whether these compounds had neuroprotective activity against mutant *ATXN3-CAG89*. We tested these compounds and found that all three molecules suppressed the age-dependent paralysis phenotype caused by mutant *ATXN3-CAG89* (Fig. 3A–C), and extended the lifespan of these transgenic worms (Fig. 3D). Additionally, we wondered whether these compounds had any effect on the expression of *ATXN3-CAG89* transgenes, perhaps influencing paralysis and lifespan phenotypes. We confirmed that these compounds did not affect the expression of *ATXN3-CAG89* transgenes by western blotting with a human specific anti-*ATXN3* antibody (Fig. 3E).

To confirm the neuroprotective activity of these molecules with a separate approach, we turned to our automated assay measuring the movement of *C. elegans* grown in liquid culture (Veriepe et al.,

2015; Vaccaro et al., 2012a; Therrien and Parker, 2014). We observed that *ATXN3-CAG89* animals treated with Methylene Blue, salubrinal or guanabenz had increased motility compared with untreated controls (Fig. 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 whether these compounds had protective effects against motoneuron degeneration. Using the *unc-47p::mCherry*; *ATXN3-CAG89* strain, we visualized the GABAergic motoneurons *in vivo* in day 5 adults and observed a significant decrease of neurodegeneration for worms when treated with any of the three compounds (Fig. 5). These data demonstrate that chemical manipulation of ER stress mechanisms protects neurons against mutant *ATXN3* toxicity.

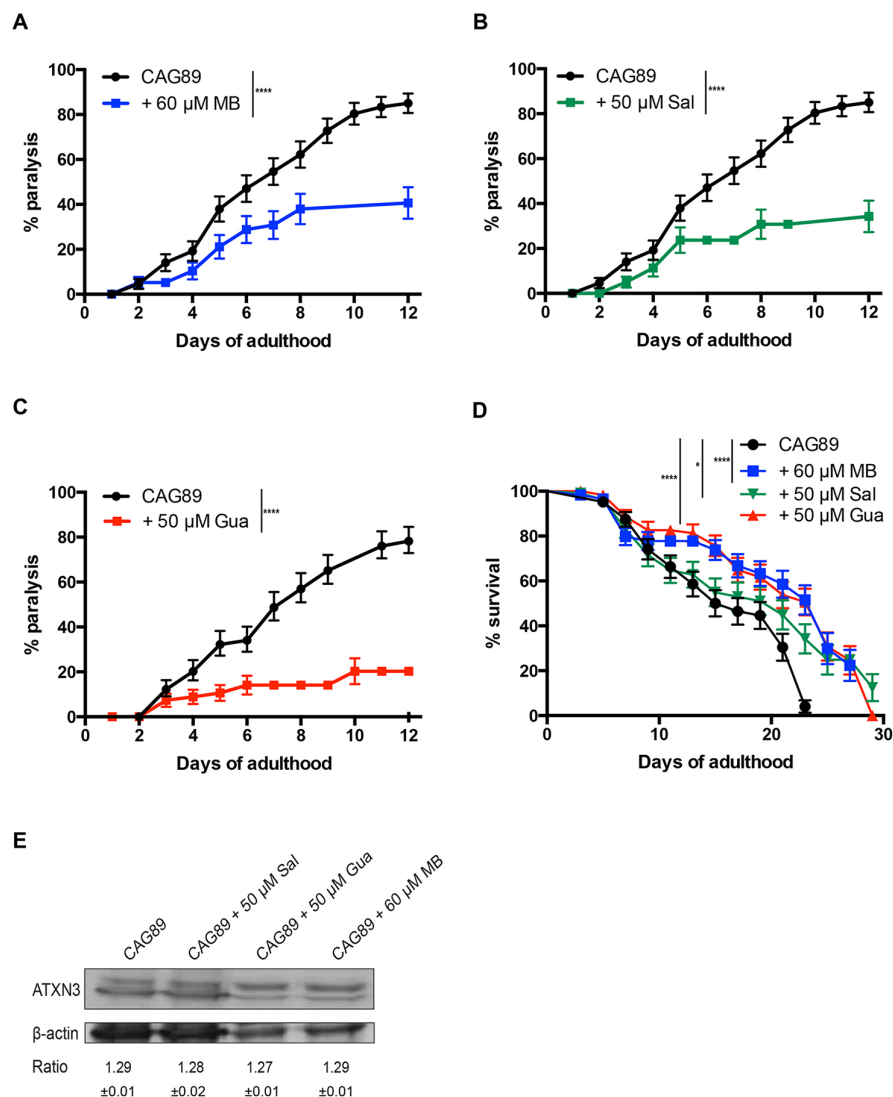
**Methylene Blue, salubrinal and guanabenz prevent the oxidative stress induced by *ATXN3-CAG89* transgenics**

We wondered whether one mechanism associated with mutant *ATXN3-CAG89* toxicity involved elevated levels of oxidative stress, as we have previously observed in other models of neuronal proteotoxicity (Vaccaro et al., 2013, 2012a). 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 with wild-type N2 controls and *ATXN3-CAG10* transgenics (Fig. 6A–C).

Our previous work suggests that oxidative stress might be linked with activation of the unfolded protein response in the ER (Julien et al., 2016; Vaccaro et al., 2013). 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 (Fig. 6D–G). These data suggest that the ER stress response might be involved in neuronal toxicity caused by mutant *ATXN3-CAG89*.

**Rescue of ER stress response by Methylene Blue, salubrinal and guanabenz in *ATXN3-CAG89* transgenic worms**

After observing high levels of oxidative stress in *ATXN3-CAG89* transgenics, we wanted to test directly for the involvement of the ER stress response. *hsp-4* encodes a widely expressed, protective Hsp70/BiP protein induced by ER stress that can be monitored with a transgenic, transcriptional *hsp-4::GFP* reporter that shows strong fluorescence in the intestine and spermatheca (Urano et al., 2002). We crossed the *ATXN3* transgenics with the *hsp-4::GFP* reporter and observed increased fluorescence in *ATXN3-CAG89*; *hsp-4::GFP* animals compared with *ATXN3-CAG10*; *hsp-4::GFP* or *hsp-4::GFP* controls (Fig. 7A, top panels). We recently showed that Methylene Blue, guanabenz and salubrinal rescue the ER stress response in multiple models for another neurological disorder, hereditary spastic paraplegias (Julien et al., 2016). Based 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 reduced fluorescence of the ER stress *hsp-4::GFP* reporter transgene in *ATXN3-CAG89* transgenics (Fig. 7A–D). A significant reduction of the ER stress was also observed in the *ATXN3-CAG10* transgenic worms when treated with



**Fig. 3. Methylene Blue, salubrinal or guanabenz suppresses paralysis during ageing and extends lifespan in *ATXN3-CAG89* worms without affecting the expression level of this transgene.**

(A-C) The motor defect phenotype observed in *ATXN3-CAG89* worms was significantly decreased in the presence of 60  $\mu$ M MB (\*\*\*\* $P$ <0.0001), 50  $\mu$ M Sal (\*\*\*\* $P$ <0.0001) or 50  $\mu$ M Gua (\*\*\*\* $P$ <0.0001) [by log-rank (Mantel-Cox) test;  $n$ =270-300]. This experiment was replicated three times. (D) *ATXN3-CAG89* worms showed an increase lifespan in the presence of 60  $\mu$ M MB (\*\*\*\* $P$ <0.0001), 50  $\mu$ M Sal (\* $P$ <0.05) or 50  $\mu$ M Gua (\*\*\*\* $P$ <0.0001) [by log-rank (Mantel-Cox) test;  $n$ =300-360]. This experiment was replicated three times. (E) Total protein levels for transgenic worms expressing mutant *ATXN3-CAG89* with and without exposure to Sal, Gua or MB. Antibody detection revealed signals for all four conditions. No differences in expression were observed between the untreated and treated transgenic worms. Actin staining was used as a loading control, and the expression ratio $\pm$ s.e.m. of *ATXN3* to actin was determined from three independent experiments. Representative western blots are shown. Gua, guanabenz; MB, Methylene Blue; Sal, salubrinal.

the compounds. This is consistent with the fact that *ATXN3-CAG10* transgenics have motility and lifespan phenotypes intermediate to N2 worms and *ATXN3-CAG89* transgenics. We observed a significant induction of the GFP signal in *hsp-4::GFP* worms when treated with Methylene Blue and salubrinal, suggesting that these molecules might act by stimulating an early ER stress response outcome that might be neuroprotective in the context of *ATXN3* transgenics, ultimately resulting in lower proteotoxicity followed by decreased ER stress overall. These data suggest that small molecule interventions centred on the ER stress response protect against mutant *ATXN3* toxicity.

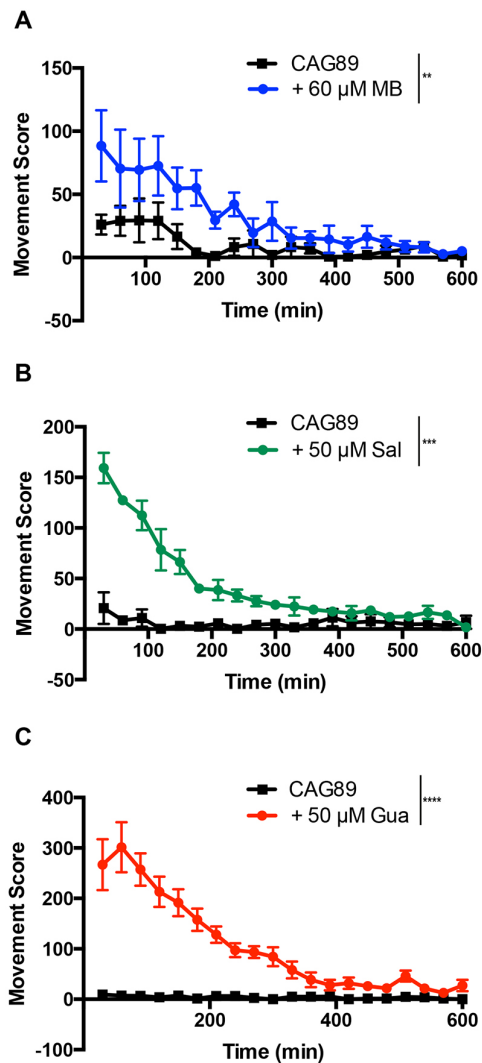
If stress within the ER persists, and it is not resolved by the early protective ER unfolded protein response (UPR<sup>ER</sup>) pathways, this can stimulate the clearance of misfolded proteins from the ER through ER-associated degradation (ERAD). The processing of misfolded proteins by ERAD is a redox-intensive process that requires the ER oxidoreductase *ero-1/ERO1*, the activity of which can result in the production of peroxides and, consequently, increased reactive oxygen species (Harding et al., 2003). Thus, impairing *ero-1/ERO1* activity disrupts the processing of proteins, along with the generation of peroxides and associated oxidative stress (Harding et al., 2003).

Therefore, we predicted that knockdown of *ero-1* by RNAi could reduce the amount of oxidative stress observed in our *ATXN3-CAG89* transgenic worms. We observed that *ATXN3-CAG89* mutant worms stained with DCF-DA in the presence of *ero-1*(RNAi) showed a significant decrease of fluorescence compared with the empty vector RNAi controls (Fig. 7E). These data suggest that the oxidative stress observed in our *ATXN3-CAG89* transgenic mutant worms might originate in the ER and is dependent on the activity of *ero-1*.

#### Chemical-genetic approach analysis for the UPR<sup>ER</sup> pathways

ER stress leads to activation of the UPR by three main signalling branches, resulting in an upregulation of chaperone proteins and a general arrest of protein translation (Walker and Atkin, 2011). Based on our data demonstrating an activation of ER stress in *ATXN3-CAG89* mutants, along with a reduction of this stress by UPR<sup>ER</sup>-associated compounds (Fig. 7), we wondered whether these compounds required any specific UPR<sup>ER</sup> branches for their neuroprotective activities. To identify the mechanisms related to each compound, we opted for a genetic approach using mutants against key components of two branches of the UPR<sup>ER</sup> pathways, such as *atf-6/ATF6*, *pek-1/PERK*, and RNAi for *ire-1/IRE1*.





**Fig. 4. Methylene Blue, salubrinal or guanabenz suppresses acute paralysis in *ATXN3-CAG89* transgenics.** The swimming activity of *ATXN3-CAG89* worms was scored for a period of 10 h, and treatment with (A) 60 μM MB (\*\* $P < 0.01$ ), (B) 50 μM Sal (\*\*\*)  $P < 0.001$ ) or (C) 50 μM Gua (\*\*\*\* $P < 0.0001$ ) (by Student's unpaired *t*-test) significantly rescued the impaired movement phenotype of *ATXN3-CAG89* worms. This experiment was done three times. Gua, guanabenz; MB, Methylene Blue; Sal, salubrinal.

We investigated the contribution of the *pek-1*/PERK pathway with the deletion mutant *pek-1(ok275)*. We observed that the rescuing activity of guanabenz was completely dependent on *pek-1*. Methylene Blue continued to suppress paralysis in the absence of *pek-1*, suggesting that this compound does not require the *pek-1*/PERK branch of the UPR<sup>ER</sup>. Concerning salubrinal, this compound was partly dependent on *pek-1*, because we observed a reduced ability to suppress paralysis in *ATXN3-CAG89; pek-1(ok275)* worms (Fig. 8A).

We examined the neuroprotective activity of *atf-6* using *atf-6(ok551)* mutant worms. We observed that *atf-6* was not required for the neuroprotective activity of Methylene Blue and salubrinal, because these compounds maintained their ability to suppress paralysis in *ATXN3-CAG89; atf-6(ok551)* mutants. However, we observed that guanabenz failed to suppress the paralysis in *ATXN3-CAG89*

mutants when crossed with *atf-6* loss-of-function mutants, confirming dependence on the *atf-6* branch of the UPR<sup>ER</sup> (Fig. 8B).

To investigate the role of *ire-1* in neuroprotection, we used RNAi against *ire-1(zc14)*. We observed that the rescuing activity of guanabenz was completely dependent on *ire-1*, and Methylene Blue showed a partial dependence on this branch of the UPR<sup>ER</sup>. However, salubrinal showed no dependence on this pathway, as this compound continued to suppress the paralysis in *ire-1*(RNAi) worms (Fig. 8C). These data suggest that the three chemical compounds use distinct, or possibly overlapping, branches of the UPR<sup>ER</sup> to achieve neuroprotection against CAG-mediated proteotoxicity.

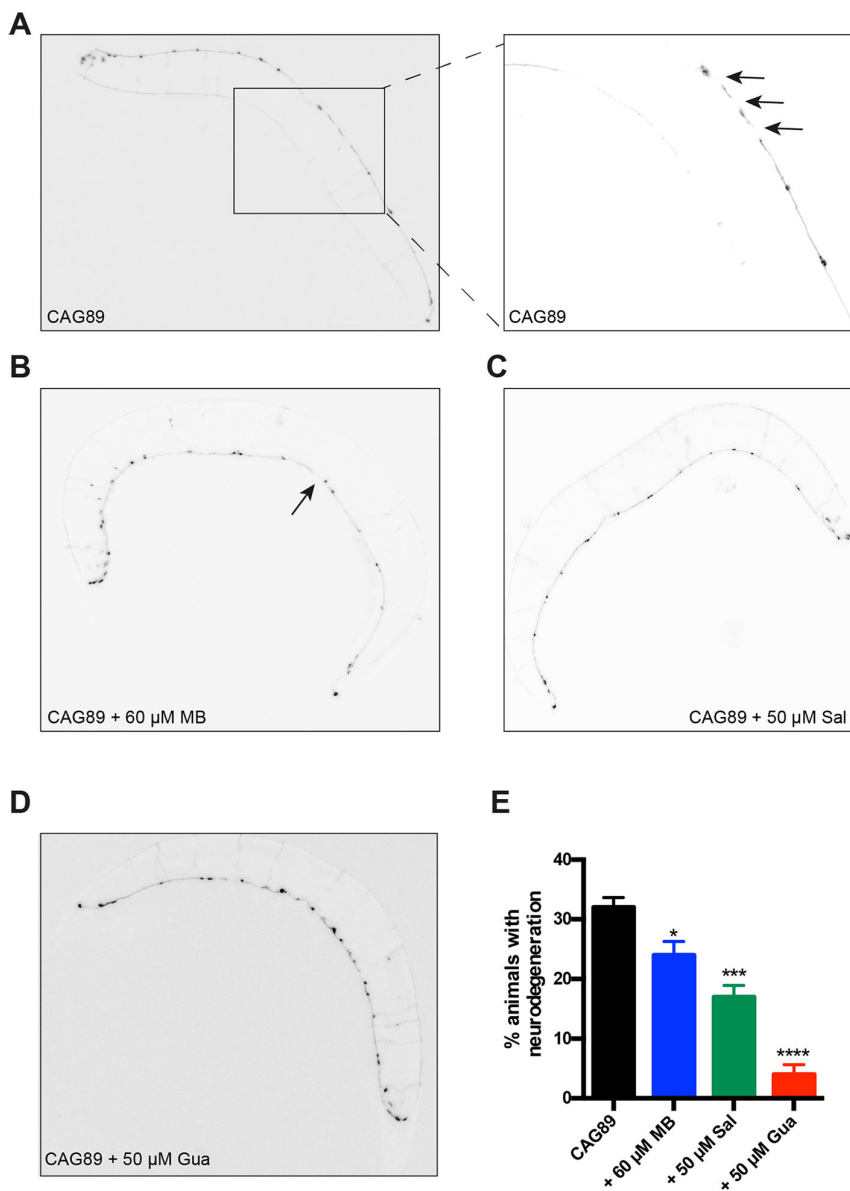
#### Small molecule suppression of *ATXN3-CAG89* aggregation

As *ATXN3* has been observed to form protein aggregates in several models, including *C. elegans*, we wondered whether our transgenics displayed similar aggregation phenotypes (Teixeira-Castro et al., 2015, 2011; Koch et al., 2011; Breuer et al., 2010). To determine whether *ATXN3* proteins could be detected *in vivo*, we fixed whole *ATXN3-CAG10* and *ATXN3-CAG89* transgenics and stained them with a human *ATXN3* antibody. We detected *ATXN3* protein in the motoneurons of *ATXN3* transgenics (Fig. 9A). Our cursory visual examination suggested a more intense puncta signal in *ATXN3-CAG89* transgenics that might reflect increased aggregation potential of *ATXN3-CAG89* protein compared with *ATXN3-CAG10*.

We investigated further using a biochemical assay to detect protein aggregation. Homogenized protein extracts from transgenic worms were separated into supernatant (detergent soluble) and pellet (detergent insoluble). Dot blotting the *ATXN3-CAG89* transgenic mutants with human *ATXN3* antibody showed a high accumulation of the *ATXN3-CAG89* in the pelleted, insoluble fraction, when compared with *ATXN3-CAG10* and N2 wild-type worms (Fig. 9B). We then investigated whether Methylene Blue, salubrinal and guanabenz were able to reduce the aggregation observed in our *ATXN3-CAG89* transgenics. We observed a significant decrease of aggregation in *ATXN3-CAG89* worms when treated with these three compounds, and noted that guanabenz was especially potent in reducing protein aggregation (Fig. 9B,C). These data suggest neuroprotective roles for Methylene Blue, salubrinal and guanabenz in reducing mutant *ATXN3* aggregation.

#### DISCUSSION

We introduce new *C. elegans* models for investigating mechanisms of motoneuron toxicity caused by a polyglutamine expansion in *ATXN3*. To model human disease, we expressed full-length human *ATXN3* without additional tags, because the inclusion of tags can mask or enhance the phenotypes of wild-type and mutant proteins (Catoire et al., 2008; Wang et al., 2009). We engineered strains expressing *ATXN3* in the animal's 26 GABAergic neurons, because impaired activity of these motoneurons can lead to easily identifiable motility phenotypes useful for screening purposes (McIntire et al., 1997, 1993). Additionally, MJD disease is in part associated with dysfunction of motoneurons (França et al., 2008; Kanai and Kuwabara, 2009; Pinto and De Carvalho, 2008; Rub et al., 2002). Furthermore, we have previously constructed neurodegeneration models based on the expression of human disease proteins in these same GABAergic motoneurons and found that the transgenic models provide robust phenotypes for experimentation, as we have previously demonstrated in our ALS models (Vaccaro et al., 2012a). Lastly, *C. elegans* has an *ATXN3* orthologue, *ATX-3*, that shares many cellular functions (Kawaguchi



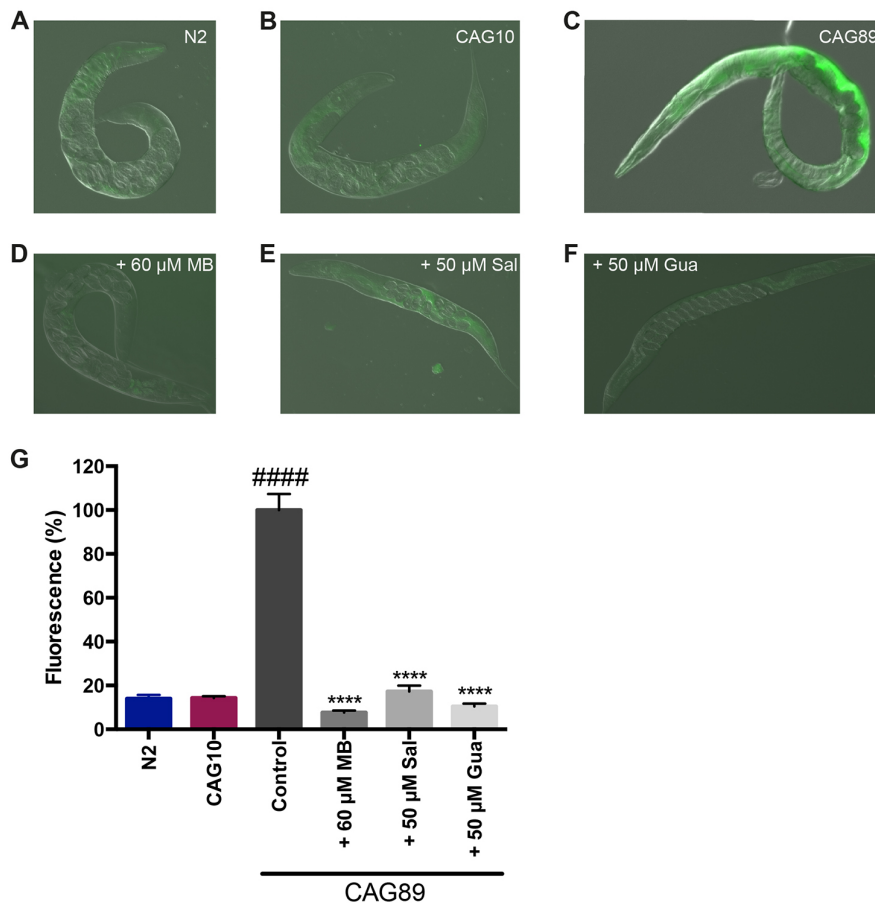
**Fig. 5. Rescue of motoneuron degeneration by small molecules in *ATXN3-CAG89* transgenics.**

Shown are representative photos of living, adult *unc-47p::mCherry*; *ATXN3-CAG89* transgenics at day 5 of adulthood with or without compounds. Images are black and white, photo-reversed to aid visualization of neurons. (A) Image of degenerating GABAergic motoneurons from an entire *ATXN3-CAG89* transgenic. The panel on the right is a magnification of the area indicated by the rectangle. Arrows indicate gaps or breaks along neuronal processes. Rescue of neurodegeneration was observed in *ATXN3-CAG89* worms in the presence of (B) 60  $\mu$ M MB, (C) 50  $\mu$ M Sal or (D) 50  $\mu$ M Gua. (E) Quantification of neurodegeneration in transgenic *ATXN3-CAG89* worms at day 5 of adulthood. Significant rescue of the neurodegeneration morphology was observed in *ATXN3-CAG89* transgenics when treated with 60  $\mu$ M MB (\* $P$ <0.05), 50  $\mu$ M Sal (\*\* $P$ <0.001) or 50  $\mu$ M Gua (\*\*\*\* $P$ <0.0001) (by Student's unpaired *t*-test,  $n$ =100 for each condition). These experiments were repeated three times. Gua, guanabenz; MB, Methylene Blue; Sal, salubrinal.

et al., 1994; Rodrigues et al., 2007; Piano et al., 2002), which perhaps extend to the nervous system, making the worm an appropriate model for studying conserved pathophysiological mechanisms of MJD.

*ATXN3-CAG89* transgenic worms showed a progressive age-dependent paralysis, and reduced lifespan phenotypes compared with wild-type *ATXN3-CAG10* transgenics. The fact that we observed a decrease of lifespan resulting from the expression of *ATXN3* transgenes in GABAergic motoneurons suggests that there might be some sort of communication from the nervous system to the rest of the organism that negatively modifies health. We and others have observed that cellular stress originating in specific neuronal populations can affect organism-wide stress mechanisms that in turn can affect lifespan (Veriepe et al., 2015; Vaccaro et al., 2012c; Taylor and Dillin, 2013; van Oosten-Hawle et al., 2013). Future studies will help to elucidate how the neuronal expression of *ATXN3* regulates lifespan.

Consistent with the reduced motility observed in *ATXN3-CAG89* transgenics, we also observed significant neurodegeneration in *ATXN3-CAG89* transgenics compared with *ATXN3-CAG10* controls. These data demonstrate that the *ATXN3-CAG89* transgenics produce phenotypes distinct from wild-type *ATXN3-CAG10* and that these mutant animals might be suitable for modifier screening. Our western blotting experiments (Fig. 1C) raise the possibility that the expression of *ATXN3-CAG89* could decrease the expression of the endogenous *C. elegans atx-3* gene, perhaps accounting for some of the negative phenotypes observed in *ATXN3-CAG89* transgenics. We think this is unlikely because the western blotting data show that the level of endogenous ATX-3 in non-transgenic N2 worms (ratio 1.43) is lower than that of *ATXN3-CAG10* controls (ratio 1.84), yet N2 worms do not have motility defects or paralysis phenotypes at a rate higher than the *ATXN3-CAG10* transgenics. Furthermore, as we suspect that the anti-*ATXN3* antibody detects ATX-3 and *ATXN3*, it is difficult to conclude



**Fig. 6. Reduction of oxidative stress in ATXN3-CAG89 transgenics by Methylene Blue, guanabenz or salubrinal.** Shown are representative photos of living, adult (A) wild-type N2 worms and (B) wild-type ATXN3-CAG10 and (C) mutant ATXN3-CAG89 transgenics at day 2 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 μM MB, (E) 50 μM Sal or (F) 50 μM Gua. (G) Quantification of fluorescence in N2 controls, ATXN3-CAG10 or ATXN3-CAG89 transgenics stained with DCF-DA. ATXN3-CAG89 transgenics showed increased fluorescence compared with N2 or ATXN3-CAG10 worms (####  $P < 0.0001$ ). ATXN3-CAG89 transgenics had less fluorescence when treated with 60 μM MB, 50 μM Sal or 50 μM Gua in the presence of DCF-DA compared with untreated CAG89 controls (\*\*\*\*  $P < 0.0001$ ) (Student's unpaired *t*-tests,  $n = 17-25$  for each condition). This experiment was repeated three times. Gua, guanabenz; MB, Methylene Blue; Sal, salubrinal.

definitively that the levels of endogenous ATXN3 are meaningfully different in the respective strains. Future investigations with more specific antibodies might help to resolve this issue.

Several transgenic *C. elegans* ATXN3 models have been reported, consisting of full-length or fragments of ATXN3, a variety of CAG repeat lengths, with the protein often fused to a fluorescent marker, and high copy expression in body wall muscle cells or the entire nervous system (Khan et al., 2006; Bonanomi et al., 2014; Teixeira-Castro et al., 2011; Christie et al., 2014). The novelty of our approach is that we have expressed full-length, untagged human ATXN3 at low levels based on MoSCi transposon-mediated single copy insertion where transgenics express only two copies of the ATXN3 transgene. Furthermore, these transgenics have been engineered to express wild-type or mutant ATXN3 in a subset of the worm's motoneurons, resulting in strong phenotypes from a small number of cells. We believe this approach will aid drug screening, where any particular compound might need to be active in only a small number of neurons to allow for detection of suppression. Furthermore, motoneuron degeneration has been associated with MJD (França et al., 2008; McIntire et al., 1993, 1997; Pinto and De Carvalho, 2008; Kanai and Kuwabara, 2009; Rub et al., 2002).

To explore the potential of our ATXN3 transgenics in chemical modifier screens, we tested whether we could suppress mutant ATXN3-CAG89 phenotypes with known neuroprotective compounds. Considering the evidence linking ATXN3 containing expanded CAG repeats to ER stress (Rodrigues et al., 2011; Evers

et al., 2014; Costa and Paulson, 2012; Matos et al., 2011; Reina et al., 2010), and our previous findings connecting ER stress to other neurodegenerative diseases (Vaccaro et al., 2012a, 2013; Julien et al., 2016), we investigated whether 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 (Matos et al., 2011; Rodrigues et al., 2011; Vaccaro et al., 2013, 2012a). Encouragingly, we observed that the three compounds rescued motility defects, reduced lifespan, neurodegeneration and aggregation in animals expressing mutant ATXN3-CAG89. Moreover, these three compounds were also able to prevent the oxidative stress and the ER stress response induced in ATXN3-CAG89 transgenics. Of the three compounds tested, we observed that guanabenz was the most effective at suppressing motility defects, neurodegeneration and protein aggregation phenotypes in ATXN3-CAG89 animals. Finally, we identified the branches of the UPR<sup>ER</sup> pathways essential for neuroprotection against mutant ATXN3. It is worth noting that mutations in individual UPR<sup>ER</sup> genes (*ire-1*, *pek-1* or *atf-6*) did not exacerbate ATXN3-CAG89 toxicity, suggesting that there might be redundancy between the pathways. This is consistent with the notion that the compounds tested activate the UPR<sup>ER</sup> pathway to reduce ATXN3-CAG89 toxicity. Thus, disabling individual genes blocks the activity of some molecules and not others, and helps to define the genetic requirements for neuroprotection by small molecules. However, we do predict that a triple mutant strain (*ire-1*, *pek-1* and *atf-6*) would

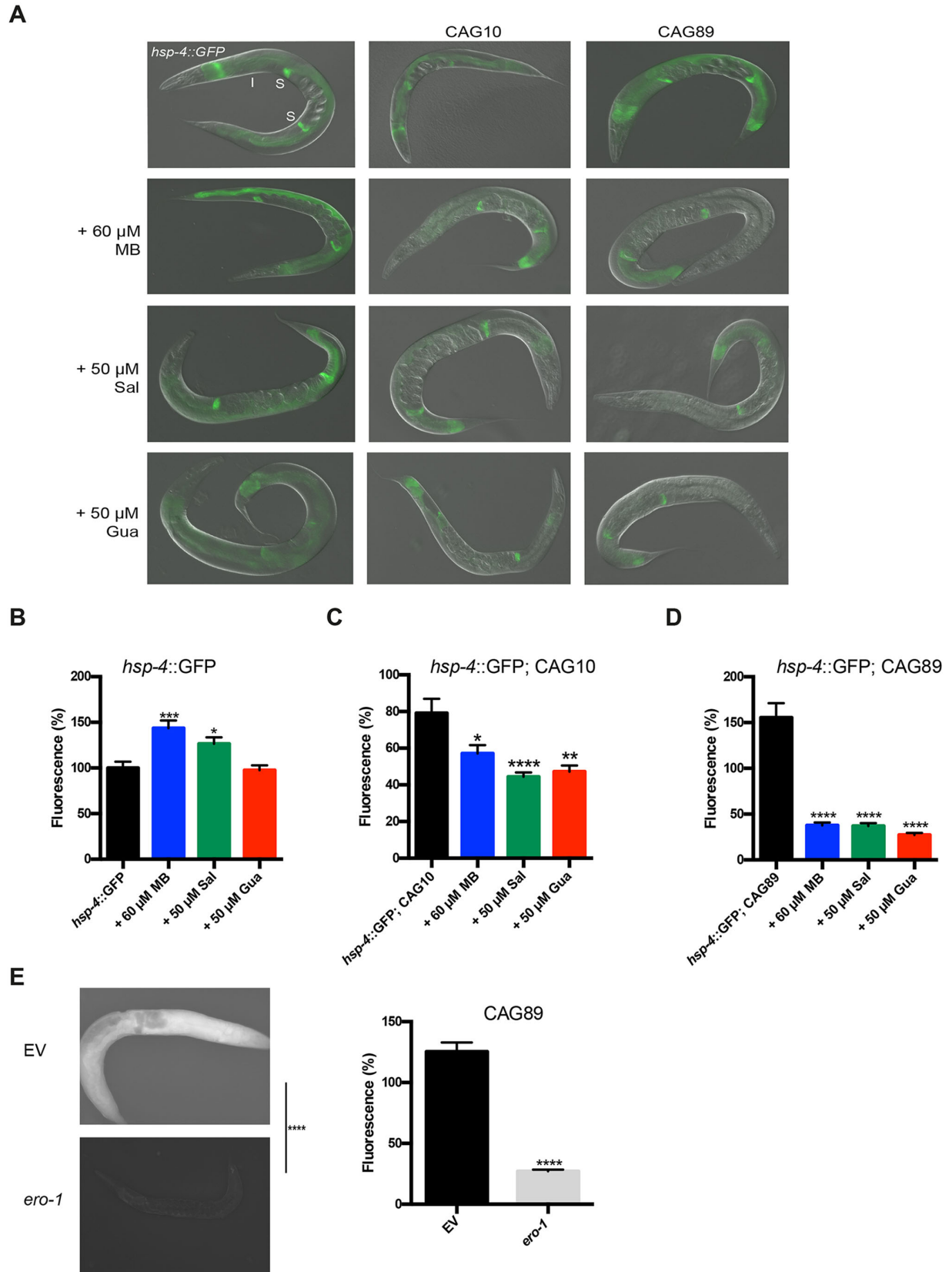


Fig. 7. See next page for legend.



**Fig. 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-CAG10* and *hsp-4::GFP*; *ATXN3-CAG89* transgenics at day 1 of adulthood. The *hsp-4::GFP*; *ATXN3-CAG89* transgenics show increased GFP expression compared with *hsp-4::GFP*, or *hsp-4::GFP*; *ATXN3-CAG10* controls (top panels). Treatment with 60  $\mu$ M MB, 50  $\mu$ M Sal or 50  $\mu$ M Gua reduces the fluorescence of *hsp-4::GFP*; *ATXN3-CAG89* to control levels. The *hsp-4::GFP* reporter shows increased fluorescence in the intestine (I) and spermatheca (S) of adult animals. (B-D) Quantification of fluorescence of transgenics with or without treatment with compounds. Increased fluorescence was observed in *hsp-4::GFP* worms when treated with 60  $\mu$ M MB ( $***P<0.001$ ) or 50  $\mu$ M Sal ( $*P<0.05$ ) (Student's unpaired *t*-tests,  $n=17-25$  for each condition). Fluorescence was decreased in *hsp-4::GFP*; *ATXN3-CAG10* transgenic worms when treated with 60  $\mu$ M MB ( $*P<0.05$ ), 50  $\mu$ M Sal ( $****P<0.0001$ ) or 50  $\mu$ M Gua ( $**P<0.01$ ) (Student's unpaired *t*-tests,  $n=17-25$  for each condition). However, the decreased fluorescence observed was even more significant in *hsp-4::GFP*; *ATXN3-CAG89* mutants when treated with 60  $\mu$ M MB, 50  $\mu$ M Sal or 50  $\mu$ M Gua ( $****P<0.0001$ ) (Student's unpaired *t*-tests,  $n=17-25$  for each condition). These experiments were replicated three times. (E) Shown are representative photos of living, adult day 2 *ATXN3-CAG89* transgenics fed with *E. coli* containing an empty vector (EV) or expressing dsRNA against *ero-1*. *ATXN3-CAG89* mutant worms showed a high level of fluorescence when stained with 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) and a significant decrease of this fluorescence when grown in the presence of *ero-1* RNAi. Quantification of fluorescence of *ATXN3-CAG89* mutant worms on EV or *ero-1* RNAi. A significant decrease of fluorescence of *ATXN3-CAG89* mutants was observed in the presence of *ero-1* RNAi when compared with EV ( $****P<0.0001$ ) (Student's unpaired *t*-tests,  $n=17-25$  for each condition). This experiment was repeated three times. Gua, guanabenz; MB, Methylene Blue; Sal, salubrinal.

enhance *ATXN3-CAG89* toxicity and block the rescuing activity of all molecules tested here.

Additional studies are required to extend these findings to mammalian models of MJD. However, from a practical perspective, given that guanabenz has US Food and Drug Administration approval and is being tested in a clinical trial for multiple sclerosis, it could be translated rapidly into clinical settings for MJD.

Future studies will make use of unbiased drug screen approaches to identify additional neuroprotective molecules. The novelty of this approach relies on rapidly identifying molecules that restore movement in *ATXN3-CAG89* transgenics, followed by systematic characterization of lifespan, neurodegeneration and aggregation phenotypes. Our *C. elegans* *ATXN3* strains might serve as the initial step of an *in vivo* drug discovery and development pipeline for MJD and other polyglutamine diseases.

## MATERIALS AND METHODS

### Nematode strains

Standard methods of culturing and handling worms were used (Stiernagle, 2006). Worms were maintained on standard nematode growth media (NGM) plates streaked with OP50 *Escherichia coli*. All strains were scored at 20°C. Strains used for this study were as follows: N2, *atx-3(tm1689)*, *unc-47(e307)*, *unc-64(e246)*, *zcls4[hsp-4::GFP]*, *atf-6(ok551)* and *pek-1(ok275)*; all obtained from the *C. elegans* Genetics Center (University of Minnesota, Minneapolis).

### Transgenic *ATXN3* worms and plasmid constructs

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, Johns Hopkins; Addgene plasmid 17253) and the destination vector pCFJ150 to create *unc-47p::mCherry*;

*ATXN3-CAG10* 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 behaviour, transgene expression levels and molecular profiles were outcrossed and kept for further analysis. The strains used in this study include the following: XQ350 *unc-119(ed3)*; ttTi5605mosII; *xqIs350(unc-47p::ATXN3-CAG10; unc-119(+))*, and XQ351 *unc-119(ed3)*; ttTi5605mosII; *xqIs351(unc-47p::ATXN3-CAG89; unc-119(+))*.

### Age-synchronized populations

To obtain an age-synchronized population of worms, ~8-10 adult hermaphrodites were placed on 10 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 (1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1 M NaCl and 1 M  $\text{MgSO}_4$ ) and centrifuged at 3,250 g (A-4-81 Rotor) for 4 min at 4°C. After centrifugation, 3 ml of the supernatant was taken and replaced with 3 ml of a mix solution containing NaOH 5 M and bleach (1:2). This was vortexed for 10 min with a high intensity to degrade the worms, leaving a pellet containing only eggs. The pellet was washed four times with M9 buffer and centrifuged at 3,250 g (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 next day, L1 worms were transferred using M9 buffer onto plates streaked with OP50 *E. coli* and kept at 20°C.

### Paralysis assays on solid media

Worms expressing *ATXN3-CAG10*, *ATXN3-CAG89*, *unc-47p::mCherry*; *ATXN3-CAG10* and *unc-47p::mCherry*; *ATXN3-CAG89* were scored for paralysis from adult day 1 to adult day 12. Briefly, 30-40 L4 worms (obtained via synchronization) were transferred onto NGM plates and from adult day 1 to adult day 12, 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 per 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 1 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 or extruded gonads or worms 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 per plate.

### Aldicarb tests

To evaluate synaptic transmission, synchronized worms were grown on NGM plates until adult day 1, 5 and 9. They were then transferred onto NGM plates plus 1 mM aldicarb. Paralysis was scored every 30 min for 2 h on aldicarb plates. Worms were counted as paralysed if they failed to move upon prodding with a worm pick. All experiments were conducted at 20°C. For each strain, the test was done in triplicates with 30 worms per plate in three independent replicates.

### Tracking the movement on solid media

Synchronized adult day 1, 5 and 9 worms were placed on NGM plates for 10 min. Their movement tracking was filmed and photographed using a 12MP Camera installed on a standard laboratory microscope.

### RNAi experiments

Synchronized L1 worms were transferred onto NGM plates enriched with 1 mM isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG). RNAi-treated *ATXN3-CAG89* worms were fed with *E. coli* containing an empty vector (EV) or expressing dsRNA against *ero-1* (Y105E8B.8) or *ire-1* (C41C4.4).

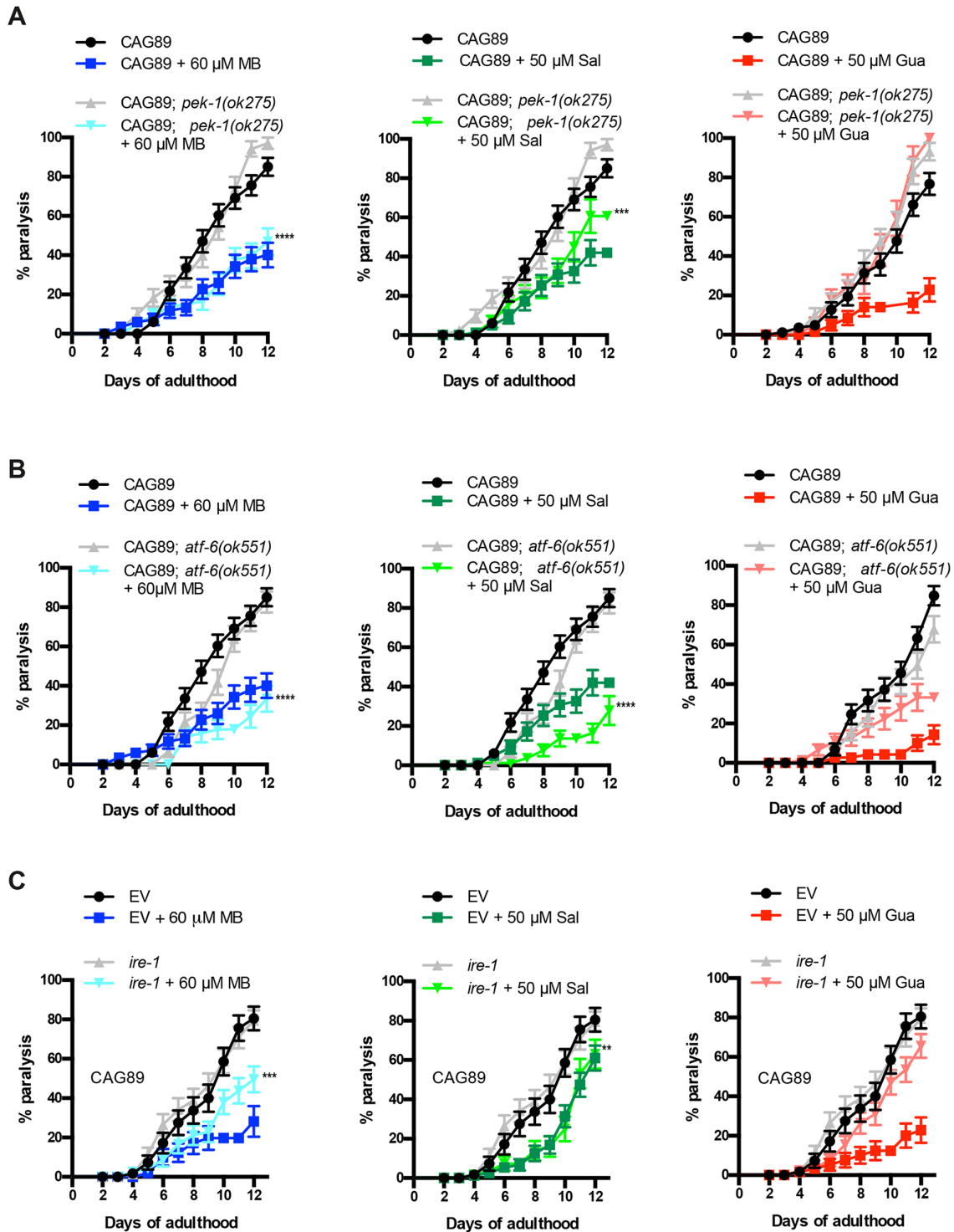


Fig. 8. See next page for legend.

The RNAi clone was obtained from the ORFeome RNAi library (Open Biosystems) and sequence verified. For *ero-1* experiments, age-synchronized worms at adult day 2 were incubated on a slide with 5  $\mu$ 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 1 $\times$  (10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and 140 mM NaCl, adjusted to pH to

7.4; adding ddH<sub>2</sub>O to 1000 ml). Worms were visualized by fluorescence microscopy under 488 nm wavelength excitation.

For *ire-1* experiments, worms were scored from adult day 1 to adult day 12 for paralysis assays. They were transferred to fresh plates every 2 days until the cessation of progeny production. Each condition was done in triplicates with 30-40 worms per plate. All experiments were conducted at 20°C.

**Fig. 8. Chemical-genetic approach analysis of UPR<sup>ER</sup> pathways in ATXN3-CAG89 mutants.** (A) Paralysis assays for *ATXN3-CAG89* and *ATXN3-CAG89; pek-1(ok275)* transgenic mutant worms in presence of 60  $\mu$ M MB, 50  $\mu$ M Sal and 50  $\mu$ M Gua. We observed that Gua failed to suppress the paralysis in *ATXN3-CAG89; pek-1(ok275)* worms, Sal partly suppressed paralysis ( $***P<0.001$ ) and MB suppressed paralysis in *ATXN3-CAG89; pek-1(ok275)* mutant worms ( $****P<0.0001$ ) [by log-rank (Mantel–Cox) test;  $n=270-300$ ]. This experiment was repeated three times. (B) *ATXN3-CAG89* and *ATXN3-CAG89; atf-6(ok551)* mutant worms were treated with 60  $\mu$ M MB, 50  $\mu$ M Sal and 50  $\mu$ M Gua. We observed that Sal and MB suppressed paralysis in *ATXN3-CAG89; atf-6(ok551)* mutant worms ( $****P<0.0001$  for both compounds), contrary to Gua, which is dependent on the *atf-6* branch of the UPR<sup>ER</sup> pathway, showing an incapacity to suppress the paralysis in the transgenic mutant worms [by log-rank (Mantel–Cox) test;  $n=270-300$ ]. This experiment was repeated three times. (C) Paralysis assays for *ire-1* RNAi *ATXN3-CAG89* worms treated with 60  $\mu$ M MB, 50  $\mu$ M Sal and 50  $\mu$ M Gua. We observed that Gua totally and MB partly ( $***P<0.001$ ) failed to suppress the paralysis in *ire-1* RNAi worms, contrary to Sal, which suppressed paralysis in *ire-1* RNAi worms ( $**P<0.01$ ) [by log-rank (Mantel–Cox) test;  $n=270-300$ ]. This experiment was repeated three times. Gua, guanabenz; MB, Methylene Blue; Sal, salubralin; UPR<sup>ER</sup>, ER unfolded protein response.

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

For scoring of neuronal processes for gaps or breakages, *unc-47::mCherry*; *ATXN3-CAG89*, *unc-47::mCherry*; *ATXN3-CAG10* and *unc-47::mCherry* were collected at adult day 5 for visualization of motoneuron processes *in vivo*. For visualization of the ER stress response, *hsp-4::GFP*, *hsp-4::GFP*; *ATXN3-CAG10* and *hsp-4::GFP*; *ATXN3-CAG89* worms were collected at adult day 1, and for DCF-DA experiments, wild-type N2 worms and *ATXN3* transgenic lines were collected at adult day 2. 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 visualized 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. One hundred worms were scored per condition for the neurodegeneration assays. Approximately 25 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/intensity of fluorescence). Student's unpaired *t*-test was used for statistical analysis.

### Compound testing on solid media

Worms were exposed from hatching (by synchronization) to 60  $\mu$ M Methylene Blue, 50  $\mu$ M salubralin or 50  $\mu$ M guanabenz incorporated into NGM solid medium, or to 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, USA) and Tocris Bioscience (Ellisville, MO, USA). Briefly, 30-40 worms were picked and plated on the corresponding NGM medium (30-40 worms per 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 a WMicroTracker machine (Phylum Tech) (Simonetta and Golombek, 2007). Briefly, worms were exposed until day 5 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  $\mu$ l of the drug with the appropriate concentration or M9 buffer used as control, and ~30 worms adult day 5 (obtained via synchronization). Each condition was done in triplicates, and the experiments were repeated at least three times. The swimming movements of the nematodes were tracked for 10 h.

### Reactive oxygen species measurements

The *in vivo* detection of reactive oxygen species in *C. elegans* has been described previously (Vaccaro et al., 2013, 2012a). Briefly, age-

synchronized worms at adult day 2 were incubated on a slide with 5  $\mu$ M DCF-DA (Sigma-Aldrich) for 30 min at room temperature and washed three times for 5-10 min with PBS 1 $\times$  (10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and 140 mM NaCl, with pH adjusted to 7.4; adding ddH<sub>2</sub>O to 1000 ml). Worms were visualized by fluorescence microscopy under a 488 nm wavelength excitation.

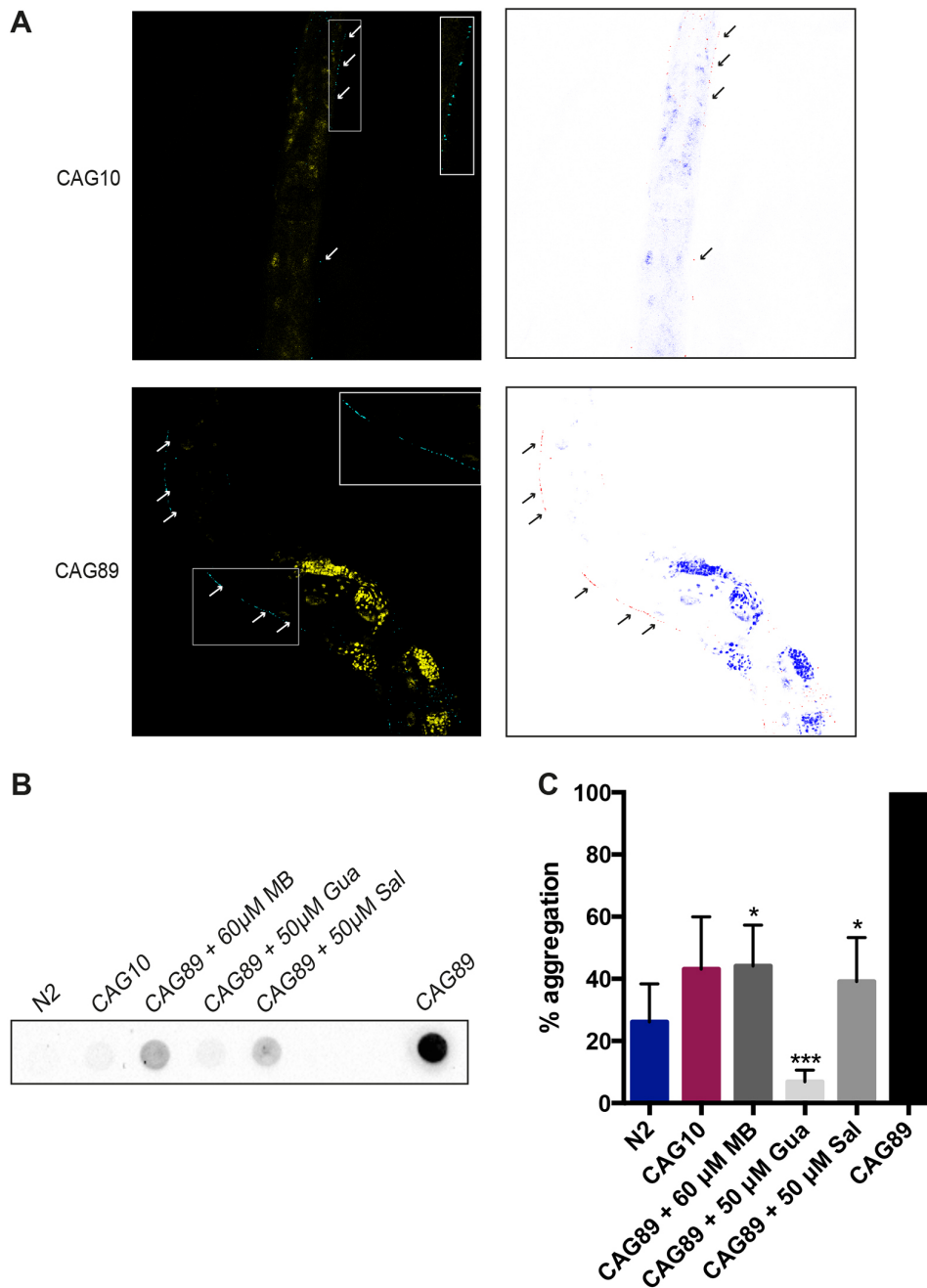
### Immunofluorescence (antibody staining for transgenic worms)

Five plates of worms for each strain were collected with M9, centrifuged at 3,250 *g* (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. The supernatants were discarded, and 500  $\mu$ l of cold methanol (stored at -20°C for 5 min) was added to the pellets and remained for 5 min at room temperature (fixation step). The supernatants were discarded, and the pellets were washed twice with PBS 1 $\times$  (10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and 140 mM NaCl, with pH adjusted to 7.4; adding ddH<sub>2</sub>O to 1000 ml) and centrifuged at 2,151 *g* (FA-45-30-11 Rotor) for 3 min at 23°C. The pellets were then blocked with 300  $\mu$ l donkey serum solution [0.05 mg/l BSA, 5% donkey serum (Sigma-Aldrich; cat. #: D9663; 10 ml), 0.2% Triton] for 30 min at room temperature. Worms were centrifuged at 2,151 *g* (FA-45-30-11 Rotor) for 3 min at 23°C and the supernatants discarded. Four hundred microlitres of the primary antibody rabbit anti-ATXN3 (1:200; Proteintech; cat. #: 13505-1) in the donkey serum solution was added to the pellets and stored at 4°C overnight. Worms were washed twice with PBS 1 $\times$  for 5 min and each time centrifuged at 2,151 *g* (FA-45-30-11; Rotor) for 1 min at 23°C to discard the supernatants. The supernatants were discarded, and 400  $\mu$ l of the secondary antibody donkey anti-rabbit IgG (H+L) Alexa Fluor 488 (1:250; Invitrogen; cat. #: A-21206) in PBS 1 $\times$  was added to the pellets and remained for 30 min at room temperature. Worms were washed with PBS 1 $\times$ , centrifuged at 2,151 *g* (FA-45-30-11 Rotor) for 1 min at room temperature and the supernatants discarded. Pellets were washed with 400  $\mu$ l of TOPRO-3 Iodide dye (1:300; Invitrogen; cat. #: T3605) in PBS 1 $\times$  for 5 min, centrifuged at 2,151 *g* (FA-45-30-11 Rotor) for 1 min at 23°C, then washed twice with PBS-T 1 $\times$  (add 1 ml of Tween to PBS 1 $\times$  stock) for 5 min at room temperature. Worms were mounted on slides with 20  $\mu$ l mounting solution (Invitrogen ProLong Antifade Kit; cat. #: P7481) and stored at 4°C overnight. Confocal images were acquired on a Leica TCS-SP5 inverted confocal microscope using an HCX PL APO CS 40 $\times$ /1.25 oil objective. Excitation system was performed using a 633 HeNe laser for TOPRO simultaneously with the 488 nm line of an argon laser for eGFP. Scan speed was 400 Hz. Detection bandwidth was 643-800 nm for TOPRO-3, and 498-551 nm for eGFP. The software used was LAS Image Analysis. Twenty-five to thirty worms were visualized per condition for the aggregation phenotype. Image processing was done with LAS Image Analysis and Adobe Photoshop.

### 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 origin. Cells were grown in IMDM (Gibco) supplemented with fetal bovine serum (10%), penicillin and streptomycin (100 units/ml) and L-glutamine (0.292 mg/ml). Collected cells were centrifuged at 98 *g* (FA-45-24-11 Rotor) for 2 min at 4°C. The supernatants were discarded and the pellets transferred into new Eppendorf tubes with 1 ml cold PBS 1 $\times$  (10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and 140 mM NaCl, with pH adjusted to 7.4; adding ddH<sub>2</sub>O to 1000 ml) and centrifuged at 98 *g* for 5 min at 4°C. This step was repeated three times. The medium 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 and 1% sodium deoxycholate) and 0.1% protease inhibitors (10 mg/ml leupeptin, 10 mg/ml pepstatin A and 10 mg/ml chymostatin LPC; 1/1000) depending on pellet size. The samples were put on ice for 10 min, then placed at room temperature for 10 min. The samples were then centrifuged at 142 *g* (FA-45-24-11 Rotor) for 15 min at 4°C. The pellets were discarded, and the supernatants were collected in 1.5 ml tubes and stored at -80°C.





**Fig. 9. Small molecule suppression of ATXN3-CAG89 aggregation.**

(A) Fixed whole *ATXN3-CAG10* and *ATXN3-CAG89* transgenic worms stained with a human ATXN3 antibody (blue) and TOPRO dye (yellow) for the nucleic acids. Arrows indicate ATXN3 protein in the motoneurons of *ATXN3* transgenics. Second panel is a colour-inverted image to aid visualization. The insets are magnifications of the aggregates indicated in the transgenic worms with a dashed line box. (B) Total protein levels for N2 and transgenic worms expressing *ATXN3-CAG10* or mutant *ATXN3-CAG89*. Antibody detection revealed high accumulation of the *ATXN3-CAG89* in the pelleted, insoluble fraction, when compared with *ATXN3-CAG10* and N2 wild-type worms. There was a reduction of aggregation in *ATXN3-CAG89* worms when treated with 60  $\mu$ M MB, 50  $\mu$ M Sal or 50  $\mu$ M Gua. Gua was especially potent in reducing protein aggregation. (C) Quantification of the intensity of the aggregation in transgenic *ATXN3-CAG89* mutants and wild-type N2 and *ATXN3-CAG10* worms. There was a significant increase of aggregation in *ATXN3-CAG89* when compared with the wild-type N2 and *ATXN3-CAG10* worms. After treatment with 60  $\mu$ M MB (\* $P$ <0.05), 50  $\mu$ M Sal (\* $P$ <0.05) or 50  $\mu$ M Gua (\*\* $P$ <0.001) (by ANOVA) *ATXN3-CAG89* showed a significant decrease in aggregation levels. Gua, guanabenz; MB, Methylene Blue; Sal, salubrinal.

#### Western blotting

Fifteen plates of worms for each strain and for each condition (with or without compounds) were collected with M9, centrifuged at 3,250  $g$  (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 and 1% sodium deoxycholate) and 0.1% protease inhibitors (10 mg/ml leupeptin, 10 mg/ml pepstatin A and 10 mg/ml chymostatin LPC; 1/1000). Pellets were passed through a 27.5-gauge syringe seven times, sonicated for 5 min, and centrifuged at 16,000  $g$  for 15 min at 4°C. Supernatants were collected in 1.5 ml tubes. The supernatants were quantified using the BCA protein assay kit (Thermo Scientific) following the manufacturer's 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 as follows: rabbit anti-ATXN3 (1:500; Proteintech; cat. #: 13505-1) and mouse anti-Actin (1:2500; MP Biomedical; cat. #: 691001). Blots were visualized using peroxidase-conjugated secondary antibodies and ECL western blotting substrate (Thermo Scientific). N2 wild-type worms and *atx-3(m1689)* were used as controls. The ladder used was Precision Plus Protein Kaleidoscope (BioRad). Densitometry was performed with Adobe Photoshop.

#### Protein solubility

Fifteen plates of worms for each strain and for each condition (*ATXN3-CAG89* worms treated with each compound) were collected with M9, centrifuged at 3,250  $g$  (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  $-80^{\circ}\text{C}$  overnight. To obtain soluble and insoluble fractions for our transgenics, worms were lysed in extraction buffer (1 M Tris-HCl pH 8, 0.5 M EDTA, 1 M NaCl and 10% SDS) plus protease inhibitors (10 mg/ml leupeptin, 10 mg/ml pepstatin A and 10 mg/ml chymostatin LPC; 1/1000). Pellets were passed through a 27.5-gauge syringe 10 times, sonicated for 5 min, and centrifuged at 16,000 g for 15 min at  $4^{\circ}\text{C}$ . The soluble supernatants were collected in 1.5 ml tubes and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . The remaining pellets were resuspended in extraction buffer, sonicated and centrifuged at 10,000 g for 5 min. The supernatants were discarded and the remaining pellets resuspended in 100  $\mu\text{l}$  of RIPA buffer and sonicated for  $\sim 90$  min until the pellets were resuspended in solution. The pellets were collected and stored in 1.5 ml tubes at  $-80^{\circ}\text{C}$ . The supernatants and pellets were quantified using the BCA protein assay kit (Thermo Scientific) following the manufacturer's protocol and instructions.

### Dot blotting

Dot blotting was done using the Bio-Dot SF microfiltration apparatus (cat. #: 170-6542). The assays were done using the manufacturer's protocol and instructions following the section Protein Slot Blotting-Immunoassays procedure and followed immunoblotting procedures. The antibody used was rabbit anti-ATXN3 (1:500; Proteintech; cat. #: 13505-1). Blots were visualized using peroxidase-conjugated secondary antibodies and ECL western blotting substrate (Thermo Scientific) via the Bio Rad ChemiDoc MP Imaging System (model #: Universal HOOD III). N2 wild-type worms and *ATXN3-CAG10* were used as controls. Quantification was performed with Image Lab software.

### Statistics

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

### Acknowledgements

Some worm strains were provided by the Caenorhabditis Genetics Center 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 (Johns Hopkins; Addgene plasmid 17253) for the *unc-54* 3' UTR plasmid pCM5.37. Special thanks to the cell imaging core facility of CRCHUM for confocal microscopy. Special thanks to Alexandre Desjardins (research assistant) in Dr Nicole Leclerc's laboratory for his help concerning the dot blotting assays. A very special thanks to a few members of our laboratory for their presence, help and technical assistance: C. Bretonneau, S. Oré Rodriguez, J. Vérièpe and S. Peyrard.

### Competing interests

The authors declare no competing or financial interests.

### Author contributions

Conceptualization: J.A.P.; Methodology: Y.F., A.T., S.G., J.A.P.; Validation: Y.F.; Formal analysis: Y.F.; Investigation: Y.F.; Resources: Y.F.; Writing - original draft: Y.F., J.A.P.; Writing - review & editing: Y.F., J.A.P.; Visualization: Y.F., J.A.P.; Supervision: J.A.P.; Project administration: Y.F.; Funding acquisition: J.A.P.

### Funding

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

### Supplementary information

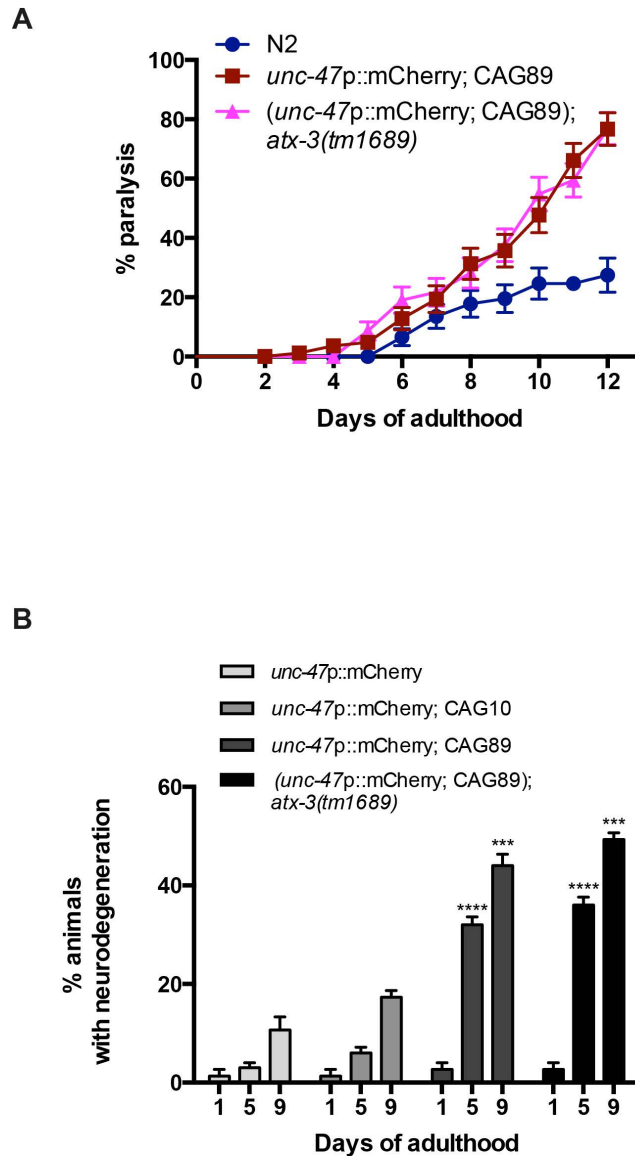
Supplementary information available online at <http://dmm.biologists.org/lookup/doi/10.1242/dmm.029736.supplemental>

### References

Bettencourt, C., Santos, C., Kay, T., Vasconcelos, J. and Lima, M. (2008). Analysis of segregation patterns in Machado-Joseph disease pedigrees. *J. Hum. Genet.* **53**, 920-923.

- Bonanomi, M., Natalello, A., Visentin, C., Pastori, V., Penco, A., Cornelli, G., Colombo, G., Malabarba, M. G., Doglia, S. M., Relini, A. et al. (2014). Epigallocatechin-3-gallate and tetracycline differently affect ataxin-3 fibrillogenesis and reduce toxicity in spinocerebellar ataxia type 3 model. *Hum. Mol. Genet.* **23**, 6542-6552.
- Breuer, P., Haacke, A., Evert, B. O. and Wüllner, U. (2010). Nuclear aggregation of polyglutamine-expanded ataxin-3: fragments escape the cytoplasmic quality control. *J. Biol. Chem.* **285**, 6532-6537.
- C. elegans Deletion Mutant Consortium. (2012). large-scale screening for targeted knockouts in the *Caenorhabditis elegans* genome. *G3 (Bethesda)*. **2**, 1415-1425.
- Catoire, H., Pasco, M. Y., Abu-Baker, A., Holbert, S., Tourette, C., Brais, B., Rouleau, G. A., Parker, J. A. and Néri, C. (2008). Sirtuin inhibition protects from the polyalanine muscular dystrophy protein PABPN1. *Hum. Mol. Genet.* **17**, 2108-2117.
- Christie, N. T. M., Lee, A. L., Fay, H. G., Gray, A. A. and Kikis, E. A. (2014). Novel polyglutamine model uncouples proteotoxicity from aging. *PLoS ONE* **9**, e96835.
- Collins, J. J., Huang, C., Hughes, S. and Kornfeld, K. (2008). The measurement and analysis of age-related changes in *Caenorhabditis elegans*. *WormBook*, 1-21.
- Costa, M. C. and Paulson, H. L. (2012). Toward understanding Machado-Joseph disease. *Prog. Neurobiol.* **97**, 239-257.
- Cummings, C. J. and Zoghbi, H. Y. (2000). Fourteen and counting: unraveling trinucleotide repeat diseases. *Hum. Mol. Genet.* **9**, 909-916.
- Echtermeyer, C., da Fontoura Costa, L., Rodrigues, F. A. and Kaiser, M. (2011). Automatic network fingerprinting through single-node motifs. *PLoS ONE* **6**, e15765.
- 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. *Mol. Neurobiol.* **49**, 1513-1531.
- França, M. C., Jr, D'Abreu, A., Nucci, A. and Lopes-Cendes, I. (2008). Muscle excitability abnormalities in Machado-Joseph disease. *Arch. Neurol.* **65**, 525-529.
- Frokjaer-Jensen, C., Davis, M. W., Sarov, M., Taylor, J., Flibotte, S., LaBella, M., Pozniakovskiy, A., Moerman, D. G. and Jorgensen, E. M. (2014). Random and targeted transgene insertion in *Caenorhabditis elegans* using a modified Mos1 transposon. *Nat. Methods* **11**, 529-534.
- Gatchel, J. R. and Zoghbi, H. Y. (2005). Diseases of unstable repeat expansion: mechanisms and common principles. *Nat. Rev. Genet.* **6**, 743-755.
- 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. *Neurosci. Res.* **28**, 373-377.
- Harding, H. P., Zhang, Y., Zeng, H., Novoa, I., Lu, P. D., Calfon, M., Sadri, N., Yun, C., Popko, B., Paules, R. et al. (2003). An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol. Cell* **11**, 619-633.
- 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.
- 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. *Hum. Mol. Genet.* **25**, 1088-1099.
- Kanai, K. and Kuwabara, S. (2009). Motor nerve hyperexcitability and muscle cramps in Machado-Joseph disease. *Arch. Neurol.* **66**, 139; author reply 139-140.
- 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. *Nat. Genet.* **8**, 221-228.
- Khan, L. A., Bauer, P. O., Miyazaki, H., Lindenberg, K. S., Landwehrmeyer, B. G. and Nukina, N. (2006). Expanded polyglutamines impair synaptic transmission and ubiquitin-proteasome system in *Caenorhabditis elegans*. *J. Neurochem.* **98**, 576-587.
- 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.
- 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. *Prog. Neurobiol.* **132**, 34-58.
- Loria, P. M., Hodgkin, J. and Hobert, O. (2004). A conserved postsynaptic transmembrane protein affecting neuromuscular signaling in *Caenorhabditis elegans*. *J. Neurosci.* **24**, 2191-2201.
- 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. *Arch. Neurol.* **58**, 1821-1827.
- Mahoney, T. R., Luo, S. and Nonet, M. L. (2006). Analysis of synaptic transmission in *Caenorhabditis elegans* using an aldicarb-sensitivity assay. *Nat. Protoc.* **1**, 1772-1777.

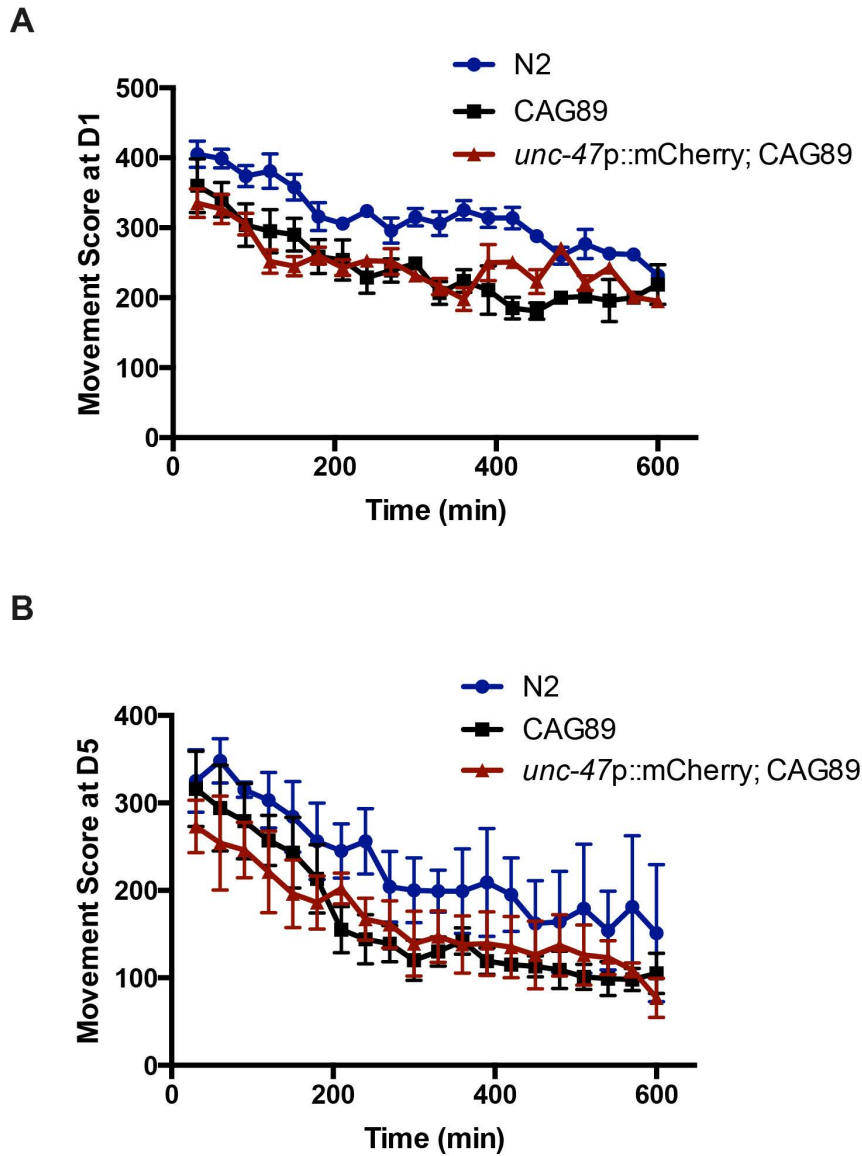
- Matos, C. A., de Macedo-Ribeiro, S. and Carvalho, A. L. (2011). Polyglutamine diseases: the special case of ataxin-3 and Machado-Joseph disease. *Prog. Neurobiol.* **95**, 26-48.
- McIntire, S. L., Jorgensen, E., Kaplan, J. and Horvitz, H. R. (1993). The GABAergic nervous system of *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **364**, 337-341.
- 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.
- 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*. *J. Neurosci.* **33**, 5524-5532.
- Piano, F., Schetter, A. J., Morton, D. G., Gunsalus, K. C., Reinke, V., Kim, S. K. and Kempheus, K. J. (2002). Gene clustering based on RNAi phenotypes of ovary-enriched genes in *C. elegans*. *Curr. Biol.* **12**, 1959-1964.
- Pinto, S. and De Carvalho, M. (2008). Machado-Joseph disease presenting as motor neuron disease. *Amyotroph. Lateral. Scler.* **9**, 188-191.
- Reina, C. P., Zhong, X. and Pittman, R. N. (2010). Proteotoxic stress increases nuclear localization of ataxin-3. *Hum. Mol. Genet.* **19**, 235-249.
- Riess, O., Rüb, U., Pastore, A., Bauer, P. and Schöls, L. (2008). SCA3: neurological features, pathogenesis and animal models. *Cerebellum* **7**, 125-137.
- 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 J.* **21**, 1126-1136.
- 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.
- Rub, U., de Vos, R. A. I., 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* **125**, 2115-2124.
- Rub, U., Brunt, E. R. and Deller, T. (2008). New insights into the pathoanatomy of spinocerebellar ataxia type 3 (Machado-Joseph disease). *Curr. Opin. Neurol.* **21**, 111-116.
- Saxena, S. and Caroni, P. (2011). Selective neuronal vulnerability in neurodegenerative diseases: from stressor thresholds to degeneration. *Neuron* **71**, 35-48.
- Schmeisser, K., Fardghassemi, Y. and Parker, J. A. (2017). A rapid chemical-genetic screen utilizing impaired movement phenotypes in *C. elegans*: Input into genetics of neurodevelopmental disorders. *Exp. Neurol.* **293**, 101-114.
- Schöls, L., Bauer, P., Schmidt, T., Schulte, T. and Riess, O. (2004). Autosomal dominant cerebellar ataxias: clinical features, genetics, and pathogenesis. *Lancet. Neurol.* **3**, 291-304.
- Shao, J. and Diamond, M. I. (2007). Polyglutamine diseases: emerging concepts in pathogenesis and therapy. *Hum. Mol. Genet.* **16**, R115-R123.
- Simonetta, S. H. and Golombek, D. A. (2007). An automated tracking system for *Caenorhabditis elegans* locomotor behavior and circadian studies application. *J. Neurosci. Methods* **161**, 273-280.
- Soon, B.-W., Cheng, C.-H., Liu, R.-S. and Shan, D.-E. (1997). Machado-Joseph disease: clinical, molecular, and metabolic characterization in Chinese kindreds. *Ann. Neurol.* **41**, 446-452.
- Stiernagle, T. (2006). Maintenance of *C. elegans*. *WormBook*, 1-11.
- Stochmanski, S. J., Therrien, M., Laganière, 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. *Hum. Mol. Genet.* **21**, 2211-2218.
- 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.
- Taylor, R. C. and Dillin, A. (2013). XBP-1 is a cell-nonautonomous regulator of stress resistance and longevity. *Cell* **153**, 1435-1447.
- Teixeira-Castro, A., Ailion, M., Jalles, A., Brignull, H. R., Vilaça, 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. *Hum. Mol. Genet.* **20**, 2996-3009.
- Teixeira-Castro, A., Jalles, A., Esteves, S., Kang, S., da Silva Santos, L., Silva-Fernandes, A., Neto, M. F., Brielmann, 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* **138**, 3221-3237.
- Therrien, M. and Parker, J. A. (2014). Worrying forward: amyotrophic lateral sclerosis toxicity mechanisms and genetic interactions in *Caenorhabditis elegans*. *Front. Genet.* **5**, 85.
- 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. *J. Cell Biol.* **158**, 639-646.
- Vaccaro, A., Patten, S. A., Ciura, S., Maios, C., Therrien, M., Drapeau, P., Kabashi, E. and Parker, J. A. (2012a). Methylene blue protects against TDP-43 and FUS neuronal toxicity in *C. elegans* and *D. rerio*. *PLoS ONE* **7**, e42117.
- Vaccaro, A., Tauffenberger, A., Aggad, D., Rouleau, G., Drapeau, P. and Parker, J. A. (2012b). Mutant TDP-43 and FUS cause age-dependent paralysis and neurodegeneration in *C. elegans*. *PLoS ONE* **7**, e31321.
- Vaccaro, A., Tauffenberger, A., Ash, P. E. A., Carlomagno, Y., Petrucelli, L. and Parker, J. A. (2012c). TDP-1/TDP-43 regulates stress signaling and age-dependent proteotoxicity in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet.* **8**, e1002806.
- 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. *Neurobiol. Dis.* **55**, 64-75.
- van de Warrenburg, B. P. C., Sinke, R. J., Verschuuren-Bemelmans, C. C., Scheffer, H., Brunt, E. R., Ippel, P. F., Maat-Kievit, J. A., Dooijes, D., Notermans, N. C., Lindhout, D. et al. (2002). Spinocerebellar ataxias in the Netherlands: prevalence and age at onset variance analysis. *Neurology* **58**, 702-708.
- van Oosten-Hawle, P., Porter, R. S. and Morimoto, R. I. (2013). Regulation of organismal proteostasis by transcellular chaperone signaling. *Cell* **153**, 1366-1378.
- 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. *Nat. Commun.* **6**, 7319.
- Walker, A. K. and Atkin, J. D. (2011). Stress signaling from the endoplasmic reticulum: a central player in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *IUBMB Life* **63**, 754-763.
- 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 Genet.* **5**, e1000350.
- Wüllner, U., Reimold, M., Abele, M., Bürk, 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. *Arch. Neurol.* **62**, 1280-1285.
- Xu, Z., Joel Tito, A., Rui, Y.-N. and Zhang, S. (2015). Studying polyglutamine diseases in *Drosophila*. *Exp. Neurol.* **274**, 25-41.
- 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. *J. Nucl. Med.* **41**, 994-998.



Supplementary Figure 1. *atx-3(tm1689)* do not affect the paralysis and neurodegeneration phenotypes observed in ATXN3-CAG89 transgenic worms

(A) No difference between *unc-47p::mCherry; CAG89* and *(unc-47p::mCherry; CAG89); atx-3(tm1689)* transgenic worms were identified for the paralysis phenotype. This experiment was replicated for 3 times.

(B) Quantification of neurodegeneration in transgenic worms at days one, five and nine of adulthood. At adult day one worms, there was none significant neurodegeneration phenotype for the transgenic worms when compared to *unc-47p::mCherry*. ATXN3-CAG89 transgenics showed a significant increase of neurodegeneration compared to *unc-47p::mCherry* and ATXN3-CAG10 controls (\*\*\*\* $P < 0.0001$  for day five of adulthood and \*\*\* $P < 0.001$  for adult day nine worms, by Student's t-test) ( $N=100$  for each condition). No difference between *unc-47p::mCherry; CAG89* and *(unc-47p::mCherry; CAG89); atx-3(tm1689)* transgenic worms were identified for the neurodegeneration phenotype for none of the three days of the study (days one, five and nine of adulthood). These experiments were replicated for 3 times.



Supplementary Figure 2. *unc-47p::mCherry* do not affect the swimming activity of ATXN3-CAG89 mutant worms

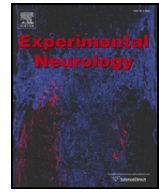
The swimming activity of ATXN3-CAG89 mutants was compared to *unc-47p::mCherry*; CAG89 worms for a period of ten hours at (A) day one of adulthood and, (B) day five of adulthood. No differences for the motility was observed between ATXN3-CAG89 and *unc-47p::mCherry*; CAG89 worms.



## **Annexe 2.**

### **A rapid chemical-genetic screen utilizing impaired movement phenotypes in *C. elegans*: Input into genetics of neurodevelopmental disorders**

Schmeisser K, Fardghassemi Y, Parker JA. (2017).  
*Experimental Neurology*, **293**,101-114. doi: 10.1016/j.expneurol.2017.03.022.



## Research Paper

# A rapid chemical-genetic screen utilizing impaired movement phenotypes in *C. elegans*: Input into genetics of neurodevelopmental disorders

Kathrin Schmeisser<sup>a</sup>, Yasmin Fardghassemi<sup>a,c</sup>, J. Alex Parker<sup>a,b,\*</sup><sup>a</sup> Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), 900 St-Denis Street, Montréal, Québec H2X 0A9, Canada<sup>b</sup> Department of Neuroscience, Université de Montréal, 2960 Chemin de la Tour, Montréal, Québec H3T 1J4, Canada<sup>c</sup> Department of Biochemistry and Molecular Medicine, Université de Montréal, 2960 Chemin de la Tour, Montréal, Québec H3T 1J4, Canada

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 25 October 2016

Received in revised form 23 March 2017

Accepted 27 March 2017

Available online 1 April 2017

## Keywords:

Autism spectrum disorders  
 Neurodevelopmental disorders  
*Caenorhabditis elegans*  
 Mutant screening  
 Drug screening

## ABSTRACT

Autism spectrum disorder (ASD) is the most common neurodevelopmental disorder with a constantly increasing prevalence. Model organisms may be tools to identify underlying cellular and molecular mechanisms, as well as aid the discovery and development of novel therapeutic approaches. A simple animal such as the nematode *Caenorhabditis elegans* may provide insights into the extreme complexity of ASD genetics. Despite its potential, using *C. elegans* in ASD research is a controversial approach and has not yet been used extensively in this context. In this study, we present a screening approach of potential *C. elegans* mutants as potential ASD models. We screened these mutants for motor-deficiency phenotypes, which can be exploited to study underlying mechanisms of the disorder. Selected motor-deficient mutants were then used in a comprehensive drug screen of over 3900 compounds, including many FDA-approved and natural molecules, that were analyzed for their ability to suppress motility defects caused by ASD-associated gene orthologues. This genetic-chemical approach, *i.e.* establishing *C. elegans* models for ASD and screening of a well-characterized compound library, might be a promising first step to understand the mechanisms of how gene variations cause neuronal dysfunction, leading to ASD and other neurological disorders. Positively acting compounds could also be promising candidates for preclinical studies.

© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

## 1. Introduction

Neurodevelopmental disorders (NDD) are a clinically heterogeneous group that describes heritable psychiatric illnesses caused by aberrant brain development and growth (APA, 2013). They comprise cognitive, motor, language and affective disabilities and include autism spectrum disorder (ASD), intellectual disabilities, communication disorders, attention deficit/hyperactivity disorders (ADHD), specific learning

disorder, as well as motor disorders (APA, 2013). Disordered development affects neurogenesis, glia/neuronal proliferation/migration, synapse formation and myelination (Ding, 2015; Hu et al., 2014), leading to physiological and behavioral deficits in both children and adults. NDD overlap with other brain disorders and co-occurrence is common (for instance, ADHD goes often along with specific learning disorder, or ASD with intellectual disabilities), which forms a complex net of neuropsychiatric comorbidities (Dalsgaard et al., 2013; Lala and Sajatovic, 2012). NDD remain hard to treat, since no specific and effective treatments like pharmacological therapies that successfully treat core NDD deficits are available (Dalsgaard et al., 2013; Elder et al., 2016).

ASD has the highest prevalence under all NDD with 1.47% (1 in 68) of US children aged 8 years affected in 2014 (Network, 2014), and with the constantly rising numbers they have a huge socio-economic impact (Dykens, 2015). ASD was previously grouped into autistic disorder, Asperger syndrome and not otherwise specified pervasive developmental disorders, but the latest edition of the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-5, 2013) suggests that all patients should be diagnosed with ASD, relinquishing sub-classification (APA, 2013). ASD is characterized by abnormalities in brain function and morphology, ultimately resulting in abnormal social behavior, difficulties in

**Abbreviations:** ASD, autism spectrum disorder; NDD, neurodevelopmental disorders; ADHD, attention deficit hyperactivity disorders; WT, wildtype; SNPs, single nucleotide polymorphism; SFARI, Simons Foundation Autism Research Initiative; GABA,  $\gamma$ -aminobutyric acid; RNAi, RNA interference; DMSO, dimethyl sulfoxide; NGM, Nematode growth medium; ROS, Reactive oxygen species; Nrf2, Nuclear factor erythroid 2-related factor 2; ARE, antioxidant response element; ANK2, ankyrin B; NMDA, N-methyl-D-aspartate; MAO-A, Monoamine oxidase A; CACNA1A, Voltage-dependent calcium channel, P/Q type,  $\alpha$ -1A subunit; CACNA1C, Voltage-dependent calcium channel, P/Q type,  $\alpha$ -1C subunit.

\* Corresponding author at: Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), 900 St-Denis Street, Montréal, Québec H2X 0A9, Canada.

E-mail address: [ja.parker@umontreal.ca](mailto:ja.parker@umontreal.ca) (J.A. Parker).

communication, stereotypies and repetitive behavior, seizures, obsession with routines, and delays in cognitive development (Gadke et al., 2016; Grzadzinski et al., 2016). As the name indicates, individual ASD cases range on a spectrum and symptoms can vary extremely, such as cognitive function that reaches throughout the spectrum from high functioning patients to severely neurodevelopmentally disabled individuals (Postorino et al., 2016). There is also a substantial phenotypic variation for social communication and interaction in the healthy population, which complicates diagnoses and the search for the causes.

Underlying ASD are most likely a variety of causes and evident points towards mutations in multiple genes, epigenetics, and environmental factors (Kubota and Mochizuki, 2016; Robinson et al., 2016; Sealey et al., 2016). Screenings of ASD patients' genomes have not revealed a common genetic background, indicating that the genetics are complex and remain scarcely understood. Almost all genetic risk factors for ASD can be found in unaffected individuals, and the genetic relationship between neuropsychiatric disorders and typical social and behavioral variation remains unclear (Hanson et al., 2015). It is likely that mutations in multiple genes responsible for neurodevelopment, organization and connection of neurons and synapses are important contributors (Gaugler et al., 2014; Robinson et al., 2016). It has been reported that common genotyped SNPs are a major cause in at least 20% of all ASD cases (Bulik-Sullivan et al., 2015; Cross-Disorder Group of the Psychiatric Genomics, 2013). *De novo* variations are responsible for <5% of the overall liability to ASD, but are still found in 10–20% of cases (Gaugler et al., 2014; Iossifov et al., 2014). Studies have shown that there is an increased risk among first-degree family members of patients to be diagnosed with ASD, which is higher in monozygotic twins, demonstrating that ASD cases are partially inherited (Hallmayer et al., 2011; Lundstrom et al., 2012). An evidence-based database and risk-scoring estimation on all ASD associated genes known hitherto is provided by the Simons Foundation Autism Research Initiative (SFARI; <http://sfari.org>).

Translational research to develop novel therapeutics in the management of ASD and other NDD is strongly required. One research focus hereby lies in the development of novel preclinical models that could help identify biological targets and biomarkers to gain mechanistic insights into ASD and possible therapeutic approaches.

Model organisms have made major contributions to biomedical science and are essential models for studying the neurobiology of human brain disorders, including ASD. Given the complex genetics in ASD, not to mention the complexity of the human brain in general, model organisms can help provide insights into the underlying network of genetic variations, epigenetic effects, and molecular mechanisms resulting in behavioral changes.

The nematode *C. elegans* was introduced in 1974 as a model for investigating the development and function of the nervous system (Brenner, 1974). Due to its short lifespan, easy handling, and high number of conserved genes, *C. elegans* has become a popular animal model to investigate a wide variety of biological topics (Kennedy, 2008). These animals are especially well suited for neuroscience research thanks to the comprehensively detailed neuronal lineage and interconnectivity of synapses that resembles very well those of the vertebrate nervous system. The *C. elegans* nervous system contains 302 neurons, divided into 118 neuronal classes, 56 glia cells, and about 7600 synapses (Hobert, 2010). *C. elegans* is transparent, which allows the visualization of neurons *in vivo* and in freely moving animals. The worms are highly amenable to genetic manipulation making it possible to identify genes that are important for neuronal formation, migration, and activity (Vashlishan et al., 2008). Their behavioral plasticity is surprisingly complex and the underlying neuronal circuits are well established (Hobert, 2003). *C. elegans* movement is coordinated by head and ventral nerve cord circuits, where cholinergic motor neurons excite muscles *via* input from acetylcholine on either side of the body, while they indirectly inhibit muscles on the opposite side due to excitation of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA)ergic motor neurons (Jospin et al., 2009; McIntire et al.,

1993). In liquid culture, worms display a stereotypical swimming behavior, with great activity of the neuromuscular junction to maintain functioning of the body wall muscles at high levels.

*C. elegans* possesses a wide variety of phenotypes that may be used to study ASD and other NDD. Behavioral as well as cellular or molecular phenotypes, for instance the migration and connectivity of synapses or deficits within these as a proposed fundamental event in the etiology of ASD can be examined (reviewed in Bessa et al., 2013). Altered cognition resulting from perturbed synapse development and function has been reported as a hallmark of ASD, and mutations in the genes coding for neuroligin, neuroligin, and shank have been shown to be responsible for these events (Hu et al., 2012; Sudhof, 2008). *C. elegans* orthologues of these genes are *nrx-1*, *nlg-1*, and *shn-1*, respectively, and mutants of these genes have proven to be valuable tools to study neurodevelopmental processes (Calahorra, 2014). NRX-1 and NLG-1 are mediators of a retrograde synaptic signal to inhibit neurotransmitter release at the neuromuscular junction (Hu et al., 2012), and loss of NLG-1 leads to a strong reduction of GABA(A)R (positioning type A GABA receptors) levels at GABAergic inhibitory synapses (Tu et al., 2015). Both NRX-1 and NLG-1 stabilize diffusing GABA(A)R and mediate the organization of GABAergic postsynapses (Maro et al., 2015; Tong et al., 2015). *C. elegans* mutants of *nrx-1* and *nlg-1* show deficits in sensory processing, touch response and osmotic avoidance (Calahorra et al., 2009).

In this study, we used *C. elegans* in a comprehensive chemical-genetic screen to identify novel nematode models for the purpose of studying ASD and underlying mechanisms of the disorder. We used the simple approach of monitoring locomotion (swimming behavior) in mutant worm strains for genes that are orthologues of human genes associated with ASD. Mutant strains with motility defects were considered candidates for small molecule screens to restore wild type movement behavior. For the selected mutant strains, we performed comprehensive drug screens where we tested >3900 molecules (many FDA-approved) per screen for their ability to rescue motor phenotypes.

Our chemical-genetic approach links small molecules to gene function for several genes associated with ASD in humans. The positively-acting compounds, especially when classified into functional categories, suggest novel mechanisms underlying ASD and could potentially be used in future preclinical studies in more advanced models.

## 2. Methods

### 2.1. Nematode strains and maintenance

Standard conditions were applied for handling *C. elegans* (Stiernagle, 2006). Briefly, worms were kept on NGM agar streaked with *E. coli* OP50 as food source at 15 °C for maintenance and 20 °C for all assays. Mutant strains used for this publication (see Table 1) were provided by the Caenorhabditis Genetics Center at the University of Minnesota and outcrossed four times to N2 wildtype (WT).

The transgenic 'rescue' strain was generated by injecting cosmid T01C3 (15  $\mu$ g/ml), which contains an open reading frame encoding *nmr-2* (Kano et al., 2008), along with co-injection 'marker' plasmid L4640 (0.5  $\mu$ g/ml) that expresses YFP under the control of a *myo-2* promoter into the germ line of adult hermaphrodites, as described previously (Mello and Fire, 1995). YFP positive progeny were selected and checked for the presence of T01C3 *via* PCR. Two resulting lines were used in experiments.

### 2.2. RNAi experiments

RNAi experiments were performed according to (Kamath et al., 2001). RNAi clones (*E. coli* HT115) of *skn-1* and *ced-3* were taken from the ORFeome RNAi library (Open Biosystems) and compared to empty vector (L4440). To confirm correct clones sequencing was performed before use. Worms were grown on RNAi from the egg stage on NGM

**Table 1**

All tested worm genes, alleles, respective mutant strain, average movement score, and human orthologue gene. Strains in green shaded rows did not show impaired movement; strains in pink shaded rows showed significantly impaired movement compared to WT. Strains in yellow rows show a tendency to impaired movement not significantly different to WT.

Strain	Worm gene symbol	Worm gene	Allele	Movement score	Human gene symbol	Human gene
VC376	<i>shn-1</i>	SHANK (SH3/ankyrin domain scaffold protein) related	gk181	109.9 ± 36.9	<i>shank3</i>	SH3 and multiple ankyrin repeat domains
RB1196	<i>shn-1</i>	SHANK (SH3/ankyrin domain scaffold protein) related	ok1241	93.3 ± 22.4	<i>shank3</i>	SH3 and multiple ankyrin repeat domains
SG1	<i>nrx-1</i>	NeuReXin related	ds1	104.9 ± 1.7	<i>nrxn1</i>	Neurexin 1
VC1416	<i>nrx-1</i>	NeuReXin related	ok1649	83.2 ± 22.6	<i>nrxn1</i>	Neurexin 1
RB2036	<i>cdkl-1</i>	Cyclin-Dependent Kinase- Like	ok2694	104.6 ± 18.9	<i>cdkl4</i> and <i>cdkl1</i>	Cyclin-dependent kinase-like 4 and 1
VC1065	<i>herc-1</i>	HECT and RCC domain E3 ubiquitin ligase	ok1524	101.2 ± 17.3	<i>ube3a</i>	E6-AP ubiquitin-protein ligase
RB762	<i>alr-1</i>	AristaLess (Drosophila homeodomain) Related	ok545	97.5 ± 19.5	<i>arx</i>	Aristaless related homeobox
VC680	<i>gap-2</i>	GTPase Activating Protein family	ok1001	96.9 ± 25.1	<i>syngap1</i>	Synaptic Ras GTPase-activating protein
JC1971	<i>tbx-2</i>	T BoX family	ut192	96.2 ± 18.2	<i>tbr1</i>	T-box protein 1
JC1970	<i>tbx-2</i>	T BoX family	ut180	82.3 ± 18.4	<i>tbr1</i>	T-box protein 1
EM207	<i>tbx-2</i>	T BoX family	bx59	88.7 ± 27.2	<i>tbr1</i>	T-box protein 1
RB2487	<i>cca-1</i>	Calcium Channel, Alpha subunit	ok3442	96.2 ± 23.2	<i>cacna1h</i>	Calcium voltage-gated channel subunit alpha1 H
VC39	<i>cca-1</i>	Calcium Channel, Alpha subunit	gk30	93.9 ± 31.2	<i>cacna1h</i>	Calcium voltage-gated channel subunit alpha1 H
RB2105	<i>ntr-1</i>	NemaTocin Receptor	ok2780	95.7 ± 22.0	<i>avpr1a</i>	Vasopressin receptor type 2
VC1646	<i>fkh-7</i>	ForkHead transcription factor family	gk793	95.1 ± 33.2	<i>foxp1/foxp2</i>	Forkhead box P1/P2
RB758	<i>hda-4</i>	Histone Deacetylase	ok518	94.7 ± 25.4	<i>hdac4</i>	Histone deacetylase 4
VC676	<i>chd-7</i>	Chromodomain and Helicase Domain protein	gk306	94.7 ± 34.6	<i>chd7</i>	Chromodomain helicase DNA-binding protein
VC606	<i>chd-7</i>	Chromodomain and Helicase Domain protein	gk290	61.1 ± 17.0	<i>chd7</i>	Chromodomain helicase DNA-binding protein
RB1558	<i>poml-2</i>	PON (paraoxonase) and MEC- 6 Like	ok1886	94.6 ± 35.2	<i>pon1</i> and <i>pon2</i>	Paraoxonase 1 and 2
CB5380	<i>fox-1</i>	Feminizing gene On X	e2643	92.1 ± 25.2	<i>rbfox1</i>	RNA-binding protein, fox-1 homolog
CB1375	<i>daf-18</i>	Abnormal DAuer Formation	e1375	88.9 ± 28.5	<i>pten</i>	Phosphatase and tensin homolog
RB836	<i>nhx-5</i>	Na/H exchanger	ok661	88.2 ± 20.4	<i>slc9a6</i>	Solute carrier family 9 member 6
LH23	<i>lad-2</i>	L1 CAM Adhesion molecule homolog	hd31	76.7 ± 30.4	<i>L1CAM</i>	Neural cell adhesion molecule L1
RB677	<i>mbk-1</i>	MiniBrain Kinase (Drosophila) homolog	ok402	74.3 ± 13.8	<i>dyrk1a</i>	Dual-specificity tyrosine phosphorylation regulated kinase 1A
VC2623	<i>nmr-2</i>	N-methyl D-aspartate-type glutamate receptor, ionotropic	ok3324	74.2 ± 33.0	<i>grin2b</i>	Glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2B
VH1565	<i>fmi-1</i>	FlaMingo (cadherin plus 7TM domain) homolog	hd121	71.8 ± 15.9	<i>pcdh19</i>	Protocadherin 19
VH1075	<i>fmi-1</i>	FlaMingo (cadherin plus 7TM domain) homolog	rh308	24.6 ± 10.0	<i>pcdh19</i>	Protocadherin 19
VC228	<i>nlg-1</i>	NeuroLigin family	ok259	70.1 ± 15.8	<i>nlg3/nlg4x</i>	Neuroigin 3/4, x-linked
MT1212	<i>egl-19</i>	Voltage-gated calcium channel alpha1 subunit	n582	59.5 ± 24.6	<i>cacna1C</i>	Calcium voltage-gated channel subunit alpha 1C
BZ33	<i>dys-1</i>	DYSTROPHIN related	eg33	37.4 ± 15.4	<i>dmd</i>	Dystrophin
DM612	<i>unc-2</i>	Calcium channel alpha subunit	ra612	35.0 ± 7.7	<i>cacna1A</i>	Voltage-dependent calcium channel, P/Q type, alpha-1A subunit
CB55	<i>unc-2</i>	Calcium channel alpha subunit	e55	27.4 ± 6.2	<i>cacna1A</i>	Voltage-dependent calcium channel, P/Q type, alpha-1A subunit
VC854	<i>unc-2</i>	Calcium channel alpha subunit	gk366	27.2 ± 1.6	<i>cacna1A</i>	Voltage-dependent calcium channel, P/Q type, alpha-1A subunit
GS2526	<i>mca-3</i>	Membrane Calcium ATPase	ar492	22.4 ± 7.2	<i>atp2b2</i>	ATPase plasma membrane calcium-transporting 2
CB78	<i>unc-6</i>	Netrin ortholog	e78	19.8 ± 6.9	<i>ntng1</i>	Netrin G1
GS2527	<i>mca-3</i>	Membrane Calcium ATPase	ar493	17.7 ± 0.6	<i>atp2b2</i>	ATPase plasma membrane calcium-transporting 2
CB362	<i>unc-44</i>	Ankyrin-like protein	e362	4.2 ± 0.9	<i>ank2</i>	Ankyrin 2

plates containing 1 mM isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside and 50 µg/ml ampicillin.

### 2.3. Identification of genes involved in ASD and selection of *C. elegans* mutants

To identify genes that are linked to ASD in humans, we used SFARI Gene 2.0 (<https://gene.sfari.org>, as of March 2014). SFARI Gene is an evolving database that centers on genes implicated in ASD susceptibility. The SFARI Gene web portal integrates genetic data that are contributed by the research community. It includes the SFARI Gene Scoring Module ([https://gene.sfari.org/autdb/GS\\_Home.do](https://gene.sfari.org/autdb/GS_Home.do)) that subdivides genes in 7 categories depending on their contribution to the ASD risk. We checked ASD-related genes from the highest categories (category 5 – symptomatic, category 1 – high confidence, category 2 – strong candidate, category 3 – suggestive evidence) and checked for verified *C. elegans* orthologues using WormBase (<http://www.wormbase.org>). In case an orthologue could be identified, we searched for viable loss-of-function or hypomorphic mutants of the particular gene (see Table 1).

### 2.4. Discovery of novel potential ASD *C. elegans* models

Mutant strains were screened for motor-deficiency phenotypes using a worm tracking machine (*Wmicrotracker*, Phylum Tech). This machine is able to track the activity of *C. elegans* both automatically and simultaneously in 96-well-microtiter plates. Approximately 30 worms per well were put in M9 buffer and their swimming movements were tracked for at least 6 h. Two infrared light rays cross each microtiter well from top to bottom and a detector determines how often the light rays were interrupted by worms moving in the well. The signal

was used to calculate a movement score, which is the amount of animal movement in a fixed time period. Movement of each strain was measured in triplicates.

### 2.5. Drug libraries

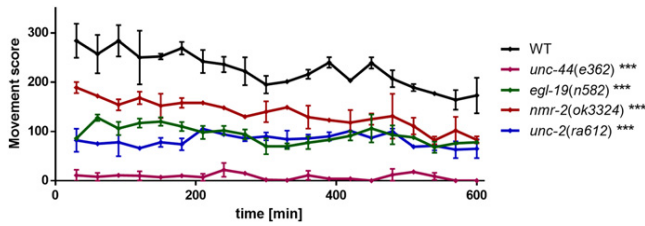
FDA-approved and natural compounds were provided by Prestwick Chemicals (Prestwick Chemical Library; containing compounds as of March 2015, Illkirch/France), Sigma-Aldrich (Sigma Aldrich's Library of Pharmacologically Active Compounds (Lopac) 1280 library, containing compounds as of July 2015, Oakville/Canada), Microsource (880 compounds, Gaylordsville, CT/USA), Enzo Life Science, Inc. (BML-2865 Natural Products Library, containing compounds as of April 2015, Farmingdale, NY/USA). All compounds were dissolved in DMSO and tested at a concentration of 20 µM.

### 2.6. Drug screen

The drug screen was performed as follows: The motor deficient worm strains were exposed to the drugs in the microtiter wells at a concentration of 20 µM in DMSO while swimming in M9 buffer with OP50 and movement was tracked for at least 4 h. Measurements were performed in triplicates and the average movement score was compared to a no-compound control and the average movement score of the whole plate. If the values for a certain drug were higher than the respective controls, a second screen was performed to validate the increased movement due to the specific drug. Candidates that increased movement abilities significantly in the second screen were counted as positive. A complete list of all drugs tested can be found in Supplemental Table S1.







**Fig. 2.** Movement scores of *C. elegans* *unc-44(e362)* (pink), *egl-19(n582)* (green), *nmr-2(ok3324)* (red), and *unc-2(ra612)* (blue) shown as average of three measurements  $\pm$  standard deviation compared to WT (black). Two-tailed *t*-test was performed for statistical analyses and movement score was considered different to WT when  $p < 0.05$ .

*19(n582)*, *nmr-2(ok3324)*, and *unc-2(ra612)* to visualize if neurodevelopmental problems in the motor neurons, such as axonal dystrophy and/or neuronal loss were correlated with the locomotion deficits observed in these strains. We found that *unc-44(e362)*, *egl-19(n582)* and *nmr-2(ok3324)* mutants show significantly higher rates of impaired GABAergic neurodevelopment, while *unc-44(e362)* and *egl-19(n582)* mutants also show impaired cholinergic neurodevelopment compared to WT animals at the L4 stage (Fig. 4A, C). *unc-2(ra612)* did not show dysmorphic neuronal phenotypes at the L4 stage, but we observed significant morphological abnormalities of both GABA- and cholinergic motor neurons at day 5 of adulthood (Fig. 4B, C).

Based on these findings, we extended our analyses to characterize the types, as well as frequency of dysmorphic neuronal morphology phenotypes in GABA- and cholinergic motor neurons.

Fig. 4D depicts the status of the GABAergic system. All strains have significantly more gaps in the axonal branches of their GABAergic neurons compared to WT and show a significant loss of commissures. It should be noted, however, that in *unc-44(e362)* animals the loss of commissures was much more severe than in all other mutant strains. On average, only about 5 commissures could be observed, compared to 16 in healthy worms. *unc-44(e362)* worms also showed the greatest loss of GABAergic cell bodies compared to all strains, where on average a single *unc-44(e362)* mutant contained only about half the number of GABAergic cells ( $n = 13.4$ ) as healthy control worms ( $n = 26$ ). The ectopic branching phenotype was scarcely observed in all strains, except for *unc-44(e362)* mutants that showed a highly variable, but significant, branching phenotype compared to WT control animals. Breaks along the nerve cord bigger than  $50 \mu\text{M}$  that were usually accompanied by the loss of other neuronal tissue like cell bodies could be observed and were most severe in *nmr-2(ok3324)* and *unc-2(ra612)* mutants. As indicated in Fig. 4A, *egl-19(n582)* mutants seem to have the least severe defects of GABAergic motor neuron morphology, whereas *unc-44(e362)* animals display the strongest phenotypes.

Fig. 4E shows abnormal morphology of the cholinergic system categorized into gaps along axonal branches, number of commissures, and breaks bigger than  $50 \mu\text{M}$ . In contrast to the slight morphological defects of GABAergic neurons in *egl-19(n582)* mutants, these animals display more severe pathologies within the cholinergic system.

### 3.4. Locomotion as well as neuronal integrity of GABAergic and cholinergic motor neurons is improved in a *nmr-2(ok3324)* strain expressing copies of WT *nmr-2*

To further establish the function of *nmr-2* on motor neuron development and locomotion in *C. elegans*, we performed a ‘rescue’ experiment by injecting the cosmid T01C3 that comprises an open reading frame encoding WT *nmr-2* (Kano et al., 2008) into *nmr-2(ok3324);unc-47p::mCherry;unc-17p::GFP*. We investigated two resulting lines of the ‘rescue’ strain *nmr-2(ok3324);T01C3* and outcomes were the same in both lines (results are shown for one line). Supplemental Fig. 1a

shows the movement score of *nmr-2(ok3324);T01C3* that lies between the movement scores of WT and *nmr-2(ok3324)* mutants and is significantly different from both. We furthermore tested how the ‘rescue’ affects GABA- and cholinergic neurons and found that it has a prominent beneficial effect on GABAergic neurons (Supplemental Fig. 1b). We therefore took a closer look at the neuronal morphology of the GABAergic system and found that *nmr-2(ok3324);T01C3* has significantly less gaps along the axonal branches, and that the cell body and commissure numbers were similar to WT and significantly increased compared to *nmr-2(ok3324)* mutants alone (Supplemental Fig. 1c). Whereas occurrence of ectopic axonal branches is not influenced, breaks in the nerve cord bigger than  $50 \mu\text{M}$  are reduced back to WT levels in *nmr-2(ok3324);T01C3* (Supplemental Fig. 1c). These data suggest that the T01C3 cosmid can rescue *nmr-2(ok3324)* phenotypes, and that *nmr-2* contributes to GABAergic neuronal integrity and locomotion in *C. elegans*.

### 3.5. Neuronal integrity of GABAergic and cholinergic motor neurons following treatment with compounds able to correct motor-deficient phenotypes

Based on the robust results regarding locomotion improvement, we tested selected compounds for their ability to ameliorate motor neuron development phenotypes in the respective strains. In *unc-44(e362)* the antipsychotic drug promethazine, the antidepressant bupropion hydrochloride and the antispasmodic papaverine hydrochloride were tested (Fig. 5A). All three compounds rescued the GABAergic neuronal dystrophy phenotypes, and additionally bupropion was able to partially rescue morphology defects in the cholinergic neurons (Fig. 5B), which would help explain why these compounds improved motility in this genetic background. For *nmr-2(ok3324)* mutants, we tested the MAO inhibitor tryptoline (1,2,3,4-Tetrahydro-9H-pyrido[3,4-b]indole, Fig. 5C), which also reduced the GABAergic motor neuron defects (Fig. 5D). The polyphenols quercetin and tryptanthrin (Fig. 5E) rescued cholinergic motor neuron phenotypes in *egl-19(n582)* mutants, and quercetin was also able to partially correct the dystrophy observed in GABAergic neurons (Fig. 5F). ( $\pm$ )-synephrine and thalidomide (Fig. 5G) were assayed in *unc-2(ra612)* animals at day 5 of adulthood, when a pronounced motor neuron phenotype could be observed, and both compounds significantly decreased neuronal dystrophy and loss of GABAergic and cholinergic motor neurons (Fig. 5G).

### 3.6. Generation of reactive oxygen species as a possible mechanism underlying the *egl-19(n582)* motor phenotype

We analyzed the functional categories of pathways of positively-acting compounds from the *egl-19(n582)* drug screen, and found that a large percentage of the protective molecules are secondary plant and fungus metabolites, like flavonoids, alkaloids, and furanocoumarins. Many of these substances are known to play a role in the homeostasis of reactive oxygen species (ROS), and a literature research revealed that 16 out of 55 beneficial compounds (29%) in our drug screen are known ROS inducers or scavengers (Table 2, marked in green), whereas this number is probably an underestimation since for many of the positive compounds their ROS-modifying potential has not been tested (Fernandes et al., 2003; Ferreira et al., 2014; Hamacher-Brady et al., 2011; Hodnick et al., 1994; Kobayashi et al., 2002; Moon et al., 2014; Otreba et al., 2015; Sanner et al., 2002; Santoro et al., 2016; Selimovic et al., 2013; Smirnova et al., 2011; Xiao et al., 2013; Yi et al., 2012). In fact, many of these compounds have been shown to directly quench ROS formation, or to induce a transient ROS signal that leads to a secondary adaptation effect, with ultimately lowered ROS levels due to increased activity of antioxidant defense enzymes (Ishige et al., 2001; Singh et al., 2005; Zini et al., 1999; Howitz and Sinclair, 2008; Magesh et al., 2012; Turner et al., 2008). This response is often dependent on the transcription factor Nrf2 (Nuclear factor erythroid 2-related factor 2, worm ortholog SKN-1) that activates the expression of defense

**Table 2**

Compounds that were able to correct the impaired movement phenotypes of each strain. 49, 56, 62 and 28 substances were found to have beneficial effects in *unc-44(e362)*, *egl-19(n582)*, *nmr-2(ok3324)*, and *unc-2(ra612)*, respectively. Rows shaded in pink contain compounds that were selected for assessment of neuronal integrity. Anticholinergic drugs are marked in yellow. ROS inducers or scavengers are marked in green.

Strain	CB362	MT1212	VC2623	DM612
Genotype	<i>unc-44 (e362)</i>	<i>egl-19 (n582)</i>	<i>nmr-2 (ok3324)</i>	<i>unc-2 (ra612)</i>
<b>Positive compounds</b>	Oxidopamine hydrochloride	Ro 8-4304	Hemicholinium-3	1-Amino-1-cyclohexanecarboxylic acid hydrochloride
	Oxyquinoline hemisulfate	SCH-202676 hydrobromide	Nelfinavir mesylate hydrate	gamma-Acetylinic GABA
	Metaxalone	Ritanserlin	Aurothioglucose	CGP-13501
	Physostigmine salicylate	Sulindac sulfone	Metergoline	5-Bromo-2'-deoxyuridine
	Aminohydroxybutyric acid	Himbacine	(±)-Methoxyverapamil hydrochloride	SB 415286
	3,7-Epoxyaryothyllan-6-ol	Isotretandrine	CR 2249	Isoliquiritigenin
	3-Methylxanthine	Artesunate	Methapyrilene hydrochloride	Hordenine
	Valeryl salicylate	10-Hydroxycamptothecin	JW74	Ecdysone
	L-Alaninol	Vinblastine	Ethopropazine hydrochloride	Lactulose
	Levodopa	Daidzin	TBB	Prednisolone acetate
	Ethambutol dihydrochloride	Tryptanthrin	Mitiglinide calcium	Chlorophyllide-Cu-complex-Na-salt
	Triamterene	Pinocembrin-7-methylether	Oxotremorine methiodide	Capsanthin
	Loxapine succinate	Dihydrorobinetin	L-Glutamic acid, N-phthaloyl-	Acetosyringone
	Pentylentetrazole	Isopimpinellin	Pirenzepine dihydrochloride	2,4-Dichlorophenoxyacetic acid
	Benzydamine hydrochloride	3β-Hydroxy-deoxo-dihydro-deoxygedunin	Phenelzine sulfate	Thalidomide
	Methylergometrine maleate	7,2'-Dimethoxyflavone	Bay 11-7082	Flufenamic acid
	Meclozine dihydrochloride	Ursocholic acid	Candesartan cilexetil	Pinacidil
	Tetracaine hydrochloride	Chrysanthemic acid	N-Oleoyldopamine	Chlorothiazide
	Papaverine hydrochloride	Menthone	Ropinirole hydrochloride	Bisoprolol fumarate
	Acitretin	Hetacillin potassium	Famprofazone	Chlorprothixene hydrochloride
	Isopyrin hydrochloride	Glutathione	Auranofin	Cyclobenzaprine hydrochloride
	Methylhydantoin-5-(D)	Clarithromycin	Ethaverine hydrochloride	Hydroxytacrine maleate (R,S)
	Bemegride	Bussefin	Flubendazol	Pilocarpine nitrate
	Promethazine hydrochloride	Anthothecol	S(-)Eticlopride hydrochloride	Pirenperone
	Abacavir Sulfate	Koparin	Proparacaine hydrochloride	Spiramycin
	Darifenacin hydrobromide	Quercetin-tetramethyl-(5,7,3',4')ether	Zalcitabine	Moricizine hydrochloride
	Mitiglinid	Pseudotigogeninacetate	Repaglinide	Phensuximide
	Piceatannol	Ipriflavone	Piperacetazine	(±,-)-Synephrine
	PF-04885614	Azinphos methyl	Oxaprozin	
	Tegafur	18-Aminoabieta-8,11,13-trienesulfate	Valproic acid	
	(-)-Scopolamine methyl bromide	Hieracin	Celecoxib	
	(±)-Sulpiride	3,7-Dihydroxyflavone	Atorvastatin	
	N-Oleoyldopamine	Atovaquone	Cisatracurium besylate	
	Tropicamide	Trimethadione	Actarit	
	Betulinic acid	Methoxamine hydrochloride	Acetylcholine chloride	
	Gabaculine hydrochloride	Triflusal	Hexachlorophene	
	2,3-Butanedione monoxime	Tenoxicam	Piperazine	
	N-Acetyl-L-Cysteine	Norgestrel(-)-D	Oxacillin sodium	
	BLI-489 hydrate	Chlorotrianisene	Bretilium tosylate	
	Chlorprothixene hydrochloride	Ethinylestradiol 3-methyl ether	Candesartan cilexetil	
	Bupropion hydrochloride	Nitrendipine	Trandolapril	
	Cyproheptadine hydrochloride	Altretamine	Propiolactone	
	Chlorpromazine hydrochloride	S-(+)-ibuprofen	Zolmitriptan	
	L-3,4-Dihydroxyphenylalanine methyl ester hydrochloride	Benserazide hydrochloride	D-Phenylalanine	
	5,7-Dichlorokynurenic acid	Iodipamide	Pseudo-anisatin	
	Bezafibrate	Doxylamine succinate	Sphondin	
		Miconazole	Deoxysappanone-β-7,4'-dimethylether	
	4-Hydroxybenzhydrazide	Thioridazine hydrochloride	Pyrogallin	
	Hispidin	Pentolinium bitartrate	Diosgenin	
	Idazoxan hydrochloride	Nefopam hydrochloride	Berbamine hydrochloride	
	Dimenhydrinate	Brefeldin A		
	Prednisolone	Boldine		
	N6-methyladenosine	Tryptoline (Noreleagnine)		
	Debrisoquin sulfate	18-β-Glycyrrhetic acid		
	Meclozine dihydrochloride	(-)-Cytisine		
	Digitoxigenin	Arbutin		
		Indole-3-carbinol		
		Baccatin III		
		Uvaol		
		Diallyl sulfide		
		Sparteine hydroiodide		
		Ethylchloroorsellinate		

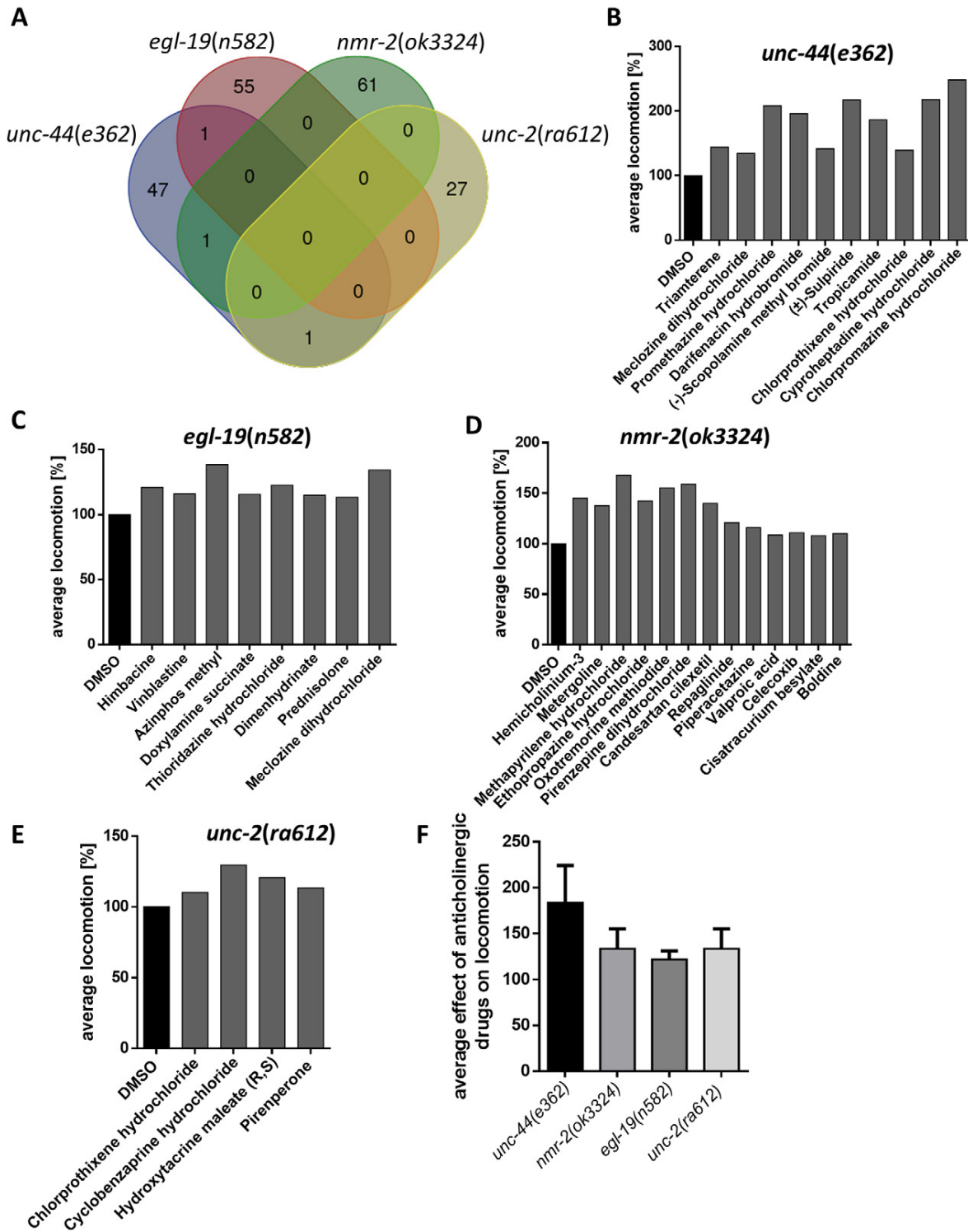
anticholinergic compounds

oxidative stress-related

picked for further analysis

genes via binding at the ARE (antioxidant response element) promoter region (Magesh et al., 2012). Since *egl-19* is expressed in neurons and muscle cells, particularly at the neuromuscular junction, we tested if

the beneficial effects on locomotion from treatment with quercetin or tryptanthrin in *egl-19(n582)* was dependent on *skn-1* in muscle cells. However, we could still observe increased locomotion mediated by

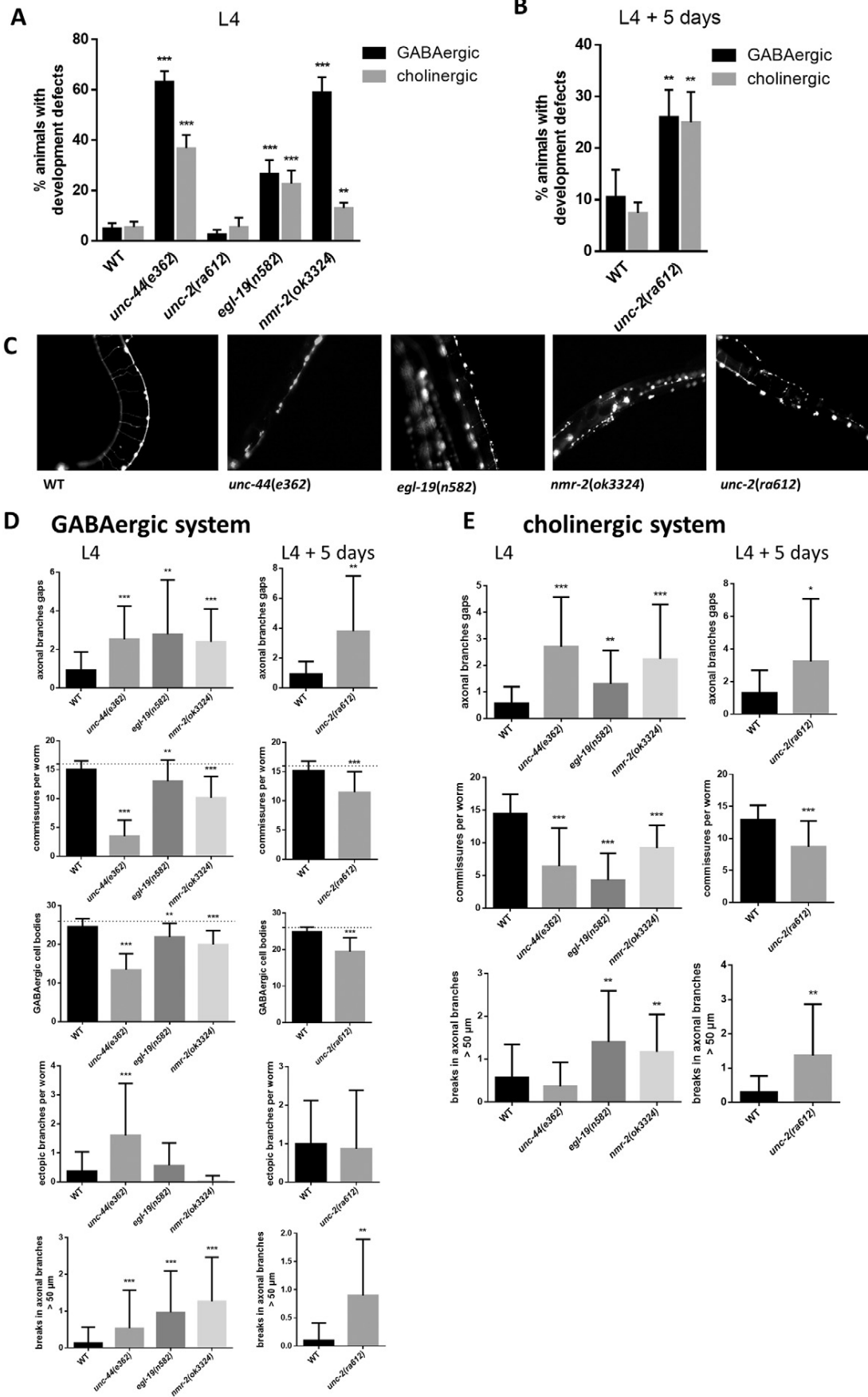


**Fig. 3.** A Venn analysis for drugs that rescue locomotion deficits in the four strains tested. Diagram was created with a free web tool that can be found here: <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/> B–E Compounds with anticholinergic properties comprised the largest group of locomotion enhancers. Shown is the movement score average over a time of 600 min in the respective strain relative to DMSO controls (black bar). F Average effect of anticholinergic drugs on locomotion expressed as percentage relative to DMSO control in the respective strain.

quercetin and tryptanthrin when worms were grown on *skn-1* RNAi (Fig. 6A), although the effect was smaller than initially observed. This suggests that the effects of the compounds on locomotion are mostly due to improvement in motor neuron development (Fig. 5E, F) and only to a small extent due to *skn-1* activation in muscles. EGL-19 is a

calcium channel and oxidative stress interferes with calcium signaling in the apoptosis pathway (Kruman and Mattson, 1999; Orrenius et al., 2003), therefore we tested this pathway using RNAi against the caspase gene *ced-3*, which surprisingly inhibited the beneficial effect of quercetin and tryptanthrin on locomotion (Fig. 6B). This suggests that





induction of non-neuronal apoptosis during development may be a mechanism important for the protective function of the tested polyphenols.

#### 4. Discussion

Drug screens in *C. elegans* are an increasingly popular tool to identify new bioactive compounds, their targets, cellular and pathologic pathways, and have contributed greatly to the identification of novel therapy-related compounds (Kwok et al., 2006; O'Reilly et al., 2014). Here, we used this approach to rescue locomotion and motor neuronal deficits in mutant strains that can be used to model ASD, with the aim to identify (1) possible underlying pathways of specific gene mutations that in humans can be causative for ASD, and (2) potential compounds for drug development in the treatment of ASD core symptoms. Notably, the drug library we screened contained many FDA-approved drugs allowing for rapid translation to preclinical settings. On a different note, the *C. elegans* mutant strains of ASD genes tested positive for locomotion deficits could be used as valuable tools to advance ASD research in more advanced models.

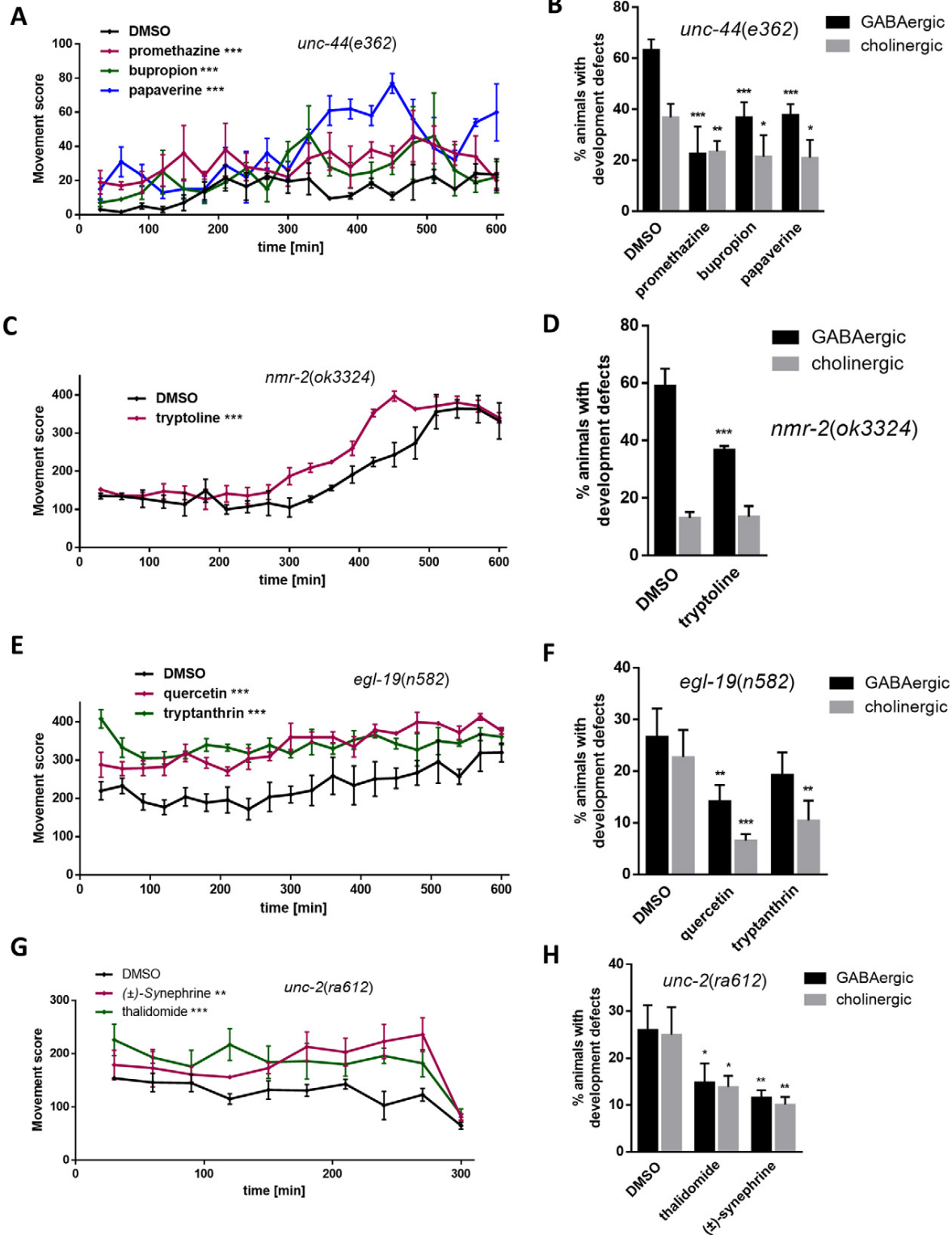
Our drug screen identified several compounds rescuing locomotion deficits in all tested mutants. The compound group that stands out the most was anticholinergic drugs, what could be considered a nonspecific effect, as data from other groups and in other model animals show that anticholinergic drugs are able to induce motor activity (Aquilonius et al., 1972; Sipos et al., 1999; Watanabe and Shimizu, 1989). Notably, they are sometimes used in the treatment of ASD (Aman et al., 2003) and other neurological diseases like Parkinson's disease, where they were shown to increase motor control (Cooper et al., 1992), and could be considered a positive control in our drug screen. These drugs show the strongest effect in *unc-44(e362)* mutants, where 20.4% of all positive compounds are anticholinergics that on average increase locomotion to 183% compared to the control values. *nmr-2(ok3324)* has with 19.5% of all drugs and a locomotion increase to 133.7% the second highest rates (Fig. 3 A, D, F). Interestingly, these two strains show the most damage in the GABAergic motor neuron system with about 60% of all animals affected (Fig. 4 A). Because the locomotion deficits in these strains may be due to the large amount of GABAergic motor neuron dystrophy, the cholinergic system, especially its receptors, by contrast is healthier and therefore better accessible for anticholinergic drugs. Thus, although the anticholinergic molecules as a group may not be more effective than the other molecules identified, the possibility remains that excitatory/inhibitory imbalances may be a core deficit in ASD and warrants further investigation (Rubenstein and Merzenich, 2003).

*unc-44* is the orthologue of the human *ANK2* gene, which encodes for ankyrin B expressed in the brain and muscles (Otsuka et al., 1995). This protein is essential for polarized distribution of membrane proteins such as voltage gated  $\text{Na}^+$  channels,  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchangers and  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPases. Four *de novo* loss-of-function variants in the human *ANK2* gene have been found in ASD patients (De Rubeis et al., 2014; Iossifov et al., 2014; Iossifov et al., 2012; Willsey et al., 2013). Based on the combination of these *de novo* mutations in patients and the very low frequency of mutations in controls, *ANK2* has been identified as a strong candidate to be an ASD risk gene (Iossifov et al., 2015). In *C. elegans*, *unc-44* has been shown to be essential for the development of the sex myoblasts and axonal guidance (Branda and Stern, 2000; Otsuka et al.,

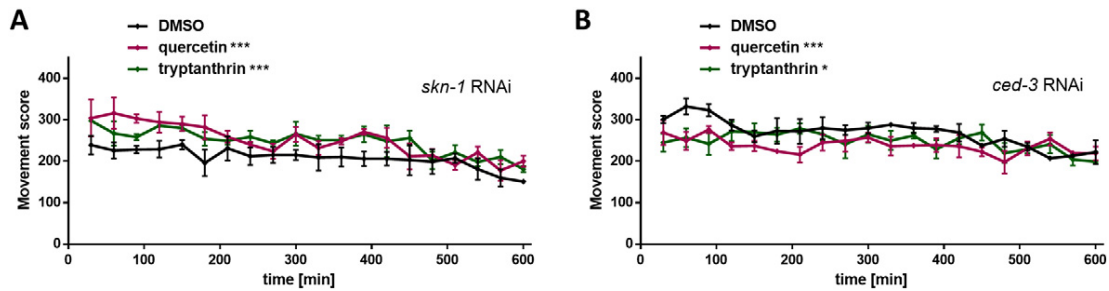
1995). *unc-44* is expressed in most tissues and loss-of-function mutants exhibit pleiotropic phenotypes, such as small size, motor deficits, and various neuronal defects, for instance failed neuron and axon migration (Chen et al., 2001; Hedgecock et al., 1985; Otsuka et al., 1995), which our results confirmed. *unc-44* has also been shown to play a role in maintaining the positions of neurons (Zhou et al., 2008). One of the 49 compounds found to rescue the phenotype of *unc-44(e362)* mutants, which exhibited the strongest phenotype under all variations, was gabaculine, a naturally occurring compound that is known to increase GABA levels via inhibition of GABA degradation and reuptake inhibition (Allan et al., 1977). While being a strong neurotoxin at higher concentrations, it had beneficial effects in *unc-44(e362)* at the doses we used (20  $\mu\text{M}$ ), suggesting that GABA signaling is involved in the phenotype characteristics, which was also confirmed by testing GABAergic axonal dystrophy and neuronal loss (Fig. 4A). With the antipsychotic promethazine, the antidepressant bupropion and the antispasmodic papaverine, we tested a wide variety of neurologic drugs specifically towards their ability to rescue axonal dystrophy and loss of motor neurons and found that bupropion was especially potent. To our knowledge, neither promethazine, nor bupropion, nor papaverine have yet been tested in the context of ASD in humans or model organisms.

62 compounds were found to rescue the locomotion deficit in *nmr-2(ok3324)*. In worms, *nmr-2* – NMDA (N-methyl-D-aspartate)-type glutamate-gated cation channel – is one of two subtypes in a class of glutamate receptors that is important for synaptic plasticity and the development and function of the nervous system (Brookie et al., 2001). Together with *nmr-1*, *nmr-2* plays an important role in modulation of memory of a learned avoidance response (Kano et al., 2008). Its human orthologue, GRIN2B, has been strongly associated with ASD and other neurological disorders (Iossifov et al., 2015; Myers et al., 2011; O'Roak et al., 2011; Yoo et al., 2012). In contrast to the other mutant strains we picked for the drug screen, not much is known about *nmr-2* in worms, but its role in memory and locomotion, as well as the strong connection to ASD in humans makes it an interesting gene to study in regards to ASD in *C. elegans*. To confirm the role of *nmr-2* in motor neuronal development we performed a 'rescue' experiment by injecting a cosmid containing a WT copy of *nmr-2* in the *nmr-2(ok3324)* mutant background to investigate if *nmr-2* loss-of-function is indeed responsible for the phenotypes we observed. The 'rescued' strains showed an increase in locomotion and beneficial effects on the GABAergic system, establishing the role of *nmr-2* in these phenotypes, especially as important mediator of GABAergic neuronal integrity. The drug screen in *nmr-2(ok3324)* mutants revealed metergoline as a positive hit, which is a dopamine and serotonin receptor ligand and points towards an involvement of these neurotransmitters in the locomotion phenotype of *nmr-2(ok3324)* (Miller et al., 1992). ( $\pm$ )-methoxyverapamil hydrochloride is a calcium channel blocker that is able to prevent inward calcium currents. Since excessive calcium overload triggers neuronal cell death, this could be a consequence of *nmr-2* mutation (Sun et al., 2014). CR 2249 is a putative memory enhancer that has been shown to be beneficial in learning and memory in other model organisms (Garofalo et al., 1996). Although to our knowledge, CR 2249 has not yet been tested in *C. elegans*, its action in *nmr-2(ok3324)* seems plausible, since *nmr-2* has an essential role in the memory of a learned avoidance response (Kano et al., 2008). Tryptolines are competitive selective inhibitors of the enzyme MAO-A (monoamine oxidase A) and additionally function as potent reuptake inhibitors of

**Fig. 4.** A and B The percentage of neurodevelopmental effects in GABAergic (black) and cholinergic (grey) neurons at L4 (A) and day 5 of adulthood (B). C Example pictures of GABAergic neurons in all strains tested expressing *unc-47p::mCherry*. WT displays continuous and uniform fluorescence along the axonal processes, whereas *unc-44*, *egl-19* and *nmr-2* mutants at L4 and *unc-2* at day 5 of adulthood display signs of neuronal loss. D GABAergic neurodevelopmental defects of *unc-44*, *egl-19* and *nmr-2* mutants at L4 and *unc-2* at day 5 of adulthood classified in axonal gaps, number of commissures, number of GABAergic cell bodies, ectopic axonal branches, and breaks  $>50 \mu\text{M}$  per worm. E Cholinergic neurodevelopmental defects of *unc-44*, *egl-19*, *nmr-2*, and *unc-2* mutants classified in axonal gaps, number of commissures, and breaks  $>50 \mu\text{M}$ . Shown is the average  $\pm$  standard deviation of at least 30 individual worms.



**Fig. 5.** A Movement score of *unc-44(e362)* treated with DMSO as control (black) and 20  $\mu$ M promethazine (pink), bupropion (green), and papaverine (blue) in L4. B Same compounds that improve locomotion in 5A and their effect on GABAergic (black) and cholinergic (grey) motor neurons in L4. C Movement score of *nmr-2(ok3324)* treated with DMSO as control (black) and 20  $\mu$ M tryptoline (pink) in L4. D Effect of tryptoline on GABAergic (black) and cholinergic (grey) motor neurons in *nmr-2(ok3324)* in L4. E Movement score of *egl-19(n582)* treated with DMSO as control (black) and 20  $\mu$ M quercetin (pink) and tryptanthrin (green) in L4. F Effect of quercetin and tryptanthrin on GABAergic (black) and cholinergic (grey) motor neurons in *egl-19(n582)* in L4. G Movement score of *unc-2(ra612)* treated with DMSO as control (black) and 20  $\mu$ M synephrine (pink) and thalidomide (green) in L4. H Effect of synephrine and thalidomide on GABAergic (black) and cholinergic (grey) motor neurons in *unc-2(ra612)* at day 5 of adulthood.



**Fig. 6.** A Movement score of *egl-19(n582)* treated with DMSO as control (black), 20  $\mu$ M quercetin (pink) and tryptanthrin (green) grown on *skn-1* RNAi. B Movement score of *egl-19(n582)* treated with DMSO as control (black), 20  $\mu$ M quercetin (pink), and tryptanthrin (green) grown on *ced-3* RNAi.

epinephrine and serotonin, with a greater selectivity for the latter (Rommelspacher et al., 1977). They have been discussed as drugs against Alzheimer's disease because of their neuroprotective and radical scavenging properties (Jiaranaikulwanitch et al., 2012). Next to its function as neurotransmitter, serotonin has recently been shown to be a key regulator of neurodevelopment (Engel et al., 2013), which makes the serotonin pathway an interesting potential candidate underlying *nmr-2(ok3324)* phenotypes.

*unc-2* is the worm orthologue of human *CACNA1A* (voltage-dependent calcium channel, P/Q type,  $\alpha$ -1A subunit). Mutations in the *CACNA1A* gene were identified in individuals with a spectrum of cognitive impairment including intellectual disability, executive dysfunction, ADHD and/or ASD (Damaj et al., 2015; Li et al., 2015a). In *C. elegans*, *unc-2* is expressed primarily in motor neurons and required for normal movement and neuronal migration and involved in serotonin and dopamine pathways (Schafer and Kenyon, 1995). Since *unc-2(ra612)* showed locomotion deficits at the L4 larval stage, but motor neuron defects only at day 5 of adulthood, it is not clear if impaired neurodevelopment contributes to this phenotype. However, given its involvement in the serotonin pathways it seems likely. The immunomodulating drug thalidomide and the alkaloid ( $\pm$ )-synephrine significantly improved phenotypes caused by loss-of-function of *unc-2*. Alkaloids are a heterogeneous group of naturally occurring compounds that contain nitrogen and are widely used in pharmacology including the treatment of mental illnesses. In individuals with ASD, the alkaloid nicotine has been successfully used to treat aggression (Van Schalkwyk et al., 2015). ( $\pm$ )-synephrine is chemically related to adrenalin and norepinephrine and has adrenergic properties. Its interaction with the serotonin receptor suggests that it might be able to correct serotonin signaling in an *unc-2* background (Hibino et al., 2009).

*egl-19* is the worm orthologue of human *CACNA1C* that codes for an  $\alpha$ -1 subunit of a voltage-dependent calcium channel, which mediates the influx of calcium ions into the cell upon membrane polarization. *CACNA1C* mutations are causative for Timothy syndrome, a condition that affects multiple organs and leads to characteristic features of ASD and schizophrenia, and most likely for non-Timothy syndrome cases of ASD as well (Cross-Disorder Group of the Psychiatric Genomics, 2013; Li et al., 2015b; Splawski et al., 2004). *egl-19* is expressed in *C. elegans* muscle and neurons and is essential for muscle contraction, locomotion, mating, egg-laying and feeding. It facilitates inward calcium currents into cholinergic and GABA motor neurons and myocytes as a first step of action potentials (Gao and Zhen, 2011; Liu et al., 2014). In contrast to humans, where action potentials start with sodium influx through voltage-gated  $\text{Na}^+$  channels, *C. elegans* uses calcium for carrying excitatory inward currents since it lacks genes encoding  $\text{Na}^+$  channels (Bargmann, 1998). Since loss-of-function *egl-19* mutations lead to embryonic death we used the hypomorphic mutant *egl-19(n582)* in our study (Lee et al., 1997). The drug screen revealed that the class of naturally occurring polyphenols like flavonoids, alkaloids, and furanocoumarins, which are produced as defense mechanisms against a variety of stressors, such as pathogens, insects and herbivores in plants or

fungi, are overrepresented in the drugs that improve the impaired motor phenotype in *egl-19(n582)*. Many of these compounds have been shown to be involved in the regulation of redox homeostasis, as either pro- or antioxidants depending on the milieu and gene expression of the exposed individual (Chobot et al., 2013). A common shared mechanism of these compounds is the induction of oxidative stress, describing the increase of intracellular levels of ROS, causing damage to macromolecules like proteins, lipids, and DNA (Schieber and Chandel, 2014). However, their reported antioxidant effects could be due to a transcriptional adaption to oxidative stress that increases the expression of defense genes like superoxide dismutase, catalase, or glutathione (Afanas'ev, 2010; Zarse et al., 2011). We tested the flavonoid quercetin and the indoloquinazoline alkaloid tryptanthrin, which have similar properties, including antibacterial, antifungal, antiprotozoal, antiparasitic and anticancerous activities (Jahng, 2013; Magesh et al., 2012). Both compounds have been shown to mediate a majority of their effects via activation of the Nrf2 transcription factor and subsequent expression of antioxidant genes (Moon et al., 2014; Tanigawa et al., 2007). Whereas tryptanthrin had so far not been tested in *C. elegans*, quercetin has been shown to increase stress resistance and lifespan in worms (Kampkotter et al., 2008), notably independent of the Nrf2 orthologue *skn-1* (Pietsch et al., 2008). Here we have shown that it has protective properties in neurodevelopment and restores locomotion in an *egl-19* background independently of non-neuronal *skn-1*, but dependent on the caspase *ced-3*, which is required for apoptosis. Notably, neurons in *C. elegans* show impaired sensitivity to RNAi. Apoptosis is essential during worm development and ROS signaling is strongly linked to functioning apoptotic processes (Simon et al., 2000), including induction of apoptosis by natural compounds (Kang et al., 2004; Nakazato et al., 2005). We speculate that impaired calcium signaling due to mutation of *egl-19* leads to deficient ROS signaling within myocytes and motor neurons, resulting in impaired apoptosis induction during development, eventually causing neuronal loss and locomotion impairment. Quercetin and tryptanthrin may improve ROS homeostasis, and/or lead to adaptive gene expression to counteract *egl-19* phenotypes.

In summary, the *C. elegans* genome possesses a number of genes that are orthologues of genes associated with ASD. We identified a number of worm strains with phenotypes lending themselves to chemical screening efforts to find molecules that compensate for the loss of activity of genes linked to ASD. Our chemical-genetic approach using *C. elegans* and ASD gene orthologues identified a number of compounds that restored activity at the behavioral and neuronal morphology levels. These strains and molecules may help guide future ASD research, including translational approaches in other model organisms and eventually humans.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2017.03.022>.

#### Declaration of interest

The authors declare no conflict of interest.



## Acknowledgements

This study was funded by a Simons Foundation (313384) Autism Research Initiative (SFARI) Explorer Award to JAP. KS was supported by funding from the Fonds de Recherche Santé Québec (FRSQ) and the Canadian Institutes of Health Research (CIHR; funding reference number 146698). We gratefully acknowledge Claudia Maios for drug screening efforts, and Sarah Peyrard for technical assistance.

## References

- (APA), A.P.A., 2013. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders: DSM-5. fifth ed. APA, Washington, D.C.
- Afanas'ev, I., 2010. Signaling and damaging functions of free radicals in aging-free radical theory, hormesis, and TOR. *Aging Dis.* 1, 75–88.
- Allan, R.D., Johnston, G.A., Twitichin, B., 1977. Effects of gabaculine on the uptake, binding and metabolism of GABA. *Neurosci. Lett.* 4, 51–54.
- Aman, M.G., Lam, K.S., Collier-Crespin, A., 2003. Prevalence and patterns of use of psychoactive medicines among individuals with autism in the Autism Society of Ohio. *J. Autism Dev. Disord.* 33, 527–534.
- Aquilonius, S.M., Lundholm, B., Winblad, B., 1972. Effects of some anticholinergic drugs on cortical acetylcholine release and motor activity in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 20, 224–230.
- Bargmann, C.I., 1998. Neurobiology of the *Caenorhabditis elegans* genome. *Science* 282, 2028–2033.
- Bessa, C., Maciel, P., Rodrigues, A.J., 2013. Using *C. elegans* to decipher the cellular and molecular mechanisms underlying neurodevelopmental disorders. *Mol. Neurobiol.* 48, 465–489.
- Branda, C.S., Stern, M.J., 2000. Mechanisms controlling sex myoblast migration in *Caenorhabditis elegans* hermaphrodites. *Dev. Biol.* 226, 137–151.
- Brenner, S., 1974. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77, 71–94.
- Brockie, P.J., Madsen, D.M., Zheng, Y., Mellem, J., Maricq, A.V., 2001. Differential expression of glutamate receptor subunits in the nervous system of *Caenorhabditis elegans* and their regulation by the homeodomain protein UNC-42. *J. Neurosci.* 21, 1510–1522.
- Bulik-Sullivan, B.K., Loh, P.R., Finucane, H.K., Ripke, S., Yang, J., Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics, C., Patterson, N., Daly, M.J., Price, A.L., Neale, B.M., 2015. LD score regression distinguishes confounding from polygenicity in genome-wide association studies. *Nat. Genet.* 47, 291–295.
- Calahorra, F., 2014. Conserved and divergent processing of neuroigin and neurexin genes from the nematode *C. elegans* to human. *Invertebr. Neurosci.* 14, 79–90.
- Calahorra, F., Alejandre, E., Ruiz-Rubio, M., 2009. Osmotic avoidance in *Caenorhabditis elegans*: synaptic function of two genes, orthologues of human NRXN1 and NLGN1, as candidates for autism. *J. Vis. Exp.*
- Chen, L., Ong, B., Bennett, V., 2001. LAD-1, the *Caenorhabditis elegans* L1CAM homologue, participates in embryonic and gonadal morphogenesis and is a substrate for fibroblast growth factor receptor pathway-dependent phosphotyrosine-based signaling. *J. Cell Biol.* 154, 841–855.
- Chobot, V., Kubcova, L., Bachmann, G., Hadacek, F., 2013. Versatile redox chemistry complicates antioxidant capacity assessment: flavonoids as milieu-dependent anti- and pro-oxidants. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 11830–11841.
- Cooper, J.A., Sagar, H.J., Doherty, S.M., Jordan, N., Tidswell, P., Sullivan, E.V., 1992. Different effects of dopaminergic and anticholinergic therapies on cognitive and motor function in Parkinson's disease. A follow-up study of untreated patients. *Brain* 115 (Pt 6), 1701–1725.
- Cross-Disorder Group of the Psychiatric Genomics, C., 2013. Identification of risk loci with shared effects on five major psychiatric disorders: a genome-wide analysis. *Lancet* 381, 1371–1379.
- Cross-Disorder Group of the Psychiatric Genomics, Lee, S.H., Ripke, S., Neale, B.M., Faraone, S.V., Purcell, S.M., Perlis, R.H., Mowry, B.J., Thapar, A., Goddard, M.E., Witte, J.S., Absher, D., Agartz, I., Akil, H., Amin, F., Andreassen, O.A., Anjorin, A., Anney, R., Anttila, V., Arking, D.E., Asherson, P., Azevedo, M.H., Backlund, L., Badner, J.A., Bailey, A.J., Banaschewski, T., Barchas, J.D., Barnes, M.R., Barrett, T.B., Bass, N., Battaglia, A., Bauer, M., Bayes, M., Bellivier, F., Bergen, S.E., Berrettini, W., Betancur, C., Bettecken, T., Biederman, J., Binder, E.B., Black, D.W., Blackwood, D.H., Bloss, C.S., Boehnke, M., Boomsma, D.I., Breen, G., Breuer, R., Bruggeman, R., Cormican, P., Buccola, N.G., Buitelaar, J.K., Bunney, W.E., Buxbaum, J.D., Byerley, W.F., Byrne, E.M., Caesar, S., Cahn, W., Cantor, R.M., Casas, M., Chakravarti, A., Chambert, K., Choudhury, K., Cichon, S., Cloninger, C.R., Collier, D.A., Cook, E.H., Coon, H., Cormand, B., Corvin, A., Coryell, W.H., Craig, D.W., Craig, I.W., Crosbie, J., Cuccaro, M.L., Curtis, D., Czamara, D., Datta, S., Dawson, G., Day, R., De Geus, E.J., Degenhardt, F., Djurovic, S., Donohoe, G.J., Doyle, A.E., Duan, J., Dudbridge, F., Duketin, E., Ebsstein, R.P., Edenberg, H.J., Elib, J., Ennis, S., Etain, B., Fanous, A., Farmer, A.E., Ferrier, I.N., Flickinger, M., Fombonne, E., Foroud, T., Frank, J., Franke, B., Fraser, C., Freedman, R., Freimer, N.B., Freitag, C.M., Friedl, M., Frisen, L., Gallagher, L., Gejman, P.V., Georgieva, L., Gershon, E.S., Geschwind, D.H., Giegling, I., Gill, M., Gordon, S.D., Gordon-Smith, K., Green, E.K., Greenwood, T.A., Grice, D.E., Gross, M., Grozeva, D., Guan, W., Gurling, H., De Haan, L., Haines, J.L., Hakonarson, H., Hallmayer, J., Hamilton, S.P., Hamshere, M.L., Hansen, T.F., Hartmann, A.M., Hautzinger, M., Heath, A.C., Henders, A.K., Herms, S., Hickie, I.B., Hipolito, M., Hoefels, S., Holmans, P.A., Holsboer, F., Hoogendijk, W.J., Hottenga, J.J., Hultman, C.M., Hus, V., Ingason, A., Ising, M., Jamain, S., Jones, E.G., Jones, I., Jones, L., Tzeng, J.Y., Kahler, A.K., Kahn, R.S., Kandaswamy, R., Keller, M.C., Kennedy, J.L., Kenny, E., Kent, L., Kim, Y., Kirou, G.K., Klauck, S.M., Klei, L., Knowles, J.A., Kohli, M.A., Koller, D.L., Konte, B., Korszun, A., Krabbendam, L., Krasucki, R., Kuntsi, J., Kwan, P., Landen, M., Langstrom, N., Lathrop, M., Lawrence, J., Lawson, W.B., Leboyer, M., Ledbetter, D.H., Lee, P.H., Lencz, T., Lesch, K.P., Levinson, D.F., Lewis, C.M., Li, J., Lichtenstein, P., Lieberman, J.A., Lin, D.Y., Linszen, D.H., Liu, C., Lohoff, F.W., Loo, S.K., Lord, C., Lowe, J.K., Lucae, S., Macintyre, D.J., Madden, P.A., Maestrini, E., Magnusson, P.K., Mahon, P.B., Maier, W., Malhotra, A.K., Mane, S.M., Martin, C.L., Martin, N.G., Mattheisen, M., Matthews, K., Mattingdal, M., McCarrroll, S.A., McGhee, K.A., McGough, J.J., McGrath, P.J., McGuffin, P., McInnis, M.G., McIntosh, A., McKinney, R., McLean, A.W., McMahon, F.J., McMahon, W.M., McQuillan, A., Medeiros, H., Medland, S.E., Meier, S., Melle, I., Meng, F., Meyer, J., Middeldorp, C.M., Middleton, L., Milanova, V., Miranda, A., Monaco, A.P., Montgomery, G.W., Moran, J.L., Moreno-De-Luca, D., Morken, G., Morris, D.W., Morrow, E.M., Moskvina, V., Muglia, P., Muhleisen, T.W., Muir, W.J., Muller-Myhsok, B., Murtha, M., Myers, R.M., Myin-Grmeys, I., Neale, M.C., Nelson, S.F., Nievergelt, C.M., Nikolov, I., Nimgaonkar, V., Nolen, W.A., Nothen, M.M., Nurnberger, J.L., Nwulia, E.A., Nyholt, D.R., O'Dushlaine, C., Oades, R.D., Olincy, A., Oliveira, G., Olsen, L., Ophoff, R.A., Osby, U., Owen, M.J., Palotie, A., Parr, J.R., Paterson, A.D., Pato, C.N., Pato, M.T., Penninx, B.W., Pergadia, M.L., Pericak-Vance, M.A., Pickard, B.S., Pimm, J., Piven, J., Posthuma, D., Potash, J.B., Poustka, F., Propping, P., Puri, V., Quedsted, D.J., Quinn, E.M., Ramos-Quiroga, J.A., Rasmussen, H.B., Raychaudhuri, S., Rehnstrom, K., Reif, A., Ribases, M., Rice, J.P., Rietschel, M., Roeder, K., Roeyers, H., Rossin, L., Rothenberger, A., Rouleau, G., Ruderfer, D., Rujescu, D., Sanders, A.R., Sanders, S.J., Santangelo, S.L., Sergeant, J.A., Schachar, R., Schalling, M., Schatzberg, A.F., Scheftner, W.A., Schellenberg, G.D., Scherer, S.W., Schork, N.J., Schulze, T.G., Schumacher, J., Schwarz, M., Scolnick, E., Scott, L.J., Shi, J., Shilling, P.D., Shyn, S.I., Silverman, J.M., Slager, S.L., Smalley, S.L., Smit, J.H., Smith, E.N., Sonuga-Barke, E.J., St Clair, D., State, M., Steffens, M., Steinhausen, H.C., Strauss, J.S., Strohmaier, J., Stroup, T.S., Sutcliffe, J.S., Szatmari, P., Szelienger, S., Thirumalai, S., Thompson, R.C., Todorov, A.A., Tozzi, F., Treutlein, J., Uhr, M., van den Oord, E.J., Van Grootheest, G., Van Os, J., Vicente, A.M., Vieland, V.J., Vincent, J.B., Visscher, P.M., Walsh, C.A., Wassink, T.H., Watson, S.J., Weissman, M.M., Werge, T., Wienker, T.F., Wijsman, E.M., Willemsen, G., Williams, N., Willsey, A.J., Witt, S.H., Xu, W., Young, A.H., Yu, T.W., Zammit, S., Zandi, P.P., Zhang, P., Zitman, F.G., Zollner, S., Devlin, B., Kelsoe, J.R., Sklar, P., Daly, M.J., O'Donovan, M.C., Craddock, N., Sullivan, P.F., Smoller, J.W., Kendler, K.S., Wray, N.R., International Inflammatory Bowel Disease Genetics, C., 2013. Genetic relationship between five psychiatric disorders estimated from genome-wide SNPs. *Nat. Genet.* 45, 984–994.
- Dalsgaard, S., Nielsen, H.S., Simonsen, M., 2013. Five-fold increase in national prevalence rates of attention-deficit/hyperactivity disorder medications for children and adolescents with autism spectrum disorder, attention-deficit/hyperactivity disorder, and other psychiatric disorders: a Danish register-based study. *J. Child Adolesc. Psychopharmacol.* 23, 432–439.
- Damaj, L., Lupien-Meilleur, A., Lortie, A., Riou, E., Ospina, L.H., Gagnon, L., Vanasse, C., Rossignol, E., 2015. CACNA1A haploinsufficiency causes cognitive impairment, autism and epileptic encephalopathy with mild cerebellar symptoms. *Eur. J. Hum. Genet.* 23, 1505–1512.
- De Rubeis, S., He, X., Goldberg, A.P., Poultney, C.S., Samocha, K., Cicek, A.E., Kou, Y., Liu, L., Fromer, M., Walker, S., Singh, T., Klei, L., Kosmicki, J., Shih-Chen, F., Aleksic, B., Biscaldi, M., Bolton, P.F., Brownfeld, J.M., Cai, J., Campbell, N.G., Carracedo, A., Chahrour, M.H., Chiocchetti, A.G., Coon, H., Crawford, E.L., Curran, S.R., Dawson, G., Duketin, E., Fernandez, B.A., Gallagher, L., Geller, E., Guter, S.J., Hill, R.S., Ionita-Laza, J., Jimenez Gonzalez, P., Kilpinen, H., Klauck, S.M., Kolevzon, A., Lee, I., Lei, J., Lei, J., Lehtimaki, T., Lin, C.F., Ma'ayan, A., Marshall, C.R., McInnes, A.L., Neale, B., Owen, M.J., Ozaki, N., Parellada, M., Parr, J.R., Purcell, S., Puura, K., Rajagopalan, D., Rehnstrom, K., Reichenberger, A., Sabo, A., Sachse, M., Sanders, S.J., Schafer, C., Schulte-Ruther, M., Skuse, D., Stevens, C., Szatmari, P., Tammimies, K., Valladares, O., Voran, A., Li-San, W., Weiss, L.A., Willsey, A.J., Yu, T.W., Yuen, R.K., Study, D.D.D., Homozygosity Mapping Collaborative for, A., Consortium, U.K., Cook, E.H., Freitag, C.M., Gill, M., Hultman, C.M., Lehner, T., Palotie, A., Schellenberg, G.D., Sklar, P., State, M.W., Sutcliffe, J.S., Walsh, C.A., Scherer, S.W., Zwick, M.E., Baret, J.C., Cutler, D.J., Roeder, K., Devlin, B., Daly, M.J., Buxbaum, J.D., 2014. Synaptic, transcriptional and chromatin genes disrupted in autism. *Nature* 515, 209–215.
- Ding, B., 2015. Gene expression in maturing neurons: regulatory mechanisms and related neurodevelopmental disorders. *Sheng Li Xue Bao* 67, 113–133.
- Dykens, E.M., 2015. Family adjustment and interventions in neurodevelopmental disorders. *Curr. Opin. Psychiatry* 28, 121–126.
- Elder, J.H., Brasher, S., Alexander, B., 2016. Identifying the barriers to early diagnosis and treatment in underserved individuals with autism Spectrum disorders (ASD) and their families: a qualitative study. *Issues Ment. Health Nurs.* 37, 412–420.
- Engel, M., Smidt, M.P., van Hooft, J.A., 2013. The serotonin 5-HT3 receptor: a novel neurodevelopmental target. *Front. Cell. Neurosci.* 7, 76.
- Fernandes, E., Toste, S.A., Lima, J.L., Reis, S., 2003. The metabolism of sulindac enhances its scavenging activity against reactive oxygen and nitrogen species. *Free Radic. Biol. Med.* 35, 1008–1017.
- Ferreira, P., Cardoso, T., Ferreira, F., Fernandes-Ferreira, M., Piper, P., Sousa, M.J., 2014. *Mentha piperita* essential oil induces apoptosis in yeast associated with both cytosolic and mitochondrial ROS-mediated damage. *FEMS Yeast Res.* 14, 1006–1014.
- Gadke, D.L., McKinney, C., Oliveros, A., 2016. Autism spectrum disorder symptoms and comorbidity in emerging adults. *Child Psychiatry Hum. Dev.* 47, 194–201.
- Gao, S., Zhen, M., 2011. Action potentials drive body wall muscle contractions in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 2557–2562.
- Garofalo, P., Colombo, S., Lanza, M., Revel, L., Makovec, F., 1996. CR 2249: a new putative memory enhancer. *Behavioural studies on learning and memory in rats and mice. J. Pharm. Pharmacol.* 48, 1290–1297.
- Gaugler, T., Klei, L., Sanders, S.J., Bodea, C.A., Goldberg, A.P., Lee, A.B., Mahajan, M., Manaa, D., Pawitan, Y., Reichert, J., Ripke, S., Sandin, S., Sklar, P., Svantesson, O., Reichenberger, A., Hultman, C.M., Devlin, B., Roeder, K., Buxbaum, J.D., 2014. Most genetic risk for autism resides with common variation. *Nat. Genet.* 46, 881–885.

- Grzadzinski, R., Dick, C., Lord, C., Bishop, S., 2016. Parent-reported and clinician-observed autism spectrum disorder (ASD) symptoms in children with attention deficit/hyperactivity disorder (ADHD): implications for practice under DSM-5. *Mol Autism* 7, 7.
- Hallmayer, J., Cleveland, S., Torres, A., Phillips, J., Cohen, B., Torigoe, T., Miller, J., Fedele, A., Collins, J., Smith, K., Lotspeich, L., Croen, L.A., Ozonoff, S., Lajonchere, C., Grether, J.K., Risch, N., 2011. Genetic heritability and shared environmental factors among twin pairs with autism. *Arch. Gen. Psychiatry* 68, 1095–1102.
- Hamacher-Brady, A., Stein, H.A., Turschner, S., Toegel, L., Mora, R., Jennewein, N., Efferth, T., Eils, R., Brady, N.R., 2011. Artesunate activates mitochondrial apoptosis in breast cancer cells via iron-catalyzed lysosomal reactive oxygen species production. *J. Biol. Chem.* 286, 6587–6601.
- Hanson, E., Bernier, R., Porche, K., Jackson, F.I., Goin-Kochel, R.P., Snyder, L.G., Snow, A.V., Wallace, A.S., Campe, K.L., Zhang, Y., Chen, Q., D'Angelo, D., Moreno-De-Luca, A., Orr, P.T., Boomer, K.B., Evans, D.W., Kanne, S., Berry, L., Miller, F.K., Olson, J., Sherr, E., Martin, C.L., Ledbetter, D.H., Spiro, J.E., Chung, W.K., Simons Variation in Individuals Project, C., 2015. The cognitive and behavioral phenotype of the 16p11.2 deletion in a clinically ascertained population. *Biol. Psychiatry* 77, 785–793.
- Hedgecock, E.M., Culotti, J.G., Thomson, J.N., Perkins, L.A., 1985. Axonal guidance mutants of *Caenorhabditis elegans* identified by filling sensory neurons with fluorescein dyes. *Dev. Biol.* 111, 158–170.
- Hibino, T., Yuzurihara, M., Kase, Y., Takeda, A., 2009. Synephrine, a component of *Evodiae Fructus*, constricts isolated rat aorta via adrenergic and serotonergic receptors. *J. Pharmacol. Sci.* 111, 73–81.
- Hobert, O., 2003. Behavioral plasticity in *C. elegans*: paradigms, circuits, genes. *J. Neurobiol.* 54, 203–223.
- Hobert, O., 2010. Neurogenesis in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *WormBook* 1–24.
- Hodnick, W.F., Duval, D.L., Pardini, R.S., 1994. Inhibition of mitochondrial respiration and cyanide-stimulated generation of reactive oxygen species by selected flavonoids. *Biochem. Pharmacol.* 47, 573–580.
- Howitz, K.T., Sinclair, D.A., 2008. Xenohormesis: sensing the chemical cues of other species. *Cell* 133, 387–391.
- Hu, W.F., Chahrour, M.H., Walsh, C.A., 2014. The diverse genetic landscape of neurodevelopmental disorders. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 15, 195–213.
- Hu, Z., Hom, S., Kudze, T., Tong, X.J., Choi, S., Aramuni, G., Zhang, W., Kaplan, J.M., 2012. Neurexin and neuroligin mediate retrograde synaptic inhibition in *C. elegans*. *Science* 337, 980–984.
- Iossifov, I., Levy, D., Allen, J., Ye, K., Ronemus, M., Lee, Y.H., Yamrom, B., Wigler, M., 2015. Low load for disruptive mutations in autism genes and their biased transmission. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, E5600–E5607.
- Iossifov, I., O'Roak, B.J., Sanders, S.J., Ronemus, M., Krumm, N., Levy, D., Stessman, H.A., Witherspoon, K.T., Vives, L., Patterson, K.E., Smith, J.D., Paepker, B., Nickerson, D.A., Dea, J., Dong, S., Gonzalez, L.E., Mandell, J.D., Mane, S.M., Murtha, M.T., Sullivan, C.A., Walker, M.F., Waqar, Z., Wei, L., Wilsey, A.J., Yamrom, B., Lee, Y.H., Grabowska, E., Dalkic, E., Wang, Z., Marks, S., Andrews, P., Leotta, A., Kendall, J., Hakker, I., Rosenbaum, J., Ma, B., Rodgers, L., Troge, J., Narzisi, G., Yoon, S., Schatz, M.C., Ye, K., McCombie, W.R., Shendure, J., Eichler, E.E., State, M.W., Wigler, M., 2014. The contribution of de novo coding mutations to autism spectrum disorder. *Nature* 515, 216–221.
- Iossifov, I., Ronemus, M., Levy, D., Wang, Z., Hakker, I., Rosenbaum, J., Yamrom, B., Lee, Y.H., Narzisi, G., Leotta, A., Kendall, J., Grabowska, E., Ma, B., Marks, S., Rodgers, L., Stepansky, A., Troge, J., Andrews, P., Bekritsky, M., Pradhan, K., Ghiban, E., Kramer, M., Parla, J., Demeter, R., Fulton, L.L., Fulton, R.S., Magrini, V.J., Ye, K., Darnell, J.C., Darnell, R.B., Mardis, E.R., Wilson, R.K., Schatz, M.C., McCombie, W.R., Wigler, M., 2012. De novo gene disruptions in children on the autistic spectrum. *Neuron* 74, 285–299.
- Ishige, K., Schubert, D., Sagara, Y., 2001. Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms. *Free Radic. Biol. Med.* 30, 433–446.
- Jahng, Y., 2013. Progress in the studies on tryptanthrin, an alkaloid of history. *Arch. Pharm. Res.* 36, 517–535.
- Jiaranaiikulwanitch, J., Govitrapong, P., Fokin, V.V., Vajragupta, O., 2012. From BACE1 inhibitor to multifunctionality of tryptoline and tryptamine triazole derivatives for Alzheimer's disease. *Molecules* 17, 8312–8333.
- Jospin, M., Qi, Y.B., Stawicki, T.M., Boulin, T., Schuske, K.R., Horvitz, H.R., Bessereau, J.L., Jorgensen, E.M., Jin, Y., 2009. A neuronal acetylcholine receptor regulates the balance of muscle excitation and inhibition in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Biol.* 7, e1000265.
- Kamath, R.S., Martinez-Campos, M., Zipperlen, P., Fraser, A.G., Ahringer, J., 2001. Effectiveness of specific RNA-mediated interference through ingested double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Genome Biol.* 2, RESEARCH0002.
- Kampkotter, A., Timpel, C., Zurawski, R.F., Ruhl, S., Chovolou, Y., Proksch, P., Watjen, W., 2008. Increase of stress resistance and lifespan of *Caenorhabditis elegans* by quercetin. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 149, 314–323.
- Kang, Y.H., Lee, E., Choi, M.K., Ku, J.L., Kim, S.H., Park, Y.G., Lim, S.J., 2004. Role of reactive oxygen species in the induction of apoptosis by alpha-tocopheryl succinate. *Int. J. Cancer* 112, 385–392.
- Kano, T., Brockie, P.J., Sassa, T., Fujimoto, H., Kawahara, Y., Iino, Y., Mellem, J.E., Madsen, D.M., Hosono, R., Maricq, A.V., 2008. Memory in *Caenorhabditis elegans* is mediated by NMDA-type ionotropic glutamate receptors. *Curr. Biol.* 18, 1010–1015.
- Kennedy, B.K., 2008. The genetics of ageing: insight from genome-wide approaches in invertebrate model organisms. *J. Intern. Med.* 263, 142–152.
- Kobayashi, D., Kondo, K., Uehara, N., Otokozawa, S., Tsuji, N., Yagihashi, A., Watanabe, N., 2002. Endogenous reactive oxygen species is an important mediator of miconazole antifungal effect. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 3113–3117.
- Kruman, I.I., Mattson, M.P., 1999. Pivotal role of mitochondrial calcium uptake in neural cell apoptosis and necrosis. *J. Neurochem.* 72, 529–540.
- Kubota, T., Mochizuki, K., 2016. Epigenetic effect of environmental factors on autism spectrum disorders. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 13.
- Kwok, T.C., Ricker, N., Fraser, R., Chan, A.W., Burns, A., Stanley, E.F., McCourt, P., Cutler, S.R., Roy, P.J., 2006. A small-molecule screen in *C. elegans* yields a new calcium channel antagonist. *Nature* 441, 91–95.
- Lala, S.V., Sajatovic, M., 2012. Medical and psychiatric comorbidities among elderly individuals with bipolar disorder: a literature review. *J. Geriatr. Psychiatry Neurol.* 25, 20–25.
- Lee, R.Y., Lobel, L., Hengartner, M., Horvitz, H.R., Avery, L., 1997. Mutations in the alpha1 subunit of an L-type voltage-activated Ca<sup>2+</sup> channel cause myotonia in *Caenorhabditis elegans*. *EMBO J.* 16, 6066–6076.
- Li, J., You, Y., Yue, W., Jia, M., Yu, H., Lu, T., Wu, Z., Ruan, Y., Wang, L., Zhang, D., 2015a. Genetic evidence for possible involvement of the calcium channel gene CACNA1A in autism pathogenesis in Chinese Han population. *PLoS One* 10, e0142887.
- Li, J., Zhao, L., You, Y., Lu, T., Jia, M., Yu, H., Ruan, Y., Yue, W., Liu, J., Lu, L., Zhang, D., Wang, L., 2015b. Schizophrenia related variants in CACNA1C also confer risk of autism. *PLoS One* 10, e0133247.
- Liu, P., Chen, B., Wang, Z.W., 2014. SLO-2 potassium channel is an important regulator of neurotransmitter release in *Caenorhabditis elegans*. *Nat. Commun.* 5, 5155.
- Lundstrom, S., Chang, Z., Rastam, M., Gillberg, C., Larsson, H., Anckarsater, H., Lichtenstein, P., 2012. Autism spectrum disorders and autistic like traits: similar etiology in the extreme end and the normal variation. *Arch. Gen. Psychiatry* 69, 46–52.
- Magesh, S., Chen, Y., Hu, L., 2012. Small molecule modulators of Keap1-Nrf2-ARE pathway as potential preventive and therapeutic agents. *Med. Res. Rev.* 32, 687–726.
- Maro, G.S., Gao, S., Olechwiec, A.M., Hung, W.L., Liu, M., Ozkan, E., Zhen, M., Shen, K., 2015. MADD-4/punctin and neurexin organize *C. elegans* GABAergic postsynapses through neurotrophin. *Neuron* 86, 1420–1432.
- McIntire, S.L., Jorgensen, E., Kaplan, J., Horvitz, H.R., 1993. The GABAergic nervous system of *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 364, 337–341.
- Mello, C., Fire, A., 1995. DNA transformation. *Methods Cell Biol.* 48, 451–482.
- Miller, K.J., King, A., Demchshyn, L., Niznik, H., Teitler, M., 1992. Agonist activity of sumatriptan and metergoline at the human 5-HT1D beta receptor: further evidence for a role of the 5-HT1D receptor in the action of sumatriptan. *Eur. J. Pharmacol.* 227, 99–102.
- Moon, S.Y., Lee, J.H., Choi, H.Y., Cho, I.J., Kim, S.C., Kim, Y.W., 2014. Tryptanthrin protects hepatocytes against oxidative stress via activation of the extracellular signal-regulated kinase/NF-E2-related factor 2 pathway. *Biol. Pharm. Bull.* 37, 1633–1640.
- Myers, R.A., Casals, F., Gauthier, J., Hamdan, F.F., Keebler, J., Boyko, A.R., Bustamante, C.D., Piton, A.M., Spiegelman, D., Henrion, E., Zilversmit, M., Hussin, J., Quinlan, J., Yang, Y., Lafreniere, R.G., Griffing, A.R., Stone, E.A., Rouleau, G.A., Awadalla, P., 2011. A population genetic approach to mapping neurological disorder genes using deep resequencing. *PLoS Genet.* 7, e1001318.
- Nakazato, T., Ito, K., Ikeda, Y., Kizaki, M., 2005. Green tea component, catechin, induces apoptosis of human malignant B cells via production of reactive oxygen species. *Clin. Cancer Res.* 11, 6040–6049.
- Network, A.A.D.D.M., 2014. Prevalence of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years. Centers for Disease Control and Prevention.
- O'Reilly, L.P., Luke, C.J., Perlmutter, D.H., Silverman, G.A., Pak, S.C., 2014. *C. elegans* in high-throughput drug discovery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 69–70, 247–253.
- O'Roak, B.J., Deriziotis, P., Lee, C., Vives, L., Schwartz, J.J., Girirajan, S., Karakoc, E., Mackenzie, A.P., Ng, S.B., Baker, C., Rieder, M.J., Nickerson, D.A., Bernier, R., Fisher, S.E., Shendure, J., Eichler, E.E., 2011. Exome sequencing in sporadic autism spectrum disorders identifies severe de novo mutations. *Nat. Genet.* 43, 585–589.
- Orrenius, S., Zhivotovskiy, B., Nicotera, P., 2003. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 552–565.
- Otreba, M., Beberok, A., Wrzesniok, D., Rok, J., Buszman, E., 2015. Effect of thioridazine on antioxidant status of HEMn-DP melanocytes. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 388, 1097–1104.
- Otsuka, A.J., Franco, R., Yang, B., Shim, K.H., Tang, L.Z., Zhang, Y.Y., Boontrakulpoontawee, P., Jayaprakash, A., Hedgecock, E., Wheaton, V.I., et al., 1995. An ankyrin-related gene (*unc-44*) is necessary for proper axonal guidance in *Caenorhabditis elegans*. *J. Cell Biol.* 129, 1081–1092.
- Pietsch, K., Saul, N., Menzel, R., Sturzenbaum, S.R., Steinberg, C.E., 2008. Quercetin mediated lifespan extension in *Caenorhabditis elegans* is modulated by age-1, daf-2, sek-1 and *unc-43*. *Biogerontology* 10, 565–578.
- Postorino, V., Fatta, L.M., Sanges, V., Giovagnoli, G., De Peppo, L., Vicari, S., Mazzone, L., 2016. Intellectual disability in autism spectrum disorder: investigation of prevalence in an Italian sample of children and adolescents. *Res. Dev. Disabil.* 48, 193–201.
- Robinson, E.B., St Pourcain, B., Anttila, V., Kosmicki, J.A., Bulik-Sullivan, B., Grove, J., Maller, J., Samocha, K.E., Sanders, S.J., Ripke, S., Martin, J., Hollegaard, M.V., Werge, T., Hougaard, D.M., i, P.-S.S.I.B.A.G., Neale, B.M., Evans, D.M., Skuse, D., Mortensen, P.B., Borglum, A.D., Ronald, A., Smith, G.D., Daly, M.J., 2016. Genetic risk for autism spectrum disorders and neuropsychiatric variation in the general population. *Nat. Genet.* 48, 552–555.
- Rommelspacher, H., Kauffmann, H., Cohnitz, C.H., Coper, H., 1977. Pharmacological properties of tetrahydronorharmane (tryptoline). *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 298, 83–91.
- Rubenstein, J.L., Merzenich, M.M., 2003. Model of autism: increased ratio of excitation/inhibition in key neural systems. *Genes Brain Behav.* 2, 255–267.
- Sanner, B.M., Meder, U., Zidek, W., Tepel, M., 2002. Effects of glucocorticoids on generation of reactive oxygen species in platelets. *Steroids* 67, 715–719.
- Santoro, V., Jia, R., Thompson, H., Nijhuis, A., Jeffery, R., Kiakos, K., Silver, A.R., Hartley, J.A., Hochhauser, D., 2016. Role of reactive oxygen species in the abrogation of oxaliplatin activity by cetuximab in colorectal cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 108, djv394.
- Schafer, W.R., Kenyon, C.J., 1995. A calcium-channel homologue required for adaptation to dopamine and serotonin in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 375, 73–78.
- Schieber, M., Chandell, N.S., 2014. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr. Biol.* 24, R453–R462.

- Sealey, L.A., Hughes, B.W., Sriskanda, A.N., Guest, J.R., Gibson, A.D., Johnson-Williams, L., Pace, D.G., Bagasra, O., 2016. Environmental factors in the development of autism spectrum disorders. *Environ. Int.* 88, 288–298.
- Selimovic, D., Badura, H.E., El-Khattouti, A., Soell, M., Porzig, B.B., Spernger, A., Ghanjati, F., Santourlidis, S., Haikel, Y., Hassan, M., 2013. Vinblastine-induced apoptosis of melanoma cells is mediated by Ras homologous A protein (Rho A) via mitochondrial and non-mitochondrial-dependent mechanisms. *Apoptosis* 18, 980–997.
- Simon, H.U., Haj-Yehia, A., Levi-Schaffer, F., 2000. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis* 5, 415–418.
- Singh, S.V., Srivastava, S.K., Choi, S., Lew, K.L., Antosiewicz, J., Xiao, D., Zeng, Y., Watkins, S.C., Johnson, C.S., Trump, D.L., Lee, Y.J., Xiao, H., Herman-Antosiewicz, A., 2005. Sulfoxaphane-induced cell death in human prostate cancer cells is initiated by reactive oxygen species. *J. Biol. Chem.* 280, 19911–19924.
- Sipos, M.L., Burchnell, V., Galbicka, G., 1999. Dose-response curves and time-course effects of selected anticholinergics on locomotor activity in rats. *Psychopharmacology* 147, 250–256.
- Smirnova, N.A., Haskew-Layton, R.E., Basso, M., Hushpulia, D.M., Payappilly, J.B., Speer, R.E., Ahn, Y.H., Rakhman, I., Cole, P.A., Pinto, J.T., Ratan, R.R., Gazaryan, I.G., 2011. Development of *Neh2*-luciferase reporter and its application for high throughput screening and real-time monitoring of *Nrf2* activators. *Chem. Biol.* 18, 752–765.
- Splawski, I., Timothy, K.W., Sharpe, L.M., Decher, N., Kumar, P., Bloise, R., Napolitano, C., Schwartz, P.J., Joseph, R.M., Condouris, K., Tager-Flusberg, H., Priori, S.G., Sanguinetti, M.C., Keating, M.T., 2004. *Ca(V)*<sub>1.2</sub> calcium channel dysfunction causes a multisystem disorder including arrhythmia and autism. *Cell* 119, 19–31.
- Stiernagle, T., 2006. Maintenance of *C. elegans*. *WormBook* 1–11.
- Sudhof, T.C., 2008. Neuroligins and neuroligins link synaptic function to cognitive disease. *Nature* 455, 903–911.
- Sun, L., Shay, J., McLeod, M., Roodhouse, K., Chung, S.H., Clark, C.M., Pirri, J.K., Alkema, M.J., Gabel, C.V., 2014. Neuronal regeneration in *C. elegans* requires subcellular calcium release by ryanodine receptor channels and can be enhanced by optogenetic stimulation. *J. Neurosci.* 34, 15947–15956.
- Tanigawa, S., Fujii, M., Hou, D.X., 2007. Action of *Nrf2* and *Keap1* in ARE-mediated *NQO1* expression by quercetin. *Free Radic. Biol. Med.* 42, 1690–1703.
- Tong, X.J., Hu, Z., Liu, Y., Anderson, D., Kaplan, J.M., 2015. A network of autism linked genes stabilizes two pools of synaptic GABA(A) receptors. *elife* 4, e09648.
- Tu, H., Pinan-Lucarre, B., Ji, T., Jospin, M., Bessereau, J.L., 2015. *C. elegans* Punctin clusters GABA(A) receptors via neuroligin binding and UNC-40/DCC recruitment. *Neuron* 86, 1407–1419.
- Turner, N., Li, J.Y., Gosby, A., To, S.W., Cheng, Z., Miyoshi, H., Taketo, M.M., Cooney, G.J., Kraegen, E.W., James, D.E., Hu, L.H., Li, J., Ye, J.M., 2008. Berberine and its more biologically available derivative, dihydroberberine, inhibit mitochondrial respiratory complex I: a mechanism for the action of berberine to activate AMP-activated protein kinase and improve insulin action. *Diabetes* 57, 1414–1418.
- Van Schalkwyk, G.I., Lewis, A.S., Qayyum, Z., Koslosky, K., Picciotto, M.R., Volkmar, F.R., 2015. Reduction of aggressive episodes after repeated transdermal nicotine administration in a hospitalized adolescent with autism spectrum disorder. *J. Autism Dev. Disord.* 45, 3061–3066.
- Vashlishan, A.B., Madison, J.M., Dybbs, M., Bai, J., Sieburth, D., Ch'ng, Q., Tavazoie, M., Kaplan, J.M., 2008. An RNAi screen identifies genes that regulate GABA synapses. *Neuron* 58, 346–361.
- Watanabe, H., Shimizu, H., 1989. Effect of anticholinergic drugs on striatal acetylcholine release and motor activity in freely moving rats studied by brain microdialysis. *Jpn. J. Pharmacol.* 51, 75–82.
- Willsey, A.J., Sanders, S.J., Li, M., Dong, S., Tebbenkamp, A.T., Muhle, R.A., Reilly, S.K., Lin, L., Fertuzinhos, S., Miller, J.A., Murtha, M.T., Bichsel, C., Niu, W., Cotney, J., Ercan-Sencicek, A.G., Gockley, J., Gupta, A.R., Han, W., He, X., Hoffman, E.J., Klei, L., Lei, J., Liu, W., Liu, L., Lu, C., Xu, X., Zhu, Y., Mane, S.M., Lein, E.S., Wei, L., Noonan, J.P., Roeder, K., Devlin, B., Sestan, N., State, M.W., 2013. Coexpression networks implicate human midfetal deep cortical projection neurons in the pathogenesis of autism. *Cell* 155, 997–1007.
- Xiao, Z., Huang, C., Wu, J., Sun, L., Hao, W., Leung, L.K., Huang, J., 2013. The neuroprotective effects of ipriflavone against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and amyloid beta induced toxicity in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Eur. J. Pharmacol.* 721, 286–293.
- Yi, L., Chen, C.Y., Jin, X., Zhang, T., Zhou, Y., Zhang, Q.Y., Zhu, J.D., Mi, M.T., 2012. Differential suppression of intracellular reactive oxygen species-mediated signaling pathway in vascular endothelial cells by several subclasses of flavonoids. *Biochimie* 94, 2035–2044.
- Yoo, H.J., Cho, I.H., Park, M., Yang, S.Y., Kim, S.A., 2012. Family based association of *GRIN2A* and *GRIN2B* with Korean autism spectrum disorders. *Neurosci. Lett.* 512, 89–93.
- Zarse, K., Bossecker, A., Muller-Kuhrt, L., Siems, K., Hernandez, M.A., Berendsohn, W.G., Birringer, M., Ristow, M., 2011. The phytochemical glaucarubinone promotes mitochondrial metabolism, reduces body fat, and extends lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Horm. Metab. Res.* 43, 241–243.
- Zhou, S., Opperman, K., Wang, X., Chen, L., 2008. *unc-44* ankyrin and *stn-2* gamma-syntrophin regulate *sax-7* *L1CAM* function in maintaining neuronal positioning in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 180, 1429–1443.
- Zini, R., Morin, C., Bertelli, A., Bertelli, A.A., Tillement, J.P., 1999. Effects of resveratrol on the rat brain respiratory chain. *Drugs Exp. Clin. Res.* 25, 87–97.

