



Université de Montréal

**Caractérisation de l'ubiquitin-fold modifieur (UFM1) dans un modèle *C. elegans***

par  
Julie Demers-Lamarche

Programmes de Biologie Moléculaire  
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la faculté de médecine  
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès Science (MSc)  
en Biologie Moléculaire

Décembre 2010  
©Julie Demers-Lamarche, 2010

Université de Montréal  
Faculté de médecine

Ce mémoire intitulé :  
**Caractérisation de l'ubiquitin-fold modifieur (UFM1) dans un modèle *C. elegans***

Présenté par :  
Julie Demers-Lamarche

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Richard Bertrand  
Président-rapporteur

Bernard Brais  
Directeur de recherche

Alex J. Parker  
Co-directeur

Louis St-Amant  
Membre du jury

## Résumé

L'ubiquitin-fold modifier (UFM1) fait partie de la classe 1 de la famille de protéine ubiquitin-like (Ubl). UFM1 et Ub ont très peu d'homologie de séquence, mais partagent des similarités remarquables au niveau de leur structure tertiaire. Tout comme l'Ub et la majorité des autres Ubls, UFM1 se lie de façon covalente à ses substrats par l'intermédiaire d'une cascade enzymatique. Il est de plus en plus fréquemment rapporté que les protéines Ubls sont impliquées dans des maladies humaines. Le gène *Ufm1* est surexprimé chez des souris de type MCP développant une ischémie myocardique et dans les îlots de Langerhans de patients atteints du diabète de type 2. UFM1 et ses enzymes spécifiques, UBA5, UFL1 et UFC1, sont conservés chez les métazoaires et les plantes suggérant un rôle important pour les organismes multicellulaires.

Le *Caenorhabditis elegans* est le modèle animal le plus simple utilisé en biologie. Sa morphologie, ses phénotypes visibles et ses lignées cellulaires ont été décrits de façon détaillée. De plus, son cycle de vie court permet de rapidement observer les effets de certains gènes sur la longévité. Ce modèle nous permet de facilement manipuler l'expression du gène *Ufm1* et de mieux connaître ses fonctions.

En diminuant l'expression du gène *ufm-1* chez le *C.elegans*, par la technique de l'ARN interférence par alimentation, nous n'avons observé aucun problème morphologique grave. Les vers ressemblaient aux vers

sauvages et possédaient un nombre de progéniture normal. Cependant, les vers sauvage exposés à l'ARNi d'*ufm-1* vivent significativement moins longtemps que les contrôles et ce, de façon indépendante de la voie de signalisation de l'insuline/IGF. Chez le *C. elegans* la longévité et la résistance au stress cellulaire sont intimement liées. Nous n'avons remarqué aucun effet d'*ufm-1* sur le stress thermal, osmotique ou oxydatif, mais il est requis pour la protection contre le stress protéotoxique. Il est également nécessaire au maintien de l'intégrité neuronale au cours du vieillissement des animaux. L'ensemble de nos données nous renseigne sur les fonctions putatives du gène Ufm1.

### **Mots clés**

*Caenorhabditis elegans*, UFM1, longévité, vieillissement, ARN interférence, Intégrité neuronale

## Abstract

The ubiquitin-fold modifier (UFM1) is part of the type 1 class of the family of ubiquitin-like protein (Ubl). UFM1 and Ub have very little sequence homology but share remarkable similarities in their tertiary structure. Like Ub and most other UBLs, UFM1 binds covalently to its substrates through an enzymatic cascade. It is frequently reported that UBLs are involved in human diseases. UFM-1 is overexpressed in mice developing a myocardial ischemia and in the islets of patients suffering from type 2 diabetes. UFM1 and its specific enzymes, UBA5, UFL1, and UFC1 are conserved in metazoans and plants suggesting an important role in multicellular organisms.

*Caenorhabditis elegans* is one of the the simplest animal models used in biology. Some features such as morphology, visible phenotypes and cell lineage have completely been described. The short lifecycle of *C. elegans* makes it easy to observe gene effects on longevity. This model allows us to easily manipulate the expression of the Ufm1 gene and learn more about its putative functions.

To study putative functions of Ufm1, we decreased the expression of *ufm-1* using RNA interference introduced through feeding. No gross morphological disturbances were observed; worms resembled wild type and had a normal brood size. However, worms exposed to *ufm-1* RNAi had a significantly shorter lifespan than the controls. This effect is independent of the insulin/IGF pathway, which is a major axis of longevity genetics. In

*C. elegans* longevity and cellular stress resistance are intimately linked. We have observed no effect of *ufm-1* on thermal, osmotic or oxidative stress, but it is required for protection against proteotoxic stress. It is also necessary to maintain neuronal integrity during aging. Together, our results shed light on putative functions of Ufm1 gene.

### **Key words**

*Caenorhabditis elegans*, UFM1, longevity, aging, RNA interference, neuronal integrity

## Table des matières

Résumé	iii
Mots clés	iv
Abstract	v
Key words	vi
Liste des tableaux	ix
Liste des figures du mémoire	x
Liste des figures de l'article	x
Liste des sigles et abréviations	xi
Remerciements	xiii
Chapitre 1 : Introduction	1
1.1 Le gène de l'ubiquitin-fold modifier .....	1
1.2 Modèle animal : <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	6
Chapitre 2 : Article : Role of <i>ufm-1</i> in protein homeostasis	10
2.1 Introduction à l'article : Role of <i>ufm-1</i> in protein homeostasis .....	10
2.2 Contribution des co-auteurs .....	12
2.3 Article: <i>ufm-1</i> regulates neuronal protein homeostasis in <i>C. elegans</i> .....	13
2.4 Conclusion de l'article.....	34



Chapitre 3 : Discussion	35
3.1 Conclusion du projet	35
3.1.1 Souche <i>C.elegans</i> délétère pour <i>ufm-1</i> .....	42
3.1.2 Caractérisation du maintien de l'intégrité cellulaire.....	42
3.1.3 Cibles protéiques d' <i>ufm-1</i> .....	43
Références :	44

## Liste des tableaux

Table 1: Liste des protéines impliquées dans la sumoylation chez les mammifères

## Liste des figures du mémoire

Figure 1: Alignement des protéines UFM1 et Ub

Figure 2: Comparaison des structures tertiaires d'UFM1 et d'Ub

Figure 3: Cycle de vie *C. elegans*

Figure 4: Voie de signalisation de l'ARN interférence

Figure 5: Réponse au stress induit par la tunicamycine

Figure 6: Tests de longévité et de paralysie

## Liste des figures de l'article

Figure 1: Characterization of *ufm-1*

Figure 2: *ufm-1* is required for normal worm lifespan

Figure 3: *ufm-1* is required for normal touch response

Figure 4: *ufm-1* is protective for axonal degeneration

Supplementary figure 1: Response to thermal, oxidative and osmotic stress.

Supplementary figure 2: Touch response of XQ3 and XQ4 strains.

## Liste des sigles et abréviations

Atg8: Autophagy related protein 8

ARN: Acide ribonucléique

ARNi: ARN interférence

*C. elegans*: *Caenorhabditis elegans*

E1: Enzyme d'activation

E2: Enzyme de conjugaison

E3: Enzyme de ligation

kDa: kilodalton

NEDD8: neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 8

PIAS3: protein inhibitor of activated STAT-3

PIAS $\gamma$ : protein inhibitor of activated STAT- $\gamma$

RAD23: UV excision repair protein RAD23 homologue A

RISC: RNA induced silencing complex

SUMO: Small ubiquitin-related modifier

siRNA: small interfering RNA

Ub: Ubiquitine

UBC9: Ubiquitin-carrier protein 9

Ubl: Ubiquitin-like protein

UBA5: Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 5

Udp: Ubiquitin-domain protein

UFC1: Ubiquitin-fold modifier conjugating enzyme 1

UFL1: E3 UFM1-protein ligase 1

UFM1: Ubiquitin-like modifier 1

UFSP1: UFM1-specific peptidase 1

UFSP2 : UFM1-specific peptidase 2

## **Remerciements**

J'aimerais tout d'abord remercier mes directeurs le Dr Bernard Brais et le Dr Alex Parker pour m'avoir généreusement accueillie dans leurs laboratoires. Ils ont su me donner un projet qui me convenait parfaitement et me guider grâce à leurs précieux conseils tout au long de ma maîtrise.

Dans le laboratoire du Dr Parker, je veux remercier Arnaud Tauffenberger et Alexandra Vaccaro pour leur aide et pour avoir mis de l'action et l'humour dans mes journées.

Dans le laboratoire du Dr Brais, j'aimerais dire un merci tout spécial à Marie-Josée Dicaire et Isabelle Thiffault qui ont été mes mentors et m'ont appris tout ce que je sais aujourd'hui. Je veux également témoigner ma gratitude à mes collègues de travail Véronique Bolduc, Martine Tétreault, Maria-Lisa Putorti, et Catherine Boyer pour m'avoir écouté et répondu à mes nombreuses questions avec patience et générosité.

Je veux finalement remercier ma famille et mes amis qui m'ont entourée et soutenue au cours de ces dernières années.

## **Chapitre 1 : Introduction**

### **1.1 Le gène de l'ubiquitin-fold modifier**

La protéine UFM1, en anglais ubiquitin-fold modifier 1, a été décrite pour la première fois en 2004 par Komatsu *et al.* C'est une protéine possédant 85 acides aminés, ayant un poids moléculaire d'environ 9.1 kDa. Au niveau cellulaire, la protéine est fortement exprimée dans le noyau et se retrouve également dans le cytoplasme de façon plus diffuse (Komatsu, Chiba et al. 2004). Elle est conservée parmi tous les organismes multicellulaires, mais ne se retrouve pas chez la levure. La partie centrale est fortement conservée parmi les espèces, mais les séquences en N- et en C-terminale sont parfois plus allongées (Figure 1). UFM1 fait partie d'un groupe de protéines ayant des similarités structurales avec l'ubiquitine (Ub) nommé Ubl pour ubiquitin-like proteins.

Ce groupe est divisé en deux classes :

Dans la première classe, les protéines ne partagent pas d'homologie de séquence avec l'Ub, mais se lient à leur cible protéique de façon similaire. Les protéines SUMO et NEDD8 sont deux exemples connus de protéine faisant partie de ce groupe (Komatsu, Chiba et al. 2004).

```

H.sapiens      MS-----KVSFKITLTS DPRLPYKVL SVPESTPFTAVLKF AAEFKVPAATS AII 50
M.musculus    MS-----KVSFKITLTS DPRLPYKVL SVPESTPFTAVLKF AAEFKVPAATS AII 50
D.rerio       MS-----KVFIFKITLTS DPRLPYKVL SVPESTPFTAVLKF AAEFKVPAATS AII 50
C.elegans     MSGGTAATTAGSKVIFKITLTS DPKLPFKVL SVPESTPFTAVLKF AAEFKVPAATS AII 60
D.melanogaster MS-----KVFIFKITLTS DPKLPFKVL SVPEGTPFTAVLKF ASEFKVPAETS AII 50
**           **:*****,:**,:*****,:*****,:***** *****

H.sapiens      TNDGIGINPAQTAGNVFLKHGSELRIIPRDRVGSC----- 85
M.musculus    TNDGIGINPAQTAGNVFLKHGSELRIIPRDRVGSC----- 85
D.rerio       TNDGIGINPAQTAGNVFLKHGSELRIIPRDRVGGGHQPRM 90
C.elegans     TNDGVGVNPAQPAGNIFLKHGSELRLIPRDRVGH----- 94
D.melanogaster TDDGIGISPQQTAGNVFLKHGSELRLIPRDRVGHQLS--- 87
*:**:*:.* *.**,:*****,:*****

```

**Figure 1.** Alignement réalisé à l'aide du logiciel Clustal W2 des protéines UFM1 chez différentes espèces. Les étoiles indiquent les acides aminés identiques.



Les protéines de la deuxième classe sont également nommées UDP pour ubiquitin-domain proteins. C'est-à-dire, qu'elles contiennent des structures semblables à celles de l'ubiquitine qui sont généralement intégrées dans différentes classes de protéines plus grosses ayant une fonction distincte, par exemple, les protéines Rad23, Elongin B et Parkin (Tanaka, Suzuki et al. 1998; Komatsu, Chiba et al. 2004).

UFM1 est une Ubl de type 1. Elle partage donc très peu d'homologie de séquence, seulement 16%, avec l'Ub (Sasakawa, Sakata et al. 2006). Cependant, leurs structures tertiaires possèdent des similarités remarquables (Figure 2). Tout comme l'ubiquitine, UFM1 est synthétisé sous-forme de précurseur dans la cellule. Il possède une queue d'acides aminés en C-terminal qui doit être clivés par des protéases spécifiques à UFM1 (UfsP1 et UfsP2) afin d'exposer un résidu glycine (Kang, Kim et al. 2007; Ha, Ahn et al. 2008). Sous cette forme clivée, UFM1 passe ensuite par une séquence de réactions catalysées par différentes enzymes afin de former ses conjugués.

L'enzyme d'activation (E1) qui se nomme Uba5, initie la réaction en formant un lien thioester hautement énergétique avec UFM1 de façon ATP dépendante. Une fois activé, UFM1 est transféré à une enzyme E2 (Ufc1) dite de conjugaison à l'aide d'un lien thioester. Certaines enzymes E2 spécifiques à l'Ub ou d'autre UBLs peuvent transférer directement la protéine à son substrat, mais la majeure partie des enzymes E2 nécessite la participation d'une troisième enzyme.



**Figure 2.** Représentation tridimensionnelle des structures tertiaires de l'ubiquitin-fold modifier (PDB code : 1WXS) et de l'ubiquitine (PDB code : 1D3Z) à l'aide du logiciel MOLMOL. Les hélices  $\alpha$  sont en rouge et les feuillets  $\beta$  sont en bleu.

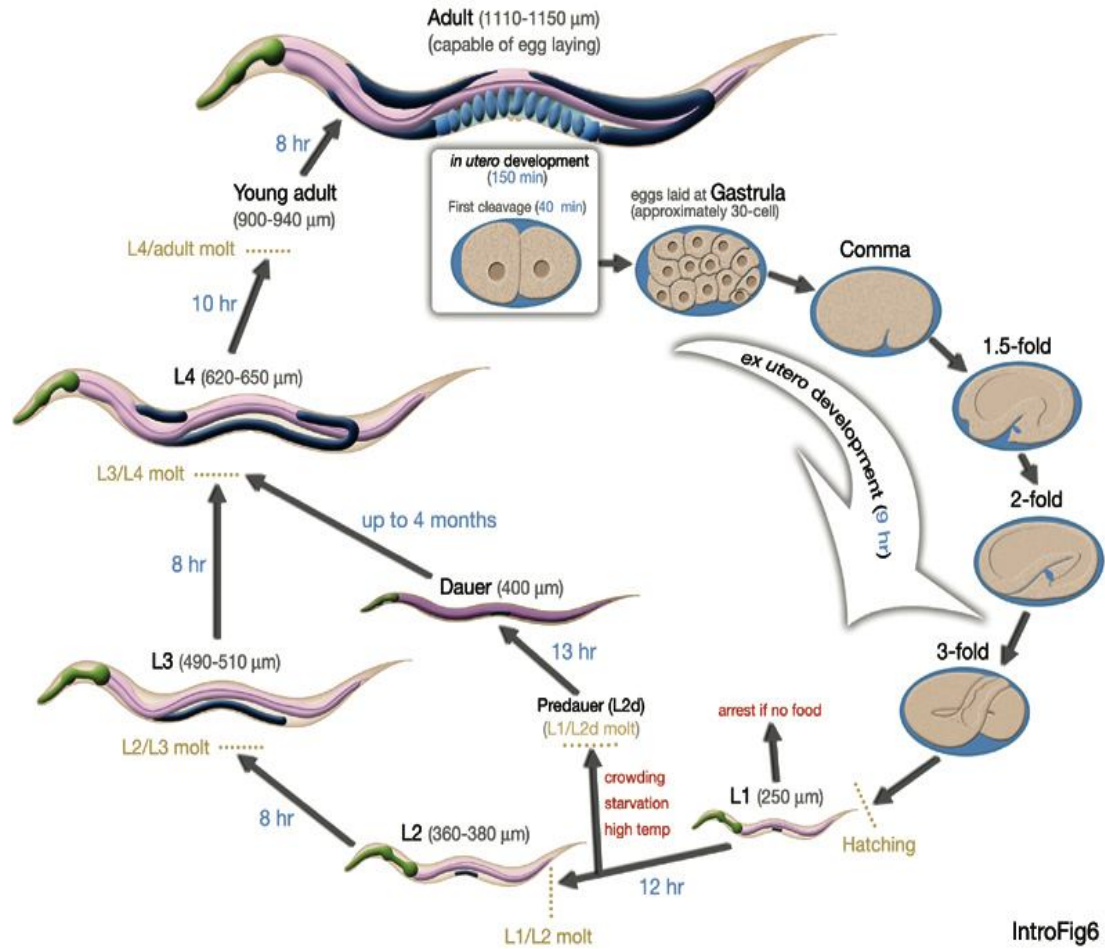
L'enzyme de ligation (E3) est requise pour la reconnaissance spécifique et le transfert aux substrats autres qu'E1 et E2 (Varshavsky 1997; Komatsu, Chiba et al. 2004; Ebe 2007; Tatsumi, Sou et al. 2010). L'enzyme E3 d'UFM1 est Ufl1 et à ce jour seulement un substrat est connu. Il s'agit d'une protéine nouvellement décrite nommée Dashurin qui n'a pas encore de fonction biologique connue (Kirimura, Ogawa et al. 2006; Tatsumi, Sou et al. 2010).

Il est de plus en plus fréquemment rapporté que les Ubls sont impliqués dans des maladies humaines, particulièrement des pathologies neurodégénératives. En effet, SUMO et Atg8 seraient impliqués dans la maladie de Huntington et SUMO2 dans la maladie d'Alzheimer (Kerscher, Felberbaum et al. 2006; Hochstrasser 2009). Quelques articles font état d'un lien possible entre UFM1 et des pathologies. Il a été rapporté que le gène *ufm1* était surexprimé chez des souris de type MCP développant une ischémie myocardique (Azfer, Niu et al. 2006). Son expression est également augmentée dans les îlots de Langerhans de patients atteints du diabète de type 2 (Lu, Yang et al. 2008). Malgré l'étendue des connaissances sur le processus d'action d'UFM1, très peu de choses sont connues sur les rôles biologiques qu'il peut avoir dans la cellule.

## **1.2 Modèle animal : *Caenorhabditis elegans***

Le *caenorhabditis elegans* est le modèle multicellulaire le plus simple parmi ceux utilisés en biologie. Il se cultive facilement sur des pétris et peut être conservé congelé pendant des années. Son anatomie et sa génétique sont très bien connues. C'est un animal qui possède environ 1000 cellules somatiques et dont les lignées cellulaires sont complètement décrites. Il se reproduit de façon hermaphrodite et son cycle de vie s'étend sur trois semaines (Hermann 2002; Hermann 2002; Mitani 2009). Les animaux se développent complètement de l'œuf à l'adulte en trois jours s'ils sont maintenus à 20° Celsius (Figure 3). Le génome entier du *C. elegans* est physiquement cartographié et séquencé depuis 1998 (Mitani 2009). Il y a environ 20 000 gènes chez le *C. elegans*, 60% d'entre eux sont homologues à des gènes présents dans d'autres organismes dont l'humain.

Grâce aux connaissances étendues sur sa morphologie et à de nombreux phénotypes visibles, *C. elegans* est un organisme idéal pour des études transgéniques. De plus, c'est un animal transparent ce qui permet l'utilisation de protéines fluorescentes (Hermann 2002).

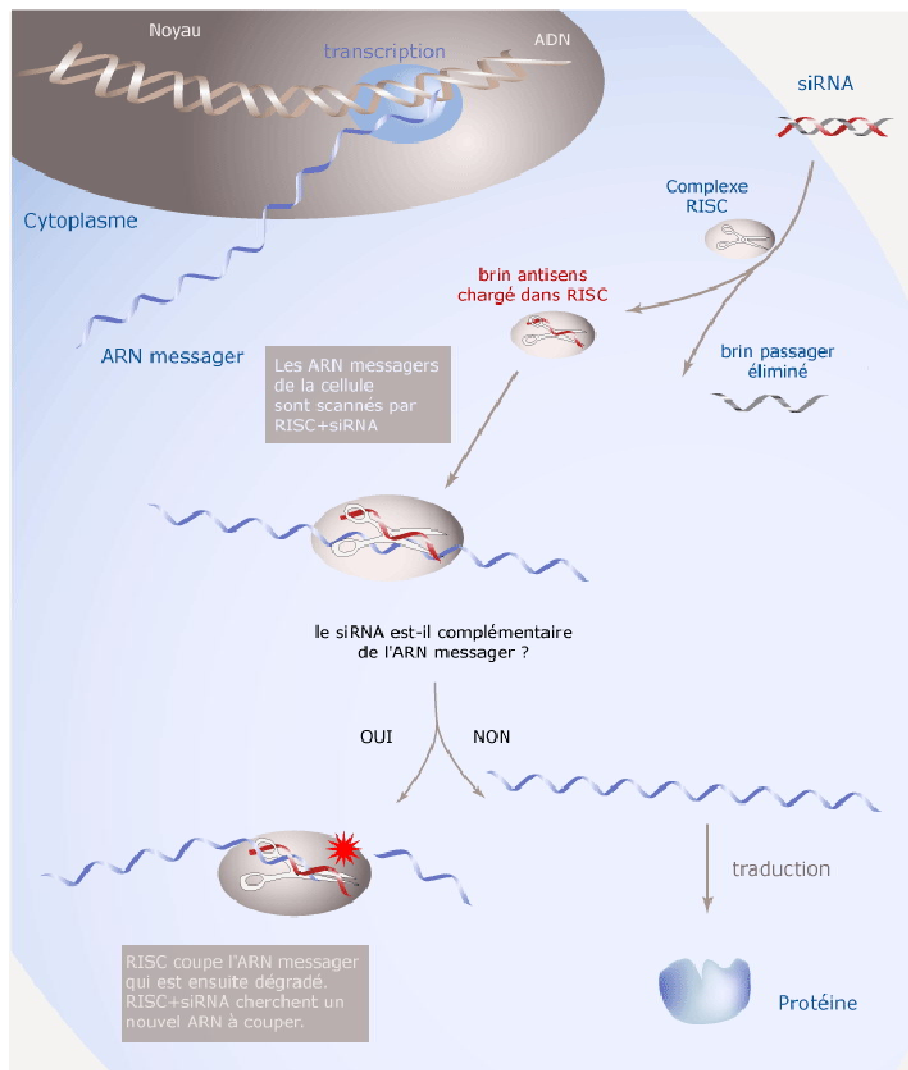


**Figure 3.** Schéma illustrant les différents stades du développement du nématode *Caenorhabditis elegans*. Image tirée du Worm Atlas,

<http://www.wormatlas.org/ver1/handbook/anatomyintro/anatomyintro.htm>

page consultée le 17 décembre 2010

Comme mentionné ci-haut le *C.elegans* possède un cycle de vie court, ce qui permet d'observer rapidement les effets de certains gènes ou substances sur le vieillissement. C'est également chez le *C. elegans* que le phénomène d'ARN interférence a été décrit pour la première fois (Kamath, Martinez-Campos et al. 2001). L'ARN interférence est un système présent dans la cellule qui contrôle le niveau d'activation des gènes. On le retrouve chez plusieurs eucaryotes, dont les humains. Le système est initié par l'enzyme Dicer qui clive les longs ARN double-brin en de plus petits fragments d'environ 20 nucléotides. Les petits ARN, nommés siRNA, vont par la suite être séparés en deux ARN simple brin, dont un va être dégradé et l'autre, nommé le brin guide, va être introduit au complexe RISC. Par la suite, le complexe RISC et l'ARN simple-brin s'associe à l'ARNm complémentaire du brin guide ce qui induit le clivage de l'ARNm par les Argonautes (Figure 4) (Fire, Xu et al. 1998; Fraser, Kamath et al. 2000; Kamath, Martinez-Campos et al. 2001; Maeda, Kohara et al. 2001). On peut utiliser ce système en introduisant de petits ARN double ou simple brin spécifique à l'ARN messenger du gène que l'on désire inactiver. Cette technique est simple et produit rapidement un phénotype relié à la perte de fonction d'un gène spécifique. Elle produit également, un phénotype robuste chez la progéniture des animaux affectés (Fire, Xu et al. 1998; Montgomery, Xu et al. 1998; Kamath, Fraser et al. 2003)



**Figure 4.** Schéma illustrant le processus de dégradation de l'ARN par le mécanisme d'ARN interférence. Image tirée du site internet <http://www.selexel.com/francais/maj.php> consulté le 17 décembre 2010

## **Chapitre 2 : Article : Role of *ufm-1* in protein homeostasis**

### **2.1 Introduction à l'article : Role of *ufm-1* in protein homeostasis**

Dans le laboratoire du Dr. Brais, nous avons recruté une cohorte de patients atteints d'une forme d'ataxie cérébelleuse qui se développe de façon tardive. La ségrégation de la maladie dans les familles supporte clairement un mode de transmission autosomique récessif. Un premier criblage du génome par microsatellite réalisé sur trois patients atteints et leur frère non-atteint (deCODE, Reykjavik, Iceland) nous a permis de trouver huit loci possédant un LOD score assez élevé, supérieur à 0,9, pour les considérer comme des candidats. Les marqueurs sur le chromosome 13 possédaient le LOD score maximal de 1,3. Pour confirmer et mieux définir le locus sur le chromosome 13, nous avons procédé à un deuxième criblage génétique par SNP au Centre d'innovation génome Québec sur 18 patients et trois individus non-atteint. Les génotypes ont été analysés par étude d'homozygotie. Parmi les 18 cas, neuf partagent une région d'homozygotie de 2.10 Mb sur le chromosome 13q13.3. Treize gènes se retrouvent dans cet intervalle.

Afin de déterminer les gènes candidats les plus intéressants nous avons utilisé le logiciel SUSPECT qui définit si le gène peut causer les symptômes de la pathologie basé sur ses fonctions présumées et homologie de séquences. Le gène *UFM1* est ressorti comme le plus prometteur à cause de sa qualité d'Ubl et du nombre grandissant de connaissances qui



soutiennent l'hypothèse qu'une mauvaise régulation de la dégradation des protéines joue un rôle important dans les maladies neurologiques tardives.

L'hypothèse de mon projet de maîtrise est qu'*UFM1* est impliqué dans le vieillissement et qu'une diminution de son expression cause une mauvaise régulation des protéines impliquées dans le maintien de l'intégrité neuronale.

Les deux objectifs principaux de mon projet de recherche sont de;

1- Caractériser les phénotypes causés par une diminution de l'expression d'*ufm-1* chez le ver sauvage et dans d'autres modèles de maladies neurodégénératives

2- D'observer si les phénotypes inverses peuvent être induit par une surexpression du gène.

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

**Julie Demers-Lamarche** : Caractérisation phénotypique, longévité et nombre de progéniture, du *C. elegans*. Test de sensibilité au toucher et au stress. Quantification de la dégénérescence axonale. Préparation des souches XQ57, XQ107. Rédaction du manuscrit.

**Bernard Brais** : Vérification des résultats de l'étude. Révision du manuscrit

**J. Alex Parker** : Injection du plasmide d'expression *ufm-1::ufm-1::GFP*. Vérification de tous les résultats de l'étude. Rédaction du manuscrit

**2.3 Article: *ufm-1* regulates neuronal protein homeostasis in *C. elegans***

Julie Demers-Lamarche<sup>1,2</sup>, Bernard Brais<sup>1,2</sup>, J. Alex Parker<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire Neurogénétique et de la motricité, Centre de recherche du CHUM

<sup>2</sup>Centre d'Excellence en neuromique

<sup>3</sup>Département de pathologie et biologie cellulaire, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

## ABSTRACT

Covalent modification of proteins by ubiquitin (Ub) occurs regularly in eukaryotic cells. Recently, a set of novel molecules called ubiquitin-like proteins (UBLs), which shares structural similarities to ubiquitin, has been described. Among this group, a protein called ubiquitin-fold modifier 1 (Ufm1) is found. Like Ub and most other UBLs, UFM1 binds covalently to its substrates through an enzymatic cascade. UFM1 has a specific activating enzyme E1 (Uba5), conjugating enzyme E2 (Ufc1) and ligating enzyme E3 (Ufl1). Recently, C20orf116 has been identified as a target protein for Ufm1. Ufm1 is a highly conserved protein, and is found in all multicellular organisms except yeast. Simple model organisms like *C. elegans* may provide a convenient setting to manipulate the expression of the Ufm1 gene and investigate its function.

To investigate the biological role of *ufm-1* we used RNA interference for gene silencing. RNAi of *ufm-1* did not result in any gross morphological disturbances but we noticed a significant decrease in the lifespan of wild type animals compared to controls. It also caused animals to be more sensitive to proteotoxic stress. Wild-type and transgenic animals showed an age-dependent loss of mechanosensation in a polyglutamine model and this phenotype is worsened by *ufm-1* RNAi. The gene *ufm-1* also seems necessary to maintain neuronal integrity in aging worms. Together, our data reveal insight into putative *ufm-1* function.

## INTRODUCTION

Covalent modification of proteins by ubiquitin (Ub) occurs regularly in eukaryotic cells. These modification control a vast array of biological process like protein degradation, cell-cycle control, stress response, DNA repair and transcription regulation. Recently, a set of novel molecules called ubiquitin-like proteins (UBLs), which shares structural similarities to ubiquitin, has been described (Sasakawa, Sakata et al. 2006). It is generally considered that protein modification by UBLs serves many proteolysis-independent events, such as molecule assembly and functional conversion of proteins (Tatsumi, Sou et al. 2010). Among this group, a protein call ubiquitin-fold modifier 1 (Ufm1) is found. Ufm1 is a type 1 ubiquitin-like protein like SUMO and NEDD8. UFM1 only shares 16% sequence homology with Ub, but has striking similarities in its tertiary structure and ligates to target proteins in a similar way to the ubiquitylation pathway (Komatsu, Chiba et al. 2004; Sasakawa, Sakata et al. 2006).

The ubiquitylation pathway is highly regulated in cells and protein ubiquitylation is catalyzed by a chain reaction of multiple enzymes. The E1 enzyme activates ubiquitin via an ATP-dependent reaction to form a high-energy thiolester bond. While Ub and many UBLs possess a conserved C-terminal di-glycine in their precursor forms. UFM1 possesses a single glycine followed by a Ser-Cys dipeptide. The activated ubiquitin is then transferred in a thiolester linkage to an E2 enzyme which catalyzes covalent attachment to a target protein or transfers ubiquitin to a high energy E3-ubiquitin

intermediate. E3 enzymes are required for the recognition of specific substrates, other than E1 and E2 (Komatsu, Chiba et al. 2004; Sasakawa, Sakata et al. 2006; Ebe 2007; Tatsumi, Sou et al. 2010). Like ubiquitin, UFM1 has a specific activating enzyme E1 (Uba5), conjugating enzyme E2 (Ufc1) and ligating enzyme E3 (Ufl1) (Komatsu, Chiba et al. 2004; Tatsumi, Sou et al. 2010). Recently, C20orf116 has been identified has a target protein for Ufm1 (Tatsumi, Sou et al. 2010). The biological function of Ufm1 and C20orf116 is unknown. Because of the structure of the protein and specific domains of C20orf116 it has been proposed that the conjugation is related to protein complex formation (Tatsumi, Sou et al. 2010). Even with the identification of an Ufm1 target protein, very little is known about Ufm1's biological role.

Ufm1 is a highly conserved protein, and is found in all multicellular organisms except yeast (Sasakawa, Sakata et al. 2006). Simple model organisms like *C. elegans* may provide a convenient setting to manipulate the expression of the Ufm1 gene and investigate its function. We report here that depletion of *ufm-1* reduces *C. elegans* lifespan without interacting with known lifespan modifiers. Furthermore, *ufm-1* is necessary for protein homeostasis and essential for maintaining neuronal integrity. Together, our data reveal insight on putative *ufm-1* function.

## MATERIALS AND METHODS

### Strains and genetics

Standard methods of culturing and handling worms were used (Spirek, Estreicher et al. 2010). All strains were scored at 20°C unless indicated. Mutations and transgenes used in this study were: *daf-2(e1370)*, *daf-16(mu86)*, *zcls9[hsp-60::GFP]*, *xqls57[xqls1(mec-3::128Q::GFP;mec-7::YFP);rrf-3(pk1426)]*, *xqls1[mec-3::128Q::GFP;mec-7::YFP]*, *xqls3[mec-3::128Q::GFP;rrf-3(pk1426)]*, *xqls4[mec-3::19Q::GFP;rrf-3(pk1426)]* and *xqls107[ufm-1::UFM-1::GFP]*. Most of the strains were obtained from the *C. elegans* Genetics Center (University of Minnesota, Minneapolis). For strain construction with polyQ transgenes and *ufm-1::GFP*, mutants were verified by visible phenotypes or fluorescence. Worms were maintained on standard NGM plates streaked with OP50 *E.coli*.

### RNAi treatments

To characterize the effect of *ufm-1* we used an ORF-RNAi feeding clone of *ufm-1/ZK652.3* (Open Biosystem) to reduce the expression of the gene. RNA interference (RNAi) treatments by feeding were performed as previously described (Parker, Metzler et al. 2007). The control RNAi vector was the plasmid L4440 (A. Fire, Stanford University, Stanford, CA).

### **Worm behavioral tests**

Touch tests were done essentially as described previously (Parker, Connolly et al. 2001; Parker, Metzler et al. 2007) by scoring for 10 touches at the tail of the animal for a minimum of 150 animals per genotype at larval stage L4 and day 1, 3, 5, 7, 9 and 11 of adulthood. We used *C. elegans* polyQ transgenics crossed with the RNAi sensitive mutation *rrf-3(pk1426)*. Lifespan assays were conducted and scored as described previously (Bongaerts, Hautefort et al. 2002; Eliopoulos and Galipeau 2002). Worms were scored as dead if they failed to move their head after being prodded in the nose and showed no pharyngeal pumping. For scoring wild-type worms N2 progeny, thirty synchronized L4 worms were grown on RNAi plates with *ufm-1* or empty vectors (10 animals/plates) and placed at 20°C overnight to lay eggs. The next day the plates were shifted to 25°C for 9 hours and L1 worms were score for each plate, the mean and SEM were calculated for each trial and two-tailed t tests were used for statistical analysis.

### **Fluorescence microscopy**

For scoring axons from 128Q transgenics, synchronized 128Q animals were selected at days 1, 5 and 9 of adulthood for visualization of mechanosensory axons in vivo. Animals were immobilized in M9 with 5 mM levamisole and mounted on slides with 2% agarose pads. Mechanosensory neurons were visualized in vivo with a Leica CTR 6000 and a Leica DFC 480 camera. A



minimum of 100 animals were scored per treatment over 4-6 trials. The mean and SEM were calculated for each trial and two-tailed t tests were used for statistical analysis.

For visualization of UFM-1 distribution in worms, *ufm-1::GFP* L4 animals were grown on NGM plates overnight and examined for fluorescence. For visualization of heat shock reporter strains, *hsp-4::GFP*, *hsp-6::GFP*, *hsp-60::GFP* and *hsp-16.2::GFP* L4 animals were grown on RNAi plates overnight and examined for fluorescence with the Leica system described above.

### **Statistics**

Statistics of nematode touch-test data were performed using one-way ANOVA, with correction for multiple testing by Tukey-Kramer's Multiple Comparison Test. Data were expressed as mean  $\pm$  SEM for in each group. All experiments were repeated at least three times.  $P < 0.05$  was considered significant. For lifespan tests, survival curves were generated and compared using the Log-rank (Mantel-Cox) test and a minimum of 100 animals were tested per genotype and repeated at least three times.

## RESULTS

The presence of a single UFM1 ortholog in the *C. Elegans* animal model facilitates the analysis of *ufm-1* function. Human UFM1 and worm Ufm1 show very high sequence similarity (Figure 1A).

To assess the role of *ufm-1* in the whole organism we constructed a reporter strain that expresses full length UFM-1 fused to GFP under control of the endogenous *ufm-1* promoter. UFM-1 is widely expressed and is observed in a number of tissues including the pharynx and intestinal cells (Figure 1B) in the adult worm and is mainly expressed in the head of the larvae. These data suggest that a whole organism approach to study *ufm-1* is appropriate and *C. elegans* is well suited for such experiments.

### ***ufm-1* modulate lifespan and proteotoxicity stress**

To investigate the biological role of *ufm-1* we used RNA interference for gene silencing. *ufm-1*(RNAi) did not result in any gross morphological disturbances; worms were superficially wild type and had normal progeny levels (Figure 1B). However, we noticed that *ufm-1*(RNAi) resulted in a significant decrease in lifespan of wild type animals compared to controls. Overexpression of *ufm-1* results in the opposite effect since the XQ107 UFM-1::GFP strain lived longer than the wild-type N2 worms (Figure 2A, B) Insulin/IGF-like signaling in worms is a major axis of longevity. To see if *ufm-1* functioned in this pathway we conducted *ufm-1*(RNAi) against the strains

mutant for the worm's sole insulin/IGF-like receptor *daf-2(e1370)* or the downstream FOXO transcription factor *daf-16(mu86)*. *ufm-1(RNAi)* had no effect on the long-lived phenotype of *daf-2(e1370)* worms but reduced the lifespan of the short lived *daf-16(mu86)* strain (Figure 2B, C). These data indicate that *ufm-1* functions independently of the Insulin/IGF pathway in regulating lifespan.

In worms, longevity and cellular stress resistance are intimately linked. We hypothesized that the reduced lifespan observed by *ufm-1(RNAi)* may in part be due to increased sensitivity to environmental stress. Indeed, long-lived mutants like *daf-2(e1370)* are resistant to numerous stresses including oxidative, thermal and proteotoxicity. We tested worms subjected to *ufm-1(RNAi)* against a number of physiological stresses. Our results suggest that *ufm-1* was dispensable for resistance against thermal, oxidative (induced either by juglone or arsenite) and osmotic stress (Supplementary figure 1A, B, C, D). Interestingly, we observed that *ufm-1* was required for resistance against proteotoxicity (Figure 3A, B).

To investigate the effect of *ufm-1* diminution on proteotoxicity, we turned to a transgenic *C. elegans* model of polyglutamine (polyQ) toxicity (Parker, Connolly et al. 2001). Mechanosensation is a well-characterized phenotype in *C. elegans* (Parker, Metzler et al. 2007). We tested the animals' response to a gentle touch at the tail over a period of 12 days starting at larval stage L4 and ending at day 11 of adulthood. Wild-type and transgenic animals showed an age-dependent loss of mechanosensation with a decline

in touch-sensitivity over their lifespan (Figure 3A, B). We then investigated the effect of the diminution of the *ufm-1* gene expression by RNAi treatments of each strain. Animals exposed to *ufm-1* RNAi vector were more severely affected than the one feeding on empty vector (Figure 3A, B). We observed the same effect on the XQ3 and XQ4 strains (Supplementary figure 2A, B)

### ***ufm-1* maintains neuronal integrity**

The fact that *ufm-1* protected against mutant polyQ and was necessary to maintain axonal integrity led us to question whether *ufm-1* was essential for maintaining neuronal structure during aging. We noted that animals exposed to *ufm-1*(RNAi) had significantly more axonal swelling at earlier stages, which decreases when the degeneration take place at day nine of adulthood (Figure 4A). We also observed more severe axonal degeneration at the later stages in *ufm-1*(RNAi) worms than the controls. (Figure 4B).

## DISCUSSION

In the present study, we reported that *ufm-1* acts as a lifespan modifier, protects against proteotoxic stress and maintain neuronal integrity.

Aging is a fundamental and fascinating process and many genes are known to affect it. The insulin/IGF pathway is a well understood signaling pathway that extends lifespan in worms, flies and mammals (Tatar, Bartke et al. 2003). In *C. elegans* mutations in the *daf-2* gene which encode an insulin/IGF-1 receptor ortholog, double the lifespan. (Kenyon, Chang et al. 1993). This effect required the activity of *daf-16* which encode a FOXO family transcription factor. This pathway perturbs endocrine signaling which demonstrated that aging in *C. elegans* is in part hormonally regulated. (Kenyon 2005). *ufm-1* effect on lifespan is independent of the insulin/IGF pathway, since it worsens only the short lifespan of the *daf-16(mu86)* strain which is the downstream effector and not the long lifespan of *daf-2(e1370)*. However, we clearly see that *ufm-1* modulate the worm's lifespan.

Stress is also known to be intimately linked to lifespan. For that reason we decided to study the impact of *ufm-1* on different stresses (Kenyon 2005). *ufm-1* did not affect resistance to thermal, osmotic or oxidative stress either induced by juglone or arsenite, but it seems necessary for resistance against proteotoxic stress.

Proteotoxicity is the general perturbation of protein folding homeostasis which tends to naturally decline due to aging. Proteotoxicity

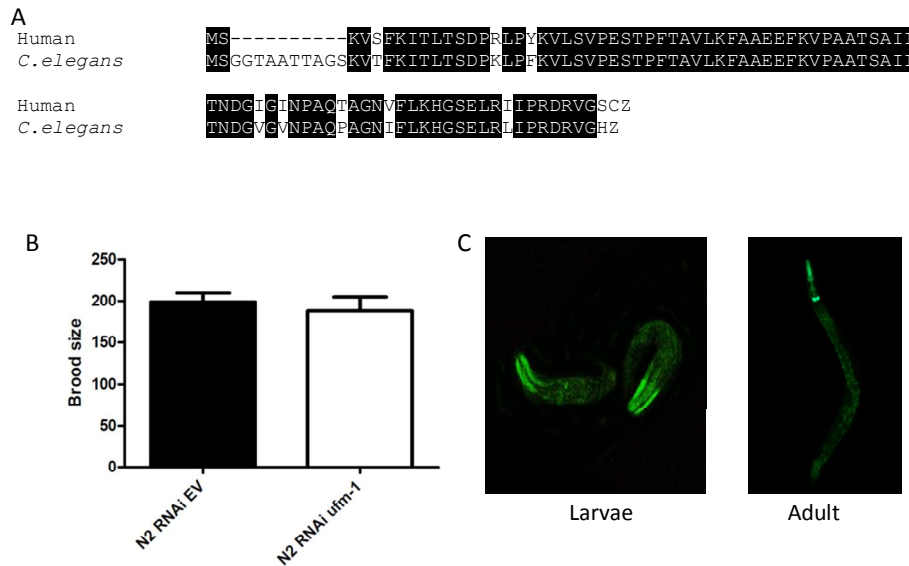
has been linked to longevity in multiple studies including in worms with *aip-1*, a homologue of mammalian AIRAP. Worms lacking this gene, live less and are hypersensitive to misfolding-prone proteins induced by arsenite or expansion of polyglutamines (polyQ) (Yun, Stanhill et al. 2008). In *C. elegans* expanded polyQ causes highly penetrant mechanosensory defect at the tail (Parker, Connolly et al. 2001). This phenotype is age-dependent and even if the expanded polyQ worms are touch insensitive we can see a loss of touch response with age in the wild-type and the control worms too. Depletion of *ufm-1* worsens the mechanosensory phenotype, leading us to question whether *ufm-1* plays a role in the neuronal integrity of mechanosensory neurons.

Expanded polyQ in mechanosensory neurons leads to morphological abnormalities in their neuronal processes (Parker, Connolly et al. 2001). Our results support these studies; we have confirmed the morphological abnormalities. Our observations also suggest that this phenotype is age-dependent. We can also see that neuronal degeneration happens later in life after the formation of the morphological abnormalities. Compared to controls, the worms exposed to *ufm-1(RNAi)* display these abnormalities at a younger age. We observe a significant difference between *ufm-1(RNAi)* animals and controls as early as day 9.

In summary, worms lacking *ufm-1*, an ubiquitin-like gene, are hypersensitive to protein misfolding, exhibit a shorter lifespan and are impaired in their ability to maintain neuronal integrity.

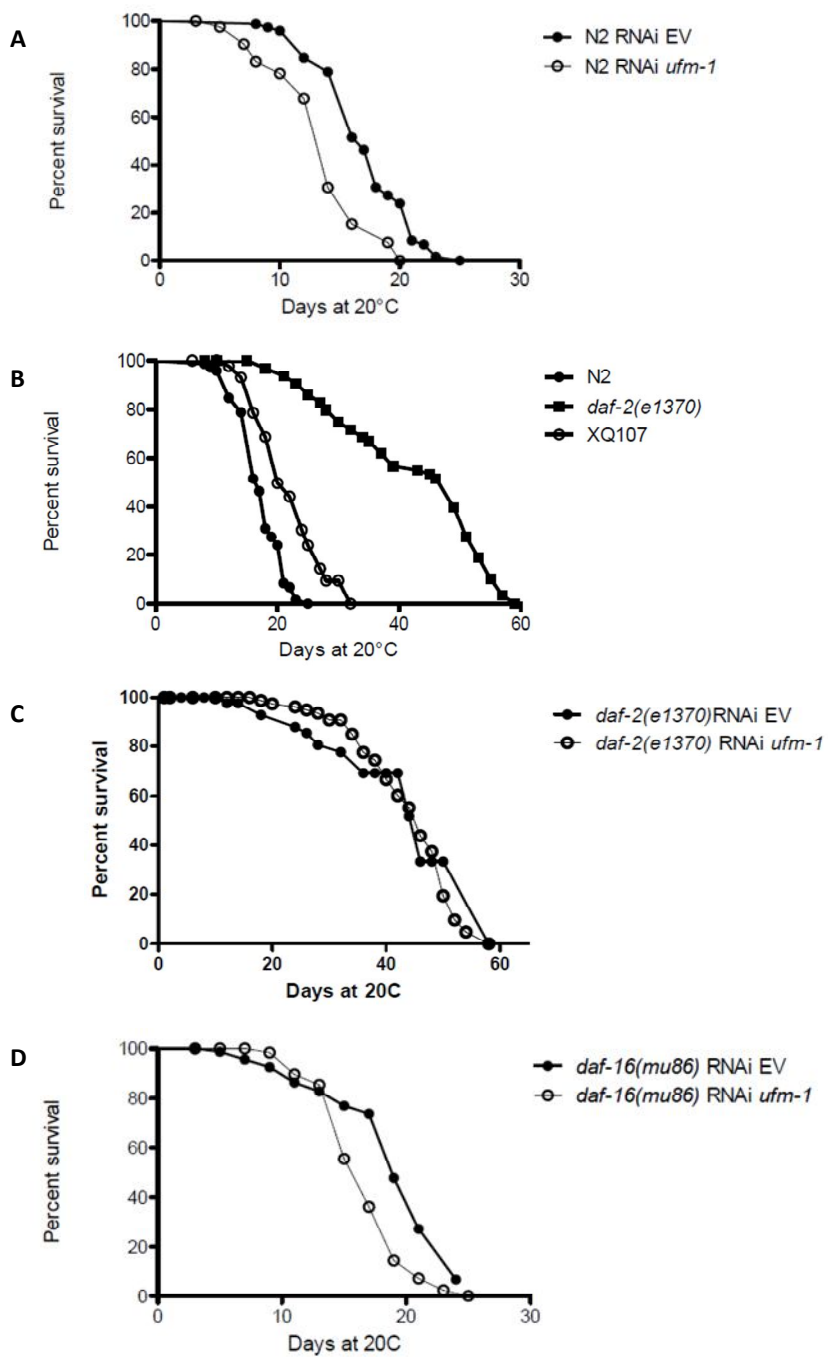
**ACKNOWLEDGMENTS**

We wish to thank the *Caenorhabditis* genetic center for the strains they provides us. This study was supported by grants to A.P. and B.B. from the Canadian Institutes for Health Research.

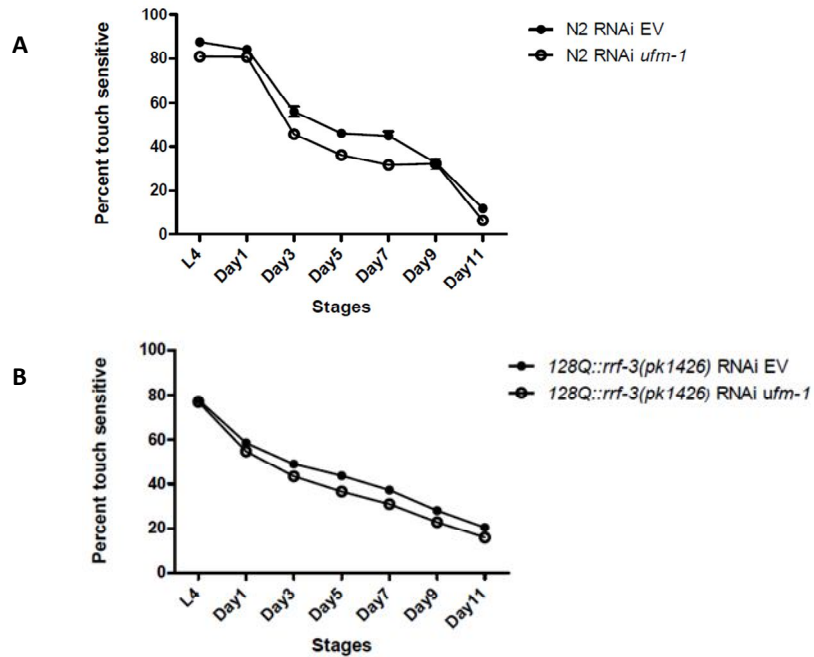


**Figure 1.** Characterization of *ufm-1*. **A.** Sequence alignment (using ClustalW2) of human UFM1 and the *C. elegans* homolog *ufm-1*. Identical amino acids are highlighted in black. Overall, there is 86% identity between *C. elegans ufm-1* and human UFM1. **B.** Expression of the *ufm-1::UFM-1::GFP* construct. **C.** Brood size of wild type *C. elegans* compare to wild type animals exposed to *ufm-1* RNAi.

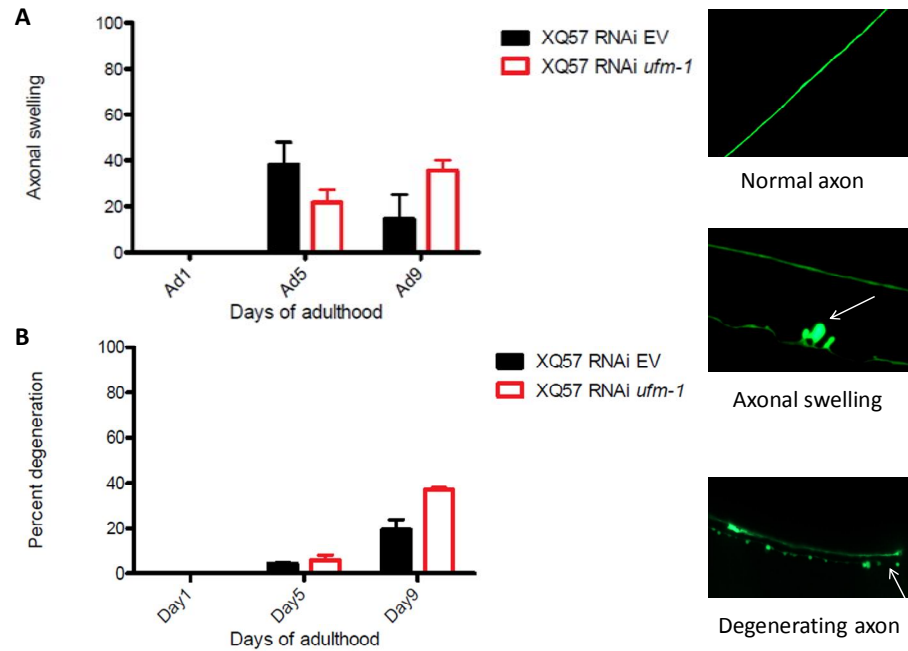




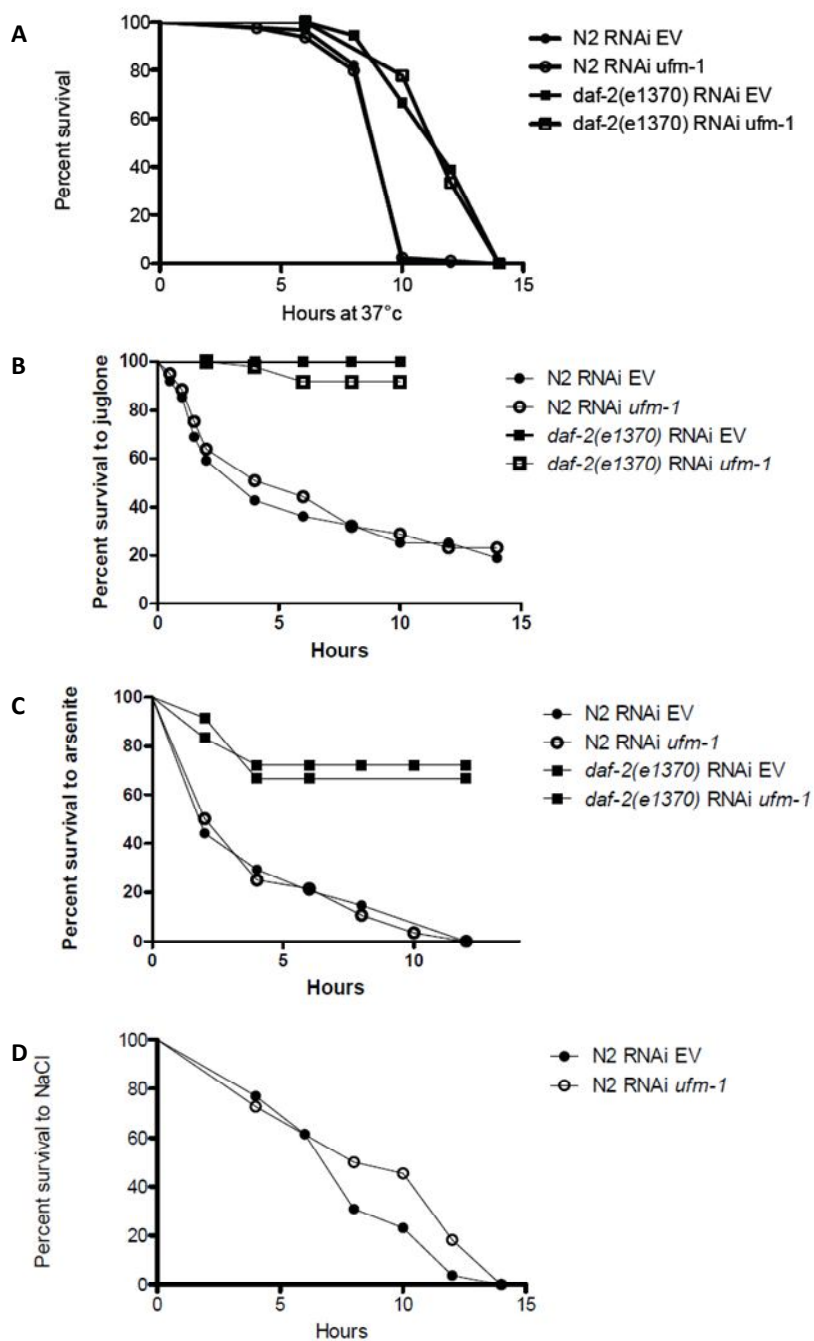
**Figure 2.** *ufm-1* is required for normal worm lifespan. **A.** Lifespan curve of wild-type (N2), **B.** XQ107, **C.** *daf-2(e1370)* and **D.** *daf-16(mu86)* animals subjected to empty vector or *ufm-1* RNAi.



**Figure 3.** *ufm-1* is required for normal touch response. **A.** Touch response curve of wild-type (N2) and **B.** polyglutamine strain (128Q::rrf-3(pk1426)) either exposed to control or *ufm-1* RNAi

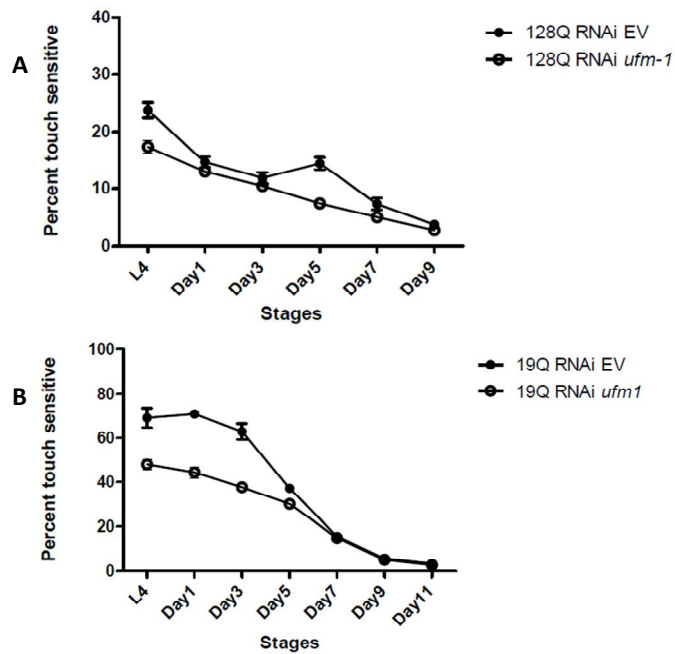


**Figure 4.** *ufm-1* is required for neuronal integrity. **A.** Quantitative axonal swelling at day 1,3 and 5 of adulthood of polyglutamine strain (128Q) either exposed to control or *ufm-1* RNAi **B.** Quantitative axonal degeneration at day 1,3 and 5 of adulthood of polyglutamine strain (128Q) either exposed to control or *ufm-1* RNAi



**Supplementary figure 1. A.** Response to thermal stress of N2 and *daf-2(e1370)* strains exposed to control or *ufm-1* RNAi **B.** Response to oxidative

stress induce by juglone of N2 and *daf-2(e1370)* strains exposed to control or *ufm-1* RNAi **C.** Response to arsenite treatments of N2 and *daf-2(e1370)* strains exposed to control or *ufm-1* RNAi **D.** Percent survival to NaCl of N2 strain exposed to control or *ufm-1* RNAi



**Supplementary figure 2. A.** Touch response curve of polyglutamine strains 128Q and **B.** 19Q either exposed to control or *ufm-1* RNAi

**REFERENCES**

Brenner, S. (1974). "The genetics of *Caenorhabditis elegans*." *Genetics* 77(1): 71-94.

Dillin, A., D. K. Crawford, et al. (2002). "Timing requirements for insulin/IGF-1 signaling in *C. elegans*." *Science* 298(5594): 830-834.

Dillin, A., A. L. Hsu, et al. (2002). "Rates of behavior and aging specified by mitochondrial function during development." *Science* 298(5602): 2398-2401.

Glickman, M. H. and A. Ciechanover (2002). "The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction." *Physiol Rev* 82(2): 373-428.

Kenyon, C. (2005). "The plasticity of aging: insights from long-lived mutants." *Cell* 120(4): 449-460.

Kenyon, C., J. Chang, et al. (1993). "A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type." *Nature* 366(6454): 461-464.

Komatsu, M., T. Chiba, et al. (2004). "A novel protein-conjugating system for Ufm1, a ubiquitin-fold modifier." *EMBO J* 23(9): 1977-1986.

Parker, J. A., J. B. Connolly, et al. (2001). "Expanded polyglutamines in *Caenorhabditis elegans* cause axonal abnormalities and severe dysfunction of PLM mechanosensory neurons without cell death." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(23): 13318-13323.

Parker, J. A., M. Metzler, et al. (2007). "Huntingtin-interacting protein 1 influences worm and mouse presynaptic function and protects *Caenorhabditis elegans* neurons against mutant polyglutamine toxicity." *J Neurosci* 27(41): 11056-11064.

Sasakawa, H., E. Sakata, et al. (2006). "Solution structure and dynamics of Ufm1, a ubiquitin-fold modifier 1." *Biochem Biophys Res Commun* 343(1): 21-26.

Tatar, M., A. Bartke, et al. (2003). "The endocrine regulation of aging by insulin-like signals." *Science* 299(5611): 1346-1351.

Tatsumi, K., Y. S. Sou, et al. (2010). "A novel type of E3 ligase for the Ufm1 conjugation system." *J Biol Chem* 285(8): 5417-5427.

Yun, C., A. Stanhill, et al. (2008). "Proteasomal adaptation to environmental stress links resistance to proteotoxicity with longevity in *Caenorhabditis elegans*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(19): 7094-7099.

## **2.4 Conclusion de l'article**

L'étude présentée dans cet article s'inscrit dans deux champs de recherche importants. Les Ubls sont impliqués dans une multitude de fonction biologiques, tel que la transcription, la réparation de l'ADN, la ségrégation des chromosomes et la sénescence cellulaire (Bischof and Dejean 2007; Gareau and Lima 2010). La caractérisation des protéines de la famille des Ubls démontre le rôle important que joue les modifications post-transcriptionnelle par des protéines.

Il y a également, beaucoup d'efforts d'investis dans la compréhension des mécanismes qui agissent sur la longévité. Le vieillissement est un processus fondamental, mais extrêmement diversifié parmi les espèces. On sait maintenant qu'en modifiant aussi peu qu'un seul gène nous pouvons développer des modèles mutants qui peuvent vivre jusqu'au double de leur espérance de vie. Dans un cadre humain, il est intéressant de connaître les mécanismes de vieillissement, puisque plus un individu vieillit, plus il est susceptible de développer une maladie.



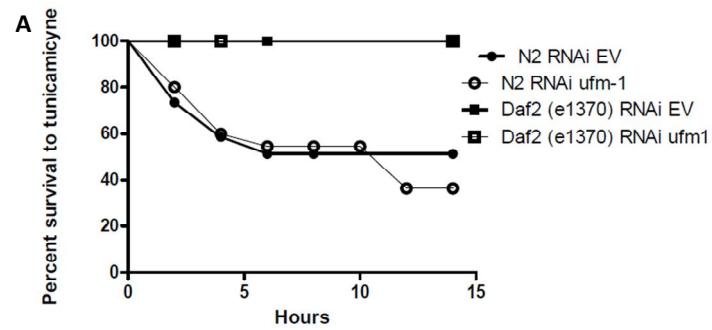
## Chapitre 3 : Discussion

### 3.1 Conclusion du projet

La recherche de mutation chez les patients atteints d'une ataxie cérébelleuse tardive ne nous a pas permis de lier *UFM1* à la maladie. Malgré tout, les résultats obtenus tout au long de mon projet de maîtrise nous ont convaincus de l'intérêt d'étudier ce gène. Le gène *ufm-1* du vers *Caenorhabditis elegans* est impliqué dans le vieillissement de l'animal, sans être lié à des processus de vieillissement déjà connus. En effet, *ufm-1* fonctionne indépendamment de la voie de signalisation de l'insuline. De plus, on n'observe aucune différence de la sensibilité au stress oxydatif, osmotique et thermique lorsque l'expression d'*ufm-1* est diminuée. Il ne semble pas non plus être impliqué dans le stress du réticulum endoplasmique induit par la tunicamycine (Figure 5). Cependant, il semble jouer un rôle dans le stress protéotoxique et dans le maintien de l'intégrité neuronale. Les souches de *C. elegans* sauvage et transgénique ont une perte de réponse au toucher plus marquée en présence de l'ARN interférence d'*ufm-1*. On observe également une plus grande proportion de dégénérescence neuronale.

La quantité limitée de connaissance sur ce gène ne nous permet pas de savoir par quel mécanisme il agit sur le vieillissement et l'intégrité neuronale. Cependant, une autre petite Ubl de type 1, SUMO, est beaucoup

plus connue. Tout comme l'Ub ou UFM1, cette protéine possède des enzymes E1 (SAE1, SAE2), E2 (UBC9) et E3 spécifique (Table 1).



**Figure 5.** Réponse au stress induit par la tunicamycine

Ils existent plusieurs E3 qui interagissent avec SUMO incluant des membres de la famille de protéine PIAS (Sarge and Park-Sarge 2009; Wilkinson and Henley 2010). SUMO existe chez l'humain sous quatre isoformes différents; SUMO-1 à SUMO-4 (Table 1). SUMO-4 est possiblement un pseudogène puisqu'il ne possède pas d'introns. De plus, la protéine SUMO-4 endogène n'a jamais été détectée, malgré la présence d'ARN messenger dans les reins et les ganglions lymphatiques (Bohren, Nadkarni et al. 2004; Wilkinson and Henley 2010). Les protéines SUMO1-3 sont connues pour réguler la localisation subcellulaire, l'association de protéines en complexe protéique et la transactivation de facteur de transcription (Sarge and Park-Sarge 2009). Le mécanisme de modification post-transcriptionnelle de SUMO se nomme sumoylation.

Table 1. Liste des protéines impliquées dans la SUMOylation chez les mammifères

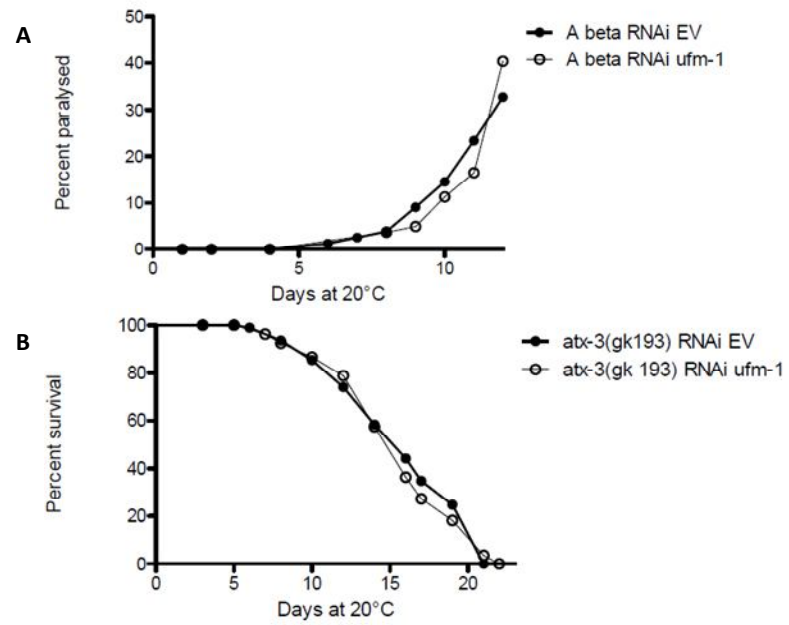
Type de Protéine protéines	Nom des
SUMO	SUMO-1 SUMO-2 SUMO-3 SUMO-4
SUMO E1 (Enzyme d'activation)	SAE1 SAE2
SUMO E2 (Enzyme de conjugaison)	UBC9
SUMO E3 (Ligases)	PIAS1 PIAS3 PIAS $\alpha$ PIAS $\beta$ PIAS $\gamma$ RanPB2 PC2 Mms21 HDAC4 HDAC7 MUL1 Rhes TOPORS TLS TRAF7
SUMO Protéases	SEN-1 SEN-2 SEN-3 SEN-5 SEN-6 SEN-7

Plusieurs évidences lient SUMO à la sénescence cellulaire et à des maladies humaines, tel que le cancer et les maladies neurodégénérative. Une expression ectopique de PIASy, une des enzymes E3 de SUMO, induit la sénescence. De plus, SUMO est un des modificateurs post-transcriptionnelle des protéines p53 et Rb qui contrôlent la sénescence et ont un rôle majeur dans le cancer (Bischof and Dejean 2007; Sarge and Park-Sarge 2009). Une de ses protéines E3, PIAS3, est surexprimée dans différents types de cancer (Wang and Banerjee 2004). Un niveau d'expression élevé d'enzyme E1 est associé à un taux de survie moindre chez des patients avec des carcinomes hépatocellulaires. Le niveau d'expression de la protéine UBC9 est également augmenté dans certains cancers et une surexpression de cette protéine augmente la croissance des cellules malignes (Lee and Thorgeirsson 2004; Sarge and Park-Sarge 2009). D'autres études ont également démontré qu'une des protéases de SUMO, SENP1, était surexprimée dans les cancers de la thyroïde et de la prostate et qu'une surexpression de SENP1 favorise le développement de néoplasmes dans la prostate (Jacques, Baris et al. 2005; Cheng, Bawa et al. 2006).

SUMO est impliqué dans de nombreuses maladies neurodégénératives. En 2004, Steffan *et al.* ont observé de la sumoylation sur trois lysines du fragment N-terminal de la protéine huntingtin mutée, qui cause la maladie de Huntington. Cette modification serait associée à une augmentation de la stabilité et à une diminution de la formation d'agrégats de

la protéine huntingtin. Cependant, ces mêmes lysines peuvent être ubiquitylée. Il est donc difficile de différencier les effets de SUMO et de l'Ub (Steffan, Agrawal et al. 2004). La protéine Ataxin-1 qui cause l'ataxie spinocérébelleuse de type 1 possède cinq lysines qui peuvent interagir avec SUMO. D'ailleurs, la sumoylation est diminuée dans les protéines mutées, mais le mécanisme responsable de cette diminution est encore inconnu (Riley, Zoghbi et al. 2005). SUMO co-localise également avec SOD1 dans les corps d'inclusions. SOD1 est responsable d'une fraction des cas familiaux de la sclérose latérale amyotrophique.

SUMO est aussi lié à la maladie d'Alzheimer puisque la perte de sumoylation augmente l'agrégation de la protéine A $\beta$ . De plus, en augmentant la concentration d'UBC9, on augmente la sumoylation et on diminue l'agrégation d'A $\beta$ . Les protéines tau,  $\alpha$ -synuclein et DJ-1 qui sont impliqués dans les maladies de Parkinson et d'Alzheimer interagissent également avec SUMO (Dorval and Fraser 2006; Shinbo, Niki et al. 2006; Takahashi, Ishida et al. 2008; Sarge and Park-Sarge 2009). Le nombre important de maladies neurodégénératives liées à SUMO et à d'autres Ubl nous a poussés à tester si la diminution d'*ufm-1* aurait un effet négatif sur des modèles *C. elegans* de telles maladies. *Ufm-1* n'affecte pas la longévité de la souche *atx-3(gk193)* qui modélise l'ataxie spinocérébelleuse de type 1 (Figure 6). Il n'a pas non plus d'effet sur la paralysie de la souche A $\beta$ , un modèle de la maladie d'Alzheimer (Figure 6).



**Figure 6.** Test de longévité et de paralysie

### **3.1.1 Souche *C.elegans* délétère pour *ufm-1***

La technique utilisée, introduction d'ARN interférence par l'alimentation, est rapide, peu coûteuse et donne de bons résultats. Cependant, elle comporte un désavantage majeur. La diminution de l'expression de l'ARN du gène varie selon le type cellulaire, elle peut également différer d'un animal à l'autre et on ne peut la quantifier (Kamath, Martinez-Campos et al. 2001). Pour contrer ce problème et valider les résultats obtenus jusqu'à présent il faudrait refaire les tests avec un mutant délétère pour *UFM1*. Jusqu'à présent les efforts mis par le Caenorhabditis genetic center à cet effet ont permis de développer un mutant (VC925) qui possède une délétion homozygote de la région contenant les gènes; *coq-5* et *ufm-1*. Les mutants homozygotes pour cette délétion sont létaux. Le phénotype léthal pourrait être causé par le fait que plusieurs gènes sont déletés. Il serait intéressant de faire un modèle dans lequel seulement *ufm-1* serait déleté et observer le phénotype.

### **3.1.2 Caractérisation du maintien de l'intégrité cellulaire**

Il serait intéressant de constater si *ufm-1* est impliqué dans la survie de d'autres types cellulaires. Le promoteur *mec-7* est exprimé dans les neurones moteurs de l'animal. La même expérience de dégénérescence neuronale pourrait être effectuée avec d'autres promoteurs neuronaux, tel que *mec-4* pour tester des neurones moteurs au niveau du corps des vers et



*unc-47* pour les neurones dorsaux et commissuraux. Nous pourrions également tester l'impact d'*ufm-1* sur les muscles.

### **3.1.3 Cibles protéiques d'*ufm-1***

La majorité des rôles connus de SUMO ou d'autres Ubl comme Nedd8 sont ressortie des études de leurs cibles protéiques. C'est pourquoi il serait très important de connaître les substrats d'*ufm-1*. Une des techniques pour connaître les interactions protéine-protéine *in vivo* est la méthode TAP (Tandem affinity purification). Cette méthode de purification par immunoprécipitation requiert la création d'une protéine de fusion portant une étiquette composée de deux domaines d'affinités. Malgré la possibilité que l'étiquette puisse empêcher la protéine de se lier avec certains de ses interacteurs, la méthode à l'avantage de pouvoir déterminer les substrats sans connaissance antérieur de la composition du complexe protéique (Volkel, Le Faou et al. 2010).

UFM1 fait partie d'un groupe de protéine dont l'importance est de plus en plus reconnue. Les nombreux rôles de SUMO démontrent bien le rôle majeur que peuvent avoir les Ubls au bon fonctionnement de la cellule.

**Références :**

- Azfer, A., J. Niu, et al. (2006). "Activation of endoplasmic reticulum stress response during the development of ischemic heart disease." Am J Physiol Heart Circ Physiol **291**(3): H1411-1420.
- Bischof, O. and A. Dejean (2007). "SUMO is growing senescent." Cell Cycle **6**(6): 677-681.
- Bohren, K. M., V. Nadkarni, et al. (2004). "A M55V polymorphism in a novel SUMO gene (SUMO-4) differentially activates heat shock transcription factors and is associated with susceptibility to type I diabetes mellitus." J Biol Chem **279**(26): 27233-27238.
- Bongaerts, R. J., I. Hautefort, et al. (2002). "Green fluorescent protein as a marker for conditional gene expression in bacterial cells." Methods Enzymol **358**: 43-66.
- Cheng, J., T. Bawa, et al. (2006). "Role of desumoylation in the development of prostate cancer." Neoplasia **8**(8): 667-676.
- Dorval, V. and P. E. Fraser (2006). "Small ubiquitin-like modifier (SUMO) modification of natively unfolded proteins tau and alpha-synuclein." J Biol Chem **281**(15): 9919-9924.
- Ebe, T. (2007). "[Green fluorescent protein as a marker gene expression]." Tanpakushitsu Kakusan Koso **52**(13 Suppl): 1766-1767.

- Eliopoulos, N. and J. Galipeau (2002). "Green fluorescent protein in retroviral vector constructs as marker and reporter of gene expression for cell and gene therapy applications." Methods Mol Biol **183**: 353-371.
- Fire, A., S. Xu, et al. (1998). "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*." Nature **391**(6669): 806-811.
- Fraser, A. G., R. S. Kamath, et al. (2000). "Functional genomic analysis of *C. elegans* chromosome I by systematic RNA interference." Nature **408**(6810): 325-330.
- Gareau, J. R. and C. D. Lima (2010). "The SUMO pathway: emerging mechanisms that shape specificity, conjugation and recognition." Nat Rev Mol Cell Biol **11**(12): 861-871.
- Ha, B. H., H. C. Ahn, et al. (2008). "Structural basis for Ufm1 processing by UfSP1." J Biol Chem **283**(21): 14893-14900.
- Hermann, Ed. (2002). *Caenorhabditis elegans* Un organisme modèle en biologie.
- Hochstrasser, M. (2009). "Origin and function of ubiquitin-like proteins." Nature **458**(7237): 422-429.
- Jacques, C., O. Baris, et al. (2005). "Two-step differential expression analysis reveals a new set of genes involved in thyroid oncocytic tumors." J Clin Endocrinol Metab **90**(4): 2314-2320.

- Kamath, R. S., A. G. Fraser, et al. (2003). "Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi." Nature **421**(6920): 231-237.
- Kamath, R. S., M. Martinez-Campos, et al. (2001). "Effectiveness of specific RNA-mediated interference through ingested double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*." Genome Biol **2**(1): RESEARCH0002.
- Kang, S. H., G. R. Kim, et al. (2007). "Two novel ubiquitin-fold modifier 1 (Ufm1)-specific proteases, UfSP1 and UfSP2." J Biol Chem **282**(8): 5256-5262.
- Kenyon, C. (2005). "The plasticity of aging: insights from long-lived mutants." Cell **120**(4): 449-460.
- Kenyon, C., J. Chang, et al. (1993). "A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type." Nature **366**(6454): 461-464.
- Kerscher, O., R. Felberbaum, et al. (2006). "Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins." Annu Rev Cell Dev Biol **22**: 159-180.
- Kirimura, K., S. Ogawa, et al. (2006). "Expression analysis of alternative oxidase gene (*aox1*) with enhanced green fluorescent protein as marker in citric acid-producing *Aspergillus niger*." J Biosci Bioeng **102**(3): 210-214.
- Komatsu, M., T. Chiba, et al. (2004). "A novel protein-conjugating system for Ufm1, a ubiquitin-fold modifier." EMBO J **23**(9): 1977-1986.

- Lee, J. S. and S. S. Thorgeirsson (2004). "Genome-scale profiling of gene expression in hepatocellular carcinoma: classification, survival prediction, and identification of therapeutic targets." Gastroenterology **127**(5 Suppl 1): S51-55.
- Lu, H., Y. Yang, et al. (2008). "The identification of potential factors associated with the development of type 2 diabetes: a quantitative proteomics approach." Mol Cell Proteomics **7**(8): 1434-1451.
- Maeda, I., Y. Kohara, et al. (2001). "Large-scale analysis of gene function in *Caenorhabditis elegans* by high-throughput RNAi." Curr Biol **11**(3): 171-176.
- Mitani, S. (2009). "Nematode, an experimental animal in the national BioResource project." Exp Anim **58**(4): 351-356.
- Montgomery, M. K., S. Xu, et al. (1998). "RNA as a target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(26): 15502-15507.
- Parker, J. A., J. B. Connolly, et al. (2001). "Expanded polyglutamines in *Caenorhabditis elegans* cause axonal abnormalities and severe dysfunction of PLM mechanosensory neurons without cell death." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(23): 13318-13323.
- Parker, J. A., M. Metzler, et al. (2007). "Huntingtin-interacting protein 1 influences worm and mouse presynaptic function and protects *Caenorhabditis elegans* neurons against mutant polyglutamine toxicity." J Neurosci **27**(41): 11056-11064.

- Riley, B. E., H. Y. Zoghbi, et al. (2005). "SUMOylation of the polyglutamine repeat protein, ataxin-1, is dependent on a functional nuclear localization signal." J Biol Chem **280**(23): 21942-21948.
- Sarge, K. D. and O. K. Park-Sarge (2009). "Sumoylation and human disease pathogenesis." Trends Biochem Sci **34**(4): 200-205.
- Sasakawa, H., E. Sakata, et al. (2006). "Solution structure and dynamics of Ufm1, a ubiquitin-fold modifier 1." Biochem Biophys Res Commun **343**(1): 21-26.
- Shinbo, Y., T. Niki, et al. (2006). "Proper SUMO-1 conjugation is essential to DJ-1 to exert its full activities." Cell Death Differ **13**(1): 96-108.
- Spirek, M., A. Estreicher, et al. (2010). "SUMOylation is required for normal development of linear elements and wild-type meiotic recombination in *Schizosaccharomyces pombe*." Chromosoma **119**(1): 59-72.
- Steffan, J. S., N. Agrawal, et al. (2004). "SUMO modification of Huntingtin and Huntington's disease pathology." Science **304**(5667): 100-104.
- Takahashi, K., M. Ishida, et al. (2008). "SUMO-1 immunoreactivity co-localizes with phospho-Tau in APP transgenic mice but not in mutant Tau transgenic mice." Neurosci Lett **441**(1): 90-93.
- Tanaka, K., T. Suzuki, et al. (1998). "The ligation systems for ubiquitin and ubiquitin-like proteins." Mol Cells **8**(5): 503-512.
- Tatar, M., A. Bartke, et al. (2003). "The endocrine regulation of aging by insulin-like signals." Science **299**(5611): 1346-1351.

- Tatsumi, K., Y. S. Sou, et al. (2010). "A novel type of E3 ligase for the Ufm1 conjugation system." J Biol Chem **285**(8): 5417-5427.
- Varshavsky, A. (1997). "The ubiquitin system." Trends Biochem Sci **22**(10): 383-387.
- Volkel, P., P. Le Faou, et al. (2010). "Interaction proteomics: characterization of protein complexes using tandem affinity purification-mass spectrometry." Biochem Soc Trans **38**(4): 883-887.
- Wang, L. and S. Banerjee (2004). "Differential PIAS3 expression in human malignancy." Oncol Rep **11**(6): 1319-1324.
- Wilkinson, K. A. and J. M. Henley (2010). "Mechanisms, regulation and consequences of protein SUMOylation." Biochem J **428**(2): 133-145.
- Yun, C., A. Stanhill, et al. (2008). "Proteasomal adaptation to environmental stress links resistance to proteotoxicity with longevity in *Caenorhabditis elegans*." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(19): 7094-7099.